

# FORTSCHRITTE DER CHEMISCHEN FORSCHUNG

Herausgeber:

A. Davison · M. J. S. Dewar

K. Hafner · E. Heilbronner

U. Hofmann · K. Niedenzu

Kl. Schäfer · G. Wittig

Schriftleitung: F. Boschke

**Band 11, Heft 3, März 1969**

**Ionophoretische  
Trennverfahren**

**Neuere Methoden der  
Schmelzpunktbestimmung**

**Grundlagen der  
Mikrophotometrie**

<i>W. Preetz</i>	Ionophoretische Trennverfahren in der analytischen und präparativen Chemie .....	375
<i>H. Jucker und H. Suter</i>	Neuere Methoden und Geräte der Schmelzpunktbestimmung .....	430
<i>K. Beyermann</i>	Grundlagen und Arbeitstechnik der Mikrophotometrie .....	473

In kritischen Übersichten werden in dieser Reihe Stand und Entwicklung aktueller chemischer Forschungsgebiete beschrieben. Sie wendet sich an alle Chemiker in Forschung und Industrie, die am Fortschritt ihrer Wissenschaft teilhaben wollen.

In der Regel werden nur Beiträge veröffentlicht, die ausdrücklich angefordert worden sind. Schriftleitung und Herausgeber sind aber für ergänzende Anregungen und Hinweise jederzeit dankbar. Manuskripte können in den „Fortschritten der chemischen Forschung“ in Deutsch oder Englisch veröffentlicht werden.

Jedes Heft der Reihe ist auch einzeln käuflich.

This series presents critical reviews of the present position and future trends in modern chemical research. It is addressed to all research and industrial chemists who wish to keep abreast of advances in their subject.

As a rule, contributions are specially commissioned. The editors and publishers will, however, always be pleased to receive suggestions and supplementary information. Papers are accepted for „Fortschritte der chemischen Forschung“ in either German or English.

Single issues may be purchased separately.

## Herausgeber:

Prof. Dr. *A. Davison*, Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA — Prof. Dr. *M. J. S. Dewar*, Department of Chemistry, The University of Texas, Austin, TX 78712, USA — Prof. Dr. *K. Hafner*, Institut für Organische Chemie der TH, 6100 Darmstadt, Schloßgartenstraße 2 — Prof. Dr. *E. Heilbronner*, Physikalisch-Chemisches Institut der Universität, CH-4000 Basel, Klingelbergstraße 80 — Prof. Dr. *U. Hofmann*, Institut für Anorganische Chemie der Universität, 6900 Heidelberg 1, Tiergartenstraße — Prof. Dr. *K. Niedenzu*, University of Kentucky, College of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Lexington, KY 40506, USA — Prof. Dr. *Kl. Schäfer*, Institut für Physikalische Chemie der Universität, 6900 Heidelberg 1, Tiergartenstraße — Prof. Dr. *G. Wittig*, Institut für Organische Chemie der Universität, 6900 Heidelberg 1, Tiergartenstraße.

## Schriftleitung:

Dipl.-Chem. *F. Boschke*, Springer-Verlag, 6900 Heidelberg 1, Postfach 1780

SPRINGER-VERLAG      6900 Heidelberg 1 · Postfach 1780 · Telefon 49101  
 Telex 04-61723  
 1000 Berlin 33 · Heidelberger Platz 3 · Telefon 83 03 01  
 Telex 01-83319

SPRINGER-VERLAG      New York, N. Y. 10010 · 175, Fifth Avenue  
 NEW YORK INC.      Telefon 673-2660

# Ionophoretische Trennverfahren in der analytischen und präparativen Chemie

Dr. W. Preetz

Institut für Analytische Chemie und Radiochemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken

## Inhalt

1.	Einleitung .....	375
2.	Theoretische Grundlagen der Ionenwanderung .....	376
2.1.	Wanderungsgeschwindigkeit und Ionenbeweglichkeit .....	377
2.1.1.	Eigenschaften des Ions .....	378
2.1.2.	Einfluß des elektrischen Feldes .....	381
2.1.3.	Einflüsse des Lösungsmittels .....	382
2.1.4.	Einfluß des Trägermaterials .....	387
3.	Trennverfahren .....	393
3.1.	Methode der wandernden Grenzfläche .....	393
3.1.1.	Methode nach Kendall .....	393
3.1.2.	Methode nach Tiselius .....	395
3.2.	Zonenionophorese .....	397
3.2.1.	Diskontinuierliche Zonenionophorese .....	398
3.2.2.	Kontinuierliche Verfahren .....	407
3.3.	Gegenstromionenwanderung .....	411
3.3.1.	Gegenstromelektrolyse .....	412
3.3.2.	Gegenstromionophorese .....	415
3.4.	Fokussierende Ionophorese .....	420
4.	Schluß .....	421
5.	Literatur .....	422

## 1. Einleitung

Viele Verfahren zur Simultanbestimmung gestatten den qualitativen Nachweis und mitunter auch die quantitative Bestimmung bereits bekannter Substanzen. Neue Verbindungen lassen sich dagegen im allgemeinen erst nach ihrer Reindarstellung sicher und vollständig charakterisieren und für weitere Reaktionen verwenden. Deshalb ist die Entwicklung leistungsfähiger Trennverfahren gleichermaßen Anliegen des analytisch wie des präparativ arbeitenden Chemikers.

Für die Isolierung chemisch und physikalisch immer ähnlicherer Substanzen aus Vielkomponentengemischen sind die klassischen Trennoperationen mehr und mehr durch vielstufige Verteilungs- und Austauschprozesse (Chromatographie, Gegenstromextraktion, Zonenschmelzen usw.) ersetzt worden. Es genügt ein kleiner Unterschied im physikalisch-chemischen Verhalten, um in hoher Vervielfachung zu der gewünschten Trennung zu führen.

Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit geladener Teilchen im elektrischen Feld wird seit längerer Zeit zur Trennung empfindlicher Substanzen herangezogen. Die entsprechenden Verfahren werden unter den Oberbegriffen *Elektrophorese*, wenn es sich um die Trennung kolloidaler und hochmolekularer Teilchen, bzw. *Ionophorese*, wenn kleine Ionen definierter Ladung getrennt werden, zusammengefaßt. Eine scharfe Unterscheidung ist nicht möglich, zumal die Grundlagen die gleichen sind und auch die Entwicklung analog verlaufen ist. Elektrophoretische Methoden werden jedoch vorwiegend auf organisch- und physiologisch-chemischem Gebiet sowie auf dem medizinisch-klinischen Sektor eingesetzt. Dagegen verwendet man im anorganisch-analytischen Bereich hauptsächlich ionophoretische Verfahren.

Das vorliegende experimentelle Material ist sehr umfangreich. Deshalb sei hinsichtlich spezieller Problemstellungen auf die Originalliteratur und auf bewährte, umfangreichere Monographien (1–6) sowie periodisch erscheinende Literaturübersichten (7, 8) verwiesen. Neben einer allgemeinen Erklärung der Grundlagen werden hier die Entwicklungstendenzen der jüngsten Zeit am Fortschritt der Methodik auf dem Gebiet der Ionophorese gezeigt. Dabei werden Verfahren, die sich mit der Trennung und Darstellung sehr ähnlicher Ionen befassen, eingehender behandelt.

## 2. Theoretische Grundlagen der Ionenwanderung

Wirkt auf geladene Teilchen, die sich in einem reibenden Medium befinden, ein elektrisches Feld ein, so erreichen diese nach einer äußerst kurzen beschleunigten Anlaufbewegung eine für sie charakteristische Endgeschwindigkeit  $w$ :

$$w = \frac{K}{R} \quad (1)$$

$K$  = treibende elektrische Kraft,

$R$  = Reibungskonstante des umgebenden Mediums.

Unter dem Einfluß einer Gleichspannung überlagert sich also der regellosen Braunschen Molekularbewegung eine gerichtete Wanderung, die zu einer zeitlichen Verschiebung der Teilchen im Raum führt.

## 2.1. Wanderungsgeschwindigkeit und Ionenbeweglichkeit

Die treibende elektrische Kraft  $K$  nach Gl. (1) ist für Ionen mit der Ladungszahl  $z$  im Feld der Stärke  $E$  [V/cm]

$$K = z \cdot e_0 \cdot E \quad (2)$$

$e_0$  = Elementarladung.

Die Reibungskonstante  $R$  hat für kugelförmige Körper nach dem Stokesschen Gesetz den Wert:

$$R = 6 \pi \cdot \eta \cdot r \quad (3)$$

$\eta$  = kinematische Zähigkeit des reibenden Mediums,

$r$  = Radius des wandernden Teilchens.

Die Fundamentalgleichung der ionophoretischen Wanderung lautet demnach:

$$w = \frac{z \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4)$$

Aus der Wanderungsgeschwindigkeit  $w$  [cm/sec] ergibt sich die Ionenbeweglichkeit  $u$  [cm<sup>2</sup> · V<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup>] nach:

$$u = \frac{w}{E} = \frac{z \cdot e_0}{6 \pi \eta r} \quad (5)$$

Die einfach erscheinenden Zusammenhänge beinhalten jedoch eine beträchtliche Anzahl schwer erfaßbarer Variablen. Sie machen die theoretische Berechnung der ionophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit nahezu unmöglich. In der Praxis bestimmt man diese deshalb experimentell unter Einhaltung reproduzierbarer Versuchsbedingungen.

Liegt an zwei Elektroden im Abstand  $l$  [cm] die Gleichspannung  $U$  [V], entsprechend einer Feldstärke  $E = \frac{U}{l}$  [V/cm], so ergibt sich für ein Ion, das innerhalb der Zeit  $t$  [sec] die Strecke  $x$  [cm] zurücklegt, die Ionenbeweglichkeit zu

$$u = \frac{x}{t \cdot \frac{U}{l}} = \frac{x}{t \cdot E} \quad (6)$$

Auch für Elektrolytlösungen gilt das Ohmsche Gesetz:

$$U = R \cdot I \quad (7)$$

$R$  = Widerstand [Ohm],

$I$  = Stromstärke [A].

Der elektrische Widerstand ist:

$$R = \frac{1}{\kappa} \cdot \frac{l}{q} \quad (8)$$

$\kappa$  = Spezifische Leitfähigkeit [ $\text{Ohm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ],

$q$  = Querschnitt des elektrolytischen Leiters [ $\text{cm}^2$ ].

Bei Einsetzen von Gl. (7) und (8) in Gl. (6) erhält man:

$$u = \frac{\kappa}{t} \cdot \frac{\kappa \cdot q}{I} \quad (9)$$

### 2.1.1. Eigenschaften des Ions

Die in ionisierenden Lösungsmitteln durch Dissoziation entstehenden Kationen und Anionen tragen definierte Ladungen, nämlich die Elementarladung  $e_0$  oder ein ganzzahliges Vielfaches davon. Auch größere Partikel wie Kolloide, Proteine, Enzyme usw. können durch Adsorption einfacher Ionen zu definierten Ladungsträgern werden.

#### 2.1.1.1. Die elektrische Ladung

Ionen, die sich in einer Lösung endlicher Konzentration befinden, treten in elektrostatische Wechselwirkung, d. h. jedes Ion umgibt sich mit einer Ionenwolke entgegengesetzter Ladung. Es bildet sich eine von der Konzentration der Lösung abhängige diffuse Doppelschicht aus, die bei der Wanderung mitgeschleppt wird. Die Ionenladung  $e$  wird dadurch abgeschirmt und kommt nur als kleinere effektive Ladung  $e_{\text{eff}}$  zur Geltung.

Allgemein wird die Ladung von Ionen sehr stark durch das chemische Verhalten bestimmt. Die im zeitlichen Mittel bei einem Teilchen anzu treffende Ladung ist direkt abhängig von der Dissoziations- oder Assoziationstendenz. Die Eigenschaften der Ionen sind somit auf das engste mit denen der Umgebung verflochten (Kap. 2.1.3.).

Vielfach dienen ionophoretische Untersuchungen nur der Bestimmung des Ladungssinnes unter speziellen Versuchsbedingungen. Die Abschätzung der Ladungszahl ist schwieriger und oft nur möglich, wenn ionophoretische Beweglichkeitskurven vorliegen (Kap. 2.1.3.2.).

#### 2.1.1.2. Ionenradius und Ionenvolumen

Die Berechnung ionophoretischer Beweglichkeiten nach Gl. (5) setzt außer der Kenntnis der Ionenladung auch die des Ionenradius voraus. Faßt man für definierte Versuchsbedingungen die Konstanten zu  $K$  zusammen, so hat Gl. (5) die Form:

$$u = K \cdot \frac{z}{r} \quad (10)$$

Die aus kristallographischen Untersuchungen bekannten Ionenradien stellen nur Richtwerte dar, denn in Gl. (10) ist der Radius des solvatisierten Ions einzusetzen. Über Solvatationszahlen, insbesondere für mehratomige Ionen liegt nur wenig Material vor. Der Radius ist deshalb im allgemeinen durch einen empirisch bestimmten Wert  $\bar{d}$  zu korrigieren (9), so daß sich für die Beweglichkeit ergibt:

$$u = K \cdot \frac{z}{r + \bar{d}} \quad (11)$$

Um einen Zusammenhang zwischen Ionengröße, -gestalt und -beweglichkeit zu finden, sind mehrfach Modelluntersuchungen angestellt worden. *Edward* (10, 11) führte für nicht kugelförmige Ionen das Reibungsverhältnis  $\frac{f}{f_0}$  ein, das eine Funktion der Achsenverhältnisse in Ellipsoiden darstellt. Ähnliche Untersuchungen liegen von *Elworthy* (12, 13) und *Gonick* (14) vor.

Für die Beweglichkeit ergibt sich:

$$u = K \cdot \frac{z}{r_w} \cdot \frac{f}{f_0} \quad (12)$$

$r_w$  ist der *van der Waalssche* Ionenradius, der sich für größere Ionen aus bekannten Volumeninkrementen der einzelnen Atome oder Atomgruppen errechnen läßt. Die Konstanten in Gl. (12) sind stark von den Versuchsbedingungen abhängig und müssen mit Hilfe von Modellionen experimentell bestimmt werden. *Markham* und *Smith* (15) fanden umgekehrte Proportionalität zwischen Beweglichkeit und Ionenvolumen. Die beste Korrelation zwischen berechneten Radien und Beweglichkeiten ergibt sich für große Ionen, die außerdem hinsichtlich ihrer Gestalt und dem chemischen Verhalten ähnlich sind, z.B. bei den Polythionat-Ionen (16).

### 2.1.1.3. Ionenmasse

*Lindemann* (17) vertrat als erster die Ansicht, daß die Ionenbeweglichkeit eine Funktion der Ionenmasse ist und Isotope durch Ionenwanderung trennbar sein müßten. Diese Anschauung wurde später von *Klemm* theoretisch begründet (18). Nach Ansätzen entsprechend denen der kinetischen Gastheorie sollten sich die Ionenbeweglichkeiten  $u_i$  umgekehrt proportional den Wurzeln aus den Teilchengewichten  $M_i$  verhalten:

$$\frac{u_1}{u_2} = \sqrt{\frac{M_2}{M_1}} \quad (13)$$

Nach zunächst vergeblichen Versuchen ließ sich später durch Verbesserung der Trennmethode der Masseneffekt in der Ionenbeweglichkeit zur Isotopenanreicherung nachweisen und ausnutzen (Kap. 3.3.1.).

*Blasius* und *Preetz* (19, 20) wendeten diese Beziehung auf die experimentell gemessenen Ionenwanderungsgeschwindigkeiten von Gemischtligandkomplexionen des Typs



an und fanden bei diesen homologen Reihen chemisch und physikalisch sehr ähnlicher Ionen eine gute Bestätigung der Gl. (13).

*Hais* (21) beobachtete für eine Anzahl organischer Ionen, daß sich die äquivalente Beweglichkeit  $\frac{u}{z}$  umgekehrt wie die Masse der Ionen verhält:

$$\frac{u}{z} = \frac{h}{M}. \quad (14)$$

Diese Beziehung, die an verschiedenen Komplex-Ionen überprüft wurde, gilt nur in engen Bereichen. Vor allen Dingen muß die Masse des Bezugs-Ions sehr nahe bei der des Probe-Ions liegen. *Jokl* (22, 23) stellte auf Grund umfangreicher Untersuchungen an Komplexverbindungen folgenden empirischen Zusammenhang fest:

$$\frac{u}{z} = \frac{a}{\sqrt{M}} + b \quad (15)$$

$a$  und  $b$  sind Konstanten, die von den jeweiligen apparativen Gegebenheiten abhängen.

Da in allen angeführten Beziehungen spezifische Wechselwirkungen der Ionen mit dem Lösungsmittel unberücksichtigt bleiben, ist ihre Anwendungsbreite nur gering. Es sind Fälle bekannt, wo die Beweglichkeiten sich gerade entgegengesetzt verhalten wie auf Grund der Gl. (13) zu erwarten ist. Z.B. nehmen die Beweglichkeiten der Alkaliionen mit steigender Massenzahl zu;  $\text{Dy}^{3+}$  hat eine etwas größere Beweglichkeit als  $\text{Y}^{3+}$ , obwohl es bei annähernd gleichem Radius fast die doppelte Masse besitzt (9).

Sowohl für die Ansätze, die stärkeres Gewicht auf die Ionengröße legen (Kap. 2.1.1.2.), wie auch für die Gleichungen, die mehr die Masse in Betracht ziehen, gilt, daß eine befriedigende Korrelation nur innerhalb von Ionengruppen gefunden wird, die chemische oder physikalische Ähnlichkeiten aufweisen.

### 2.1.2. Einfluß des elektrischen Feldes

Das elektrische Feld wird bei der Ionophorese durch Anlegen einer definierten in weiten Grenzen variablen Gleichspannung  $U$  über die Trennstrecke  $l$  erzeugt. Die in Abhängigkeit vom Ort sich einstellende Feldstärke  $E$  ergibt sich aus Gl. (7) und (8) zu:

$$E = \frac{\Delta U}{\Delta l} = \frac{1}{\kappa} \cdot \frac{I}{q}. \quad (16)$$

An Orten kleiner Leitfähigkeit  $\kappa$  und geringen Querschnitts  $q$  des elektrolytischen Leiters stellen sich demnach hohe Feldstärken ein. Die Leitfähigkeit ist eine Funktion der Konzentrationen  $c_i$ , der Ladungszahlen  $z_i$  und der Beweglichkeiten  $u_i$  aller Ionen:

$$\kappa = \sum c_i \cdot z_i \cdot u_i \cdot F. \quad (17)$$

Daraus ergibt sich die Äquivalentleitfähigkeit zu:

$$A = \frac{\kappa}{z \cdot c} = u \cdot F \quad (18)$$

$F$  = Faradaysche Zahl.

Konzentrationsänderungen wirken sich umgekehrt proportional auf die Feldstärke aus. Nur in homogenen Elektrolyten gleichen Querschnitts, gleicher Temperatur und Konzentration herrscht gleicher Spannungsabfall.

Nach Gl. (4) sind Wanderungsgeschwindigkeit und Feldstärke einander direkt proportional. Die in einer gewissen Zeit zurückgelegten Wanderungsstrecken sind umso größer, je höhere Feldstärken auf die Ionen einwirken. Von dieser Tatsache macht man bei der Hochspannung-ionophorese (Kap. 3.2.1.1.) Gebrauch. Die dadurch erreichbare Verkürzung der Trenndauer erlaubt gleichzeitig schärfere Trennungen, weil die irreversible Zonenverbreiterung durch Diffusion proportional der Wurzel der Trennzeit ist (24).

Streng lineare Abhängigkeit zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Feldstärke besteht nur, wenn die übrigen Versuchsparameter konstant gehalten werden. Diese Forderung ist nur innerhalb gewisser Grenzen zu erfüllen. Mit der Erhöhung der Feldstärke geht ein linearer Anstieg des fließenden Stroms und das quadratische Anwachsen der Jouleschen Wärme  $Q$  einher:

$$Q = \frac{R \cdot I^2}{A} \quad (19)$$

$A$  = mechanisches Wärmeäquivalent ( $4,185 \cdot 10^7$  erg/cal).

Die Grenzen der Feldstärkerhöhung bei der Hochspannungsiophorese sind durch die Leistungsfähigkeit des Kühlsystems festgelegt. Größenordnungen, in denen Feldstärke- und Dissoziationsspannungseffekte (25) zu berücksichtigen sind (ab 50 KV/cm), werden bei der gewöhnlichen Ionophorese bei weitem nicht erreicht.

Bei ungenügender Wärmeableitung tritt zunächst eine Temperaturerhöhung des Elektrolyten ein. Dadurch nehmen Leitfähigkeit und Ionenbeweglichkeit zu. Der Temperaturkoeffizient der Ionenbeweglichkeit hat für kleinere Ionen die Größenordnung von etwa 3%/Grad. Änderungen der Dichte und Viskosität bewirken die Vergrößerung von Konvektion und Diffusion und setzen die erreichbare Trenngüte durch Rückvermischungseffekte herab. Um größere Temperaturgradienten innerhalb des Elektrolyten zu vermeiden, dürfen bei der Hochspannungstechnik nur sehr dünne Schichten verwendet werden.

### 2.1.3. Einflüsse des Lösungsmittels

Im Abschnitt 2.1.1. ist schon auf den Einfluß des Lösungsmittels auf die effektive Ladung und auf den Ionenradius hingewiesen worden. Theoretisch erschöpfend ist speziell für starke Elektrolyte die Abhängigkeit der Ionenwanderung von der Konzentration und den Eigenschaften des Lösungsmittels von *Debye, Hückel* und *Onsager* (25) untersucht worden.

#### 2.1.3.1. Konzentration und Ionenstärke

Durch Leitfähigkeitsmessungen an Lösungen starker Elektrolyten stellte *Kohlrausch* um 1900 fest, daß die Äquivalentleitfähigkeit  $\Lambda$  mit wachsender Konzentration  $c$  abnimmt. Er fand empirisch das Quadratwurzelgesetz:

$$\Lambda = \Lambda_{\infty} - A \cdot \sqrt{c} \quad (20)$$

$\Lambda_{\infty}$  = Äquivalentleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung

$A$  = Konstante.

Gemäß Gl. (18) nimmt auch die Ionenbeweglichkeit mit steigender Konzentration ab. Es ist dies eine Folge interionischer Wechselwirkungen. Durch Coulombsche Anziehung umgibt sich jedes geladene Teilchen mit einer Ionenatmosphäre entgegengesetzter Ladung. Untersuchungen verschiedener verdünnter Elektrolytlösungen zeigten, daß für die interionischen Wechselwirkungen weniger die spezifischen Eigenschaften der Ionen, sondern vielmehr ihre Zahl und Ladung maßgebend sind. Der Einfluß zweifach geladener Ionen ist aber nicht der gleiche wie von der doppelten Menge einfach geladener Ionen. Diesem Umstand trugen *Lewis* und *Randall* Rechnung durch Einführung der Ionenstärke  $J$ :

$$J = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2. \quad (21)$$

Die Ionenstärke ist gleich der halben Summe der Produkte aus den Konzentrationen und dem Quadrat der Ladungen aller in einer Lösung befindlichen Ionen.

Durch *Debye*, *Hückel* und *Onsager* sind die interionischen Wechselwirkungen, wie sie in Lösungen starker Elektrolyten endlicher Konzentration auftreten, mathematisch behandelt worden. Für den Radius der Ionenatmosphäre  $a$  um geladene Teilchen ergibt sich:

$$a = 1,988 \cdot 10^{-10} \sqrt{\frac{\varepsilon \cdot T}{J}} \text{ [cm]}. \quad [22]$$

Außer der Dielektrizitätskonstanten  $\varepsilon$  und der absoluten Temperatur  $T$  geht also die Ionenstärke in diese wichtige Größe bestimmend ein.

Nach *Debye* und *Hückel* bewirken zwei Effekte eine Bremsung der Ionenwanderung im elektrischen Feld:

### 1) *Relaxationseffekt*

Durch die Wanderung eines Ions unter der Wirkung eines äußeren elektrischen Feldes wird seine Ionenatmosphäre ständig gestört und muß sich innerhalb der sogenannten Relaxationszeit neu aufbauen. Bei gerichteter Bewegung ist die Ionenatmosphäre unsymmetrisch, nämlich die Ladungsdichte vor dem Ion ist kleiner, dahinter aber größer als im Gleichgewichtszustand. Das bewirkt eine elektrostatische Bremsung und damit gekoppelt eine Verkleinerung der Wanderungsgeschwindigkeit. Die Größe dieses Relaxationseffekts ist abhängig von  $a$  bzw. von  $\sqrt{J}$ .

### 2) *Elektrophoretischer Effekt*

Den im elektrischen Feld wandernden Ionen bewegt sich die entgegengesetzt geladene Ionenatmosphäre entgegen. Die mitgeschleppten Solvathüllen wirken wie eine Gegenströmung des Lösungsmittels. Die dadurch bedingte Reibung setzt die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen herab.

Diese beiden Effekte geben die physikalische Erklärung für Gl. (20), in die statt der Konzentration die Ionenstärke einzuführen ist:

$$A = A_0 - A \sqrt{J}. \quad [23]$$

Gl. (23) beschreibt den Einfluß der Ionenstärke auf die Leitfähigkeit und die Ionenbeweglichkeit. Für die Praxis ergibt sich die häufig nicht beachtete Forderung, bei Bestimmungen und Vergleichen ionophoretischer Wanderungsgeschwindigkeiten unbedingt für die Konstanz der Ionenstärke zu sorgen. Zugabe von Fremdsalzen oder Leitelektrolyten bewirken die Abnahme der Beweglichkeit.

Die Konstante  $A$  der Gl. (23) beinhaltet neben der Temperatur und den Ladungszahlen spezifische Eigenschaften des Lösungsmittels wie Viskosität und Dielektrizitätskonstante. Die Beziehung ist daher nicht an die üblicherweise benutzten wäßrigen Systeme gebunden. Sie ließ sich auch für eine Anzahl nichtwäßriger Lösungsmittel in gewissen Konzentrationsbereichen bestätigen (25). Grundsätzlich wachsen die interionischen Wechselwirkungen mit abnehmender DK und zunehmender Ionenstärke an.

### 2.1.3.2. Gleichgewichtsreaktionen und Nettoladung

Dissoziations-, Hydrolyse-, Hydratations- oder Komplexgleichgewichte verursachen oft eine erhebliche Änderung der effektiven Ionenladung oder auch der Teilchengröße, so daß nur eine kleinere Nettobeweglichkeit  $u_n$  beobachtet wird.

#### *Dissoziationsgleichgewichte*

Dissoziationsgleichgewichte schwacher Säuren, Basen und Ampholyte, Hydrolysevorgänge und viele Komplexbildungsreaktionen sind pH-abhängig. Besitzt z. B. das Anion  $A^-$  der schwachen Säure HA die Beweglichkeit  $u_a$ , so ergibt sich die vom Dissoziationsgrad  $\alpha$  abhängige Nettobeweglichkeit  $u_n$ :

$$u_n = u_a \cdot \alpha = \frac{u_a \cdot c_{A^-}}{c_{HA} + c_{A^-}}. \quad (24)$$

Durch Einführung der Dissoziationskonstanten  $K_a$  der schwachen Säure findet man folgenden Zusammenhang zwischen der Nettobeweglichkeit  $u_n$  und der Wasserstoffionenkonzentration  $c_{H^+}$ :

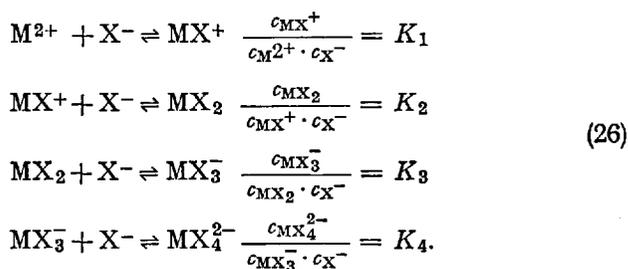
$$u_n = \frac{u_a \cdot K_a}{c_{H^+} + K_a}. \quad (25)$$

Trägt man die Nettobeweglichkeit als Funktion des pH-Wertes auf, so erhält man die ionophoretische Beweglichkeitskurve (26), die je nach Substanz einen charakteristischen, meist S-förmigen Verlauf hat. Bei Ampholyten ändert sich oft nicht nur der Betrag der Beweglichkeit, sondern auch die Wanderungsrichtung. Das Gebiet, in dem die Nettobeweglichkeit den Wert Null annimmt, bezeichnet man als isoelektrischen Bereich. Besonders für ionophoretische Trennungen von Aminosäuren und Naturstoffen, die durch ihre schwach sauren und basischen Eigenschaften sehr charakteristisch auf pH-Änderungen ansprechen, ist die Bestimmung ionophoretischer Beweglichkeitskurven zur Ermittlung optimaler Trennbedingungen sehr wichtig (4).

### Komplexbildung

Komplexbildung in Lösung zeigt sich oft durch erhebliche Beweglichkeitsänderungen an. Diese hängen von der Konzentration des Komplexbildners ab. Die Änderungen sind besonders groß, wenn ionische Liganden beteiligt sind, weil dann außer Masse- auch Ladungsänderungen eintreten. Den Liganden kommt bei der Komplexbildung eine ähnliche Bedeutung zu, wie den  $H^+$ -Ionen bei Säure-Base-Gleichgewichten.

Zur anschaulichen Erklärung diene ein einfacher konstruierter Fall. Das Zentralkation  $M^{2+}$  bildet stufenweise mit den Ligandionen  $X^-$  nach folgenden abhängigen Gleichgewichten einkernige Komplexe:



Die Beweglichkeiten der Teilchen  $M^{2+}$  bis  $MX_4^{2-}$  seien  $u_0, u_1 \dots u_4$ . Bezeichnet man die Wanderung zur Kathode als positiv, zur Anode als negativ, so ist  $u_0 > u_1 > \dots > u_4$ . Unter der Annahme, daß sich die Gleichgewichte zwischen den verschiedenen Komplexarten sehr schnell einstellen, tritt bei der Ionenophorese nur eine scharfe Zone auf. Sie wandert mit der Nettobeweglichkeit  $u_n$ , die zwischen  $u_0$  und  $u_4$  liegt.  $u_n$  ergibt sich additiv aus den Beweglichkeiten des freien Kations und aller Komplexstufen, wobei jede Komponente entsprechend ihrer Gleichgewichtskonzentration eingeht:

$$u_n = \frac{u_0 \cdot c_{M^{2+}} + u_1 \cdot c_{MX^+} + u_2 \cdot c_{MX_2} + u_3 \cdot c_{MX_3^-} + u_4 \cdot c_{MX_4^{2-}}}{c_{M^{2+}} + c_{MX^+} + c_{MX_2} + c_{MX_3^-} + c_{MX_4^{2-}}}. \tag{27}$$

Nach Substitution der Gleichgewichtskonzentrationen der Komplexstufen durch die freie Ligandionenkonzentration  $c_{X^-}$  und die Komplexkonstanten  $K_1 - K_4$  aus Gl. (26) ergibt sich folgender Ausdruck:

$$u_n = \frac{u_0 + u_1 \cdot K_1 \cdot c_{X^-} + u_2 \cdot K_2 \cdot c_{X^-}^2 + u_3 \cdot K_3 \cdot c_{X^-}^3 + u_4 \cdot K_4 \cdot c_{X^-}^4}{1 + K_1 \cdot c_{X^-} + K_2 \cdot c_{X^-}^2 + K_3 \cdot c_{X^-}^3 + K_4 \cdot c_{X^-}^4}. \tag{28}$$

Die Nettobeweglichkeit ist demnach eine Funktion der Beweglichkeiten der einzelnen Komplexstufen, der Gleichgewichtskonstanten und

der freien Ligandienkonzentration. Letztere ist innerhalb weiter Grenzen variabel und gestattet die starke Beeinflussung der effektiven Wanderungsgeschwindigkeit. Unterscheiden sich die Gleichgewichtskonstanten um mehrere Zehnerpotenzen und erfolgen bei der stufenweisen Komplexbildung die Beweglichkeitsänderungen in gleichmäßigen Sprüngen, so ergibt sich die ionophoretische Beweglichkeitskurve der Abb. 1.

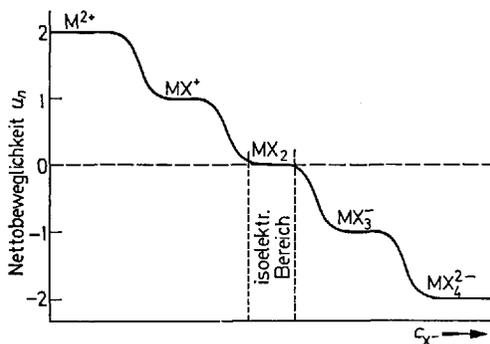


Abb. 1. Nettobeweglichkeit als Funktion der Ligandienkonzentration bei der stufenweisen Bildung von  $MX_4^{2-}$

In der in Abb. 1 konstruierten ionophoretischen Beweglichkeitskurve zeigen die waagerechten Plateaus an, daß in dem entsprechenden Konzentrationsbereich vorwiegend eine Komplexart vorliegt. Die abfallenden Äste treten auf, wenn zwei oder mehrere Komplexstufen in vergleichbaren Mengen nebeneinander bestehen. Aus der Form von Beweglichkeitskurven können daher Rückschlüsse auf den Verlauf der Komplexbildungsreaktion und auch auf die Beständigkeitskonstanten gezogen werden. Dazu liegt umfangreiches Material vor (27–31). Insbesondere *Jokl* (22, 23, 32–34), *Pučar* (35–37) und *Kiso* (38) haben die Zusammenhänge zwischen ionophoretischer Beweglichkeit und Komplexbeständigkeit untersucht.

Vielfach wird die Komplexbildung von Hydrolysevorgängen begleitet, und oft ist das komplexbildende Ligandion das Dissoziationsprodukt eines schwachen Elektrolyten. In diesen Fällen ist die Komplexbildung vom pH-Wert der Lösung abhängig. Zur Aufrechterhaltung bestimmter Bedingungen in der Elektrolytlösung, die auch durch die Komplexbildung mit der Probensubstanz nicht verschoben werden, verwendet man Pufferlösungen ausreichender Konzentration und Kapazität. Die Nettobeweglichkeiten bei pH-abhängiger Komplexbildung sind von *Jokl* (23, 33) und *Klamberg* (39) theoretisch behandelt worden.

Stellen sich die chemischen Gleichgewichte nur langsam ein, so beobachtet man Zonenverbreiterung oder Schweifbildung. Bei einer Anzahl von Übergangselementen lassen sich Komplexgleichgewichte schon bei Zimmertemperatur soweit einfrieren, daß mit Hilfe der Hochspannung-ionophorese einzelne Komplexstufen isolierbar sind (Kap. 3.2.1.4.).

#### 2.1.4. Einfluß des Trägermaterials

Die Ionophorese auf Trägermedien, vorwiegend auf Papier, in Gelen und Schichten ist in der Praxis von überragender Bedeutung. Der apparative Aufwand ist in vielen Fällen geringer, und häufig sind die Trennungen schärfer als bei der freien Ionophorese, die zweifellos die ältere Methode ist. Der Hauptvorteil eines porösen Trägermediums beruht auf seiner strömungsstabilisierenden Wirkung, wodurch Effekte konvektiver Rückvermischung weitgehend ausgeschlossen werden. Wegen der sehr großen Phasengrenzflächen, flüssig-fest, treten jedoch im Gegensatz zur freien Ionophorese eine Anzahl Wechselwirkungen auf, die die Beweglichkeit geladener Teilchen beeinflussen. Die wesentlichsten Faktoren werden im folgenden besprochen.

##### 2.1.4.1. Ionenwanderung in Trägermedien

Die Bestimmung von Ionenbeweglichkeiten in freier Elektrolytlösung durch Messung der Überführungszahlen oder nach der Methode der wandernden Grenzfläche (Kap. 3.1.) führt zu gut reproduzierbaren Ergebnissen. Beobachtet man die Ionenwanderung unter sonst gleichen Bedingungen, aber in Gegenwart von Trägermedien, so ergeben sich durchweg kleinere Werte, die zudem von der Art des verwendeten Materials abhängen.

Nach *Kunkel* und *Tiselius* (40, 41) ist das eine Folge des durch die Struktur des Trägers bedingten längeren Wanderungsweges der Teilchen, die sich nicht auf dem kürzesten Weg  $l$ , sondern auf einem vielfach gewundenen längeren Kapillarweg  $l'$  bewegen (42). Die auf die Ionen in den meanderförmigen Tunneln einwirkende Feldstärke ist deshalb kleiner als sie sich aus der angelegten Spannung und der Streifenlänge errechnet. Diese Ansicht wird gestützt durch experimentelle Ergebnisse von *Groß* (43), der eine beträchtliche Abhängigkeit der Ionenwanderungsgeschwindigkeit von der Faserrichtung in Ionophoresepapieren feststellte.

Um die auf Trägern beobachtete Beweglichkeit  $u$  mit den Werten der freien Ionophorese vergleichen zu können, wurde der Weglängenparameter oder der Umwegfaktor  $(\frac{l'}{l})^2$  eingeführt:

$$u = u' \left(\frac{l'}{l}\right)^2. \quad (29)$$

Er berücksichtigt den strukturellen Aufbau und sollte deshalb unabhängig von den zu trennenden Ionen für jedes Trägermaterial eine charakteristische Größe sein. Diese Ansicht ist insbesondere durch die experimentellen Befunde von *MacDonald* (44—46) widerlegt worden. Er konnte nachweisen, daß vielmehr auch die Größe, Gestalt, Ladung und Ladungsverteilung der Ionen von wesentlichem Einfluß sind. Das Trägermedium wirkt wie eine Barriere (barrier-effect) und zwar stärker auf große als auf kleine Ionen.

Die häufig ganz erheblich verringerte Leitfähigkeit von Elektrolyten auf Trägern läßt sich vielfach nur durch einen unbegründet hohen Umwegfaktor erklären. *Boyack* und *Giddings* (47, 48) sehen die Ursache für den erhöhten elektrischen Widerstand in der Heterogenität des Trägers. Da die Porenweite nicht gleichmäßig ist, sondern die Kanäle oft eingeschnürt sind, ergeben sich örtliche Feldinhomogenitäten, die, wie die mathematische Durchrechnung zeigt, eine Erhöhung des Widerstandes bedingen.

Mit einer reinen Weglängenkorrektur läßt sich demnach die Gesamtheit der mechanischen, physikalischen und chemischen Wechselwirkungen zwischen den wandernden Teilchen und dem Trägermedium nicht erfassen. Im allgemeinen müssen aus experimentellen Daten entsprechende Korrekturglieder ermittelt werden (Kap. 2.1.1.). Für die Trennung und Identifizierung von Substanzen sind jedoch Absolutbestimmungen von Ionenbeweglichkeiten meist bedeutungslos. Wichtig ist dagegen, daß die Ergebnisse bei Einhaltung der Versuchsbedingungen reproduzierbar sind (11, 46, 49, 50).

#### 2.1.4.2. Endosmose

Bei der Ionophorese auf Trägern beobachtet man häufig eine Strömung der Elektrolytlösung, die im allgemeinen zur Kathode gerichtet ist (51). Dadurch wird die Wanderung der Kationen erhöht, die der Anionen erniedrigt und ungeladene Teilchen bewegen sich in Richtung Kathode. Die Ursache für dieses elektrokinetische Phänomen, das Endosmose oder Elektroosmose genannt wird, liegt in der Ausbildung einer diffusen elektrischen Doppelschicht an der Phasengrenzfläche zwischen bewegter Elektrolytlösung und dem starren Kapillarsystem des Trägers (25, 52). Zwischen den an der Oberfläche fixierten und den Ionen in der Lösung stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht ein. Diese Ladungsverteilung in der Nähe der Phasengrenze bestimmt den Wert des elektrokinetischen Potentials  $\xi$ .

Während bei der freien Ionophorese wegen der verhältnismäßig kleinen Grenzfläche die Endosmose kaum in Erscheinung tritt, nimmt sie auf feinkapillaren Trägern oft so große Werte an, daß z. B. Ionen mit

sehr kleiner Beweglichkeit scheinbar ihren Wanderungssinn geändert haben. Besonders stark ist die elektroosmotische Strömung im alkalischen Bereich. Die Kapillärwände laden sich nämlich durch Adsorption von Hydroxyl-Ionen negativ auf, und demgemäß überwiegen in der diffusen Schicht die positiven Ladungen, was die Wanderung zur Kathode bedingt.

Durch Änderung des pH-Wertes ebenso wie durch Gegenwart von Fremdionen wird die Größe des  $\xi$ -Potentials stark beeinflusst. Mit der Erhöhung der Ionenstärke nimmt der elektroosmotische Effekt ab. Außer den stoffspezifischen Größen sind die Temperatur und Feldstärke maßgebend.

Allgemein gilt für die elektroosmotische Strömungsgeschwindigkeit  $v$ :

$$v = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \xi}{4 \pi \cdot \eta} . \quad (30)$$

In der Regel lädt sich die Phase mit der höheren Dielektrizitätskonstanten  $\varepsilon$  gegen die andere positiv auf. Wegen der hohen DK des Wassers beobachtet man deshalb in wäßrigen Medien meist eine Flüssigkeitsströmung zur Kathode. Lösungsmittel mit kleiner DK wie Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff u. a. zeigen dagegen fast keine Endosmose. Auch über die Abhängigkeit von verschiedenen Trägermedien liegen Untersuchungen vor (53, 54).

Zur Messung der elektroosmotischen Strömung dienen ungeladene Substanzen, die nach Möglichkeit weder mit dem umgebenden Elektrolyten noch mit der Trägersubstanz in Wechselwirkung treten. Zweckmäßigerweise verwendet man kleine Moleküle, die weniger dem barrier-effect unterliegen. Folgende Substanzen erwiesen sich als brauchbar: Glucose, Dextrin (40),  $H_2O_2$  (55), Trinitrobenzol, o-Nitroanilin (56) und andere organische Verbindungen (46).

Durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen, z. B. durch die sich aus einer Niveaudifferenz der Elektrodenröge ergebende Flüssigkeitsströmung, kann die elektroosmotische Wanderung kompensiert werden (57). Solche Maßnahmen sind jedoch nicht erforderlich, weil die Endosmose die Trennschärfe nicht beeinträchtigt. Für die Messung und Angabe von Ionenbeweglichkeiten muß der Effekt jedoch berücksichtigt werden.

Es gilt:

$$u = \frac{x \pm x_0}{t \cdot E} . \quad (31)$$

Der auf dem Träger beobachtete Wanderungsweg  $x$  ist also um die Strecke  $x_0$ , die die neutrale Indikatorsubstanz zurückgelegt hat, zu korrigieren.

### 2.1.4.3. Sog

Der besonders bei der Ionophorese in feuchten Kammern zu beobachtende Sog ist eine Elektrolytströmung, die sich von den Elektroden-trägern her mit abnehmender Geschwindigkeit in Richtung zur Mitte des Trägers bewegt. Die Soggeschwindigkeit ist an den beiden Träger-enden gleich groß, nimmt zur Mitte hin stetig ab und wird dort gleich Null. Die Sogströmung beruht auf der Wirkung von Kapillarkräften, durch die solange Flüssigkeit angesaugt wird, bis der Träger seine Sättigungsfeuchte erreicht hat. In einer feuchten Kammer ist das nach etwa zwei Stunden der Fall, und die Sogströmung kommt zum Erliegen.

Bei Anlegen einer Potentialdifferenz wird die entstehende *Joulesche* Wärme ganz oder teilweise durch Verdunstung des Lösungsmittels aus dem Elektrolyten aufgenommen. Durch die zur Trägermitte hin gerichtete Sogströmung wird der Feuchtigkeitsverlust ständig ausgeglichen.

Die zu beobachtende Wanderungsgeschwindigkeit  $w'$  ergibt sich als die Summe aus

1. der ionophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit  $w^*$  auf dem Träger,
2. der elektroosmotischen Strömungsgeschwindigkeit  $v$ ,
3. der Sogströmung  $s$ :

$$w' = w^* + v + s. \quad (32)$$

Die beiden ersten Glieder in Gl. (32) sind bei konstanten Versuchsbedingungen und unter Voraussetzung gleichmäßigen Potentialabfalls im Träger ortsunabhängige Größen. Dagegen ist die Sogströmung unterschiedlich in Streifenrichtung.

Unter der Annahme, daß die Soggeschwindigkeit eine Funktion der verdampften Flüssigkeitsmenge ist und diese sich proportional zur aufgenommenen elektrischen Leistung pro Fläche des Trägers verhält, leiteten *Kowalczyk* (58, 59) sowie *Klamberg, Krey* und *Saran* (60) bei der mathematischen Behandlung des Problems Gleichungen ab, die es gestatten, die in feuchten Kammern gemessenen Wanderungsgeschwindigkeiten zu korrigieren und auf die Verhältnisse der freien Ionophorese umzurechnen. Dazu wird außer der Probe eine indifferente Vergleichssubstanz an zwei beliebigen Stellen des Trägers aufgetragen. Auch bei erheblicher Variation der Versuchsbedingungen lassen sich nach Ermittlung eines Korrekturfaktors gut reproduzierbar Ionenbeweglichkeiten berechnen.

Eine starke Sogströmung ist bei dem von *Machebeouf* (61, 62) beschriebenen Verfahren der Elektro-rheophorese erwünscht. Unabhängig von der Startposition wird eine stationäre Ionenverteilung erreicht,

indem sich alle Teilchen an solchen Orten des Streifens anordnen, wo ihre Wanderungsgeschwindigkeit gerade durch die Elektrolytströmung kompensiert wird.

Wie insbesondere *Kowalczyk* (54, 57–59, 63, 64) durch umfangreiche experimentelle Untersuchungen feststellte, ist die Sogströmung bei der Ionophorese in feuchten Kammern die Ursache für eine Anzahl von Störungen und Fehlern. Bei allen Trägern, die ein Zentrum hydrostatischen Gleichgewichtes ( $\pi$ -Zone) aufweisen, also ein Gebiet, in dem die resultierende Strömungsgeschwindigkeit gleich Null ist, führen insbesondere länger dauernde Versuche zu Konzentrationsänderungen in der Elektrolytlösung. Im Bereich der  $\pi$ -Zone findet eine stetige Anreicherung von Salzen statt, und damit verbunden ist die Änderung der Ionenstärke, oft auch des pH-Wertes. Damit einher gehen Anomalien der Feldstärkeverteilung und das Ansteigen des Stromes sowie der Temperatur. Es ist daher zweckmäßig, längerwährende Untersuchungen nicht bei Konstanzhaltung der Spannung, sondern des Stromes auszuführen, um Überhitzung und Durchbrennen der Streifen zu unterbinden (65). Nur bei Fehlen der  $\pi$ -Zone werden örtliche Elektrolytanreicherungen vermieden. Das ist gegeben, wenn die elektroosmotische Strömung gegenüber der Sogströmung überwiegt, was selten der Fall ist, oder wenn durch Niveauunterschiede der Elektrodenröhrer eine hydrostatische Durchflußströmung im Streifen erzeugt wird (57).

Die Sogströmung wird gänzlich ausgeschlossen, wenn man die Ionophorese in geschlossenen Systemen, wie Säulen und Röhren durchführt. Sie läßt sich durch Verwendung abdeckender Platten vermindern. Diese Arbeitsweise hat außerdem den Vorteil, daß wegen der intensiven Kühlmöglichkeit bei wesentlich höheren Strömen und mit Hochspannung gearbeitet werden kann (Kap. 3.2.1.1.).

#### 2.1.4.4. Adsorption und chromatographischer Effekt

Ein weiterer die Ionenbeweglichkeit beeinflussender Faktor beruht auf der chemischen und physikalischen Wechselwirkung der zu trennenden Ionen mit dem Trägermaterial. Adsorptionseffekte erkennt man daran, daß sich ursprünglich kreisförmige Flecken im Laufe der Ionophorese in charakteristischer Weise verändern (66). Je nach Lage der Adsorptionsgleichgewichte wird die effektive Ionenbeweglichkeit um den von einer Substanz adsorbierten Anteil mehr oder weniger stark herabgesetzt. Die Verteilungsgleichgewichte hängen vom Verlauf der Adsorptionsisotherme ab.

Nach dem Auftragen liegt die Substanz auf dem Träger in der Verteilung einer steilen Gaußkurve vor, (Abb. 2a). Vom hochkonzentrierten mittleren Teil der Zone wird ein prozentual kleinerer Anteil der Sub-

stanz adsorbiert, die effektive Beweglichkeit ist deshalb in der Mitte höher als an den Flanken. Im Verlauf der Ionophorese wird die Zone unsymmetrisch (Abb. 2b). Es bildet sich eine scharfe konzentrierte Vorderfront aus, die Rückfront ist schweif- oder kometenförmig. Besonders ausgeprägt ist diese adsorptive Wechselwirkung bei großen organischen Ionen, z.B. beim Methylenblau. Aber auch bei schweren anorganischen Ionen, wie den Hexahalogenokomplexen der Platinelemente ist sie deutlich zu beobachten (19, 20).

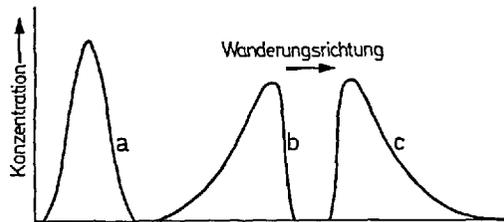


Abb. 2a–c. Konzentrationsprofile bei der Zonenionophorese. a) Zone am Start b) Zone bei Adsorption am Träger c) Zone ohne Adsorption am Träger bzw. in freier Lösung

Bei Fehlen der Adsorption ergibt sich für die wandernde Zone das entgegengesetzte Profil (Abb. 2c). Die an den Flanken der Zone befindlichen Ionen befinden sich in einer Umgebung geringerer Ionenstärke, ihre Beweglichkeit ist deshalb etwas größer. Während die Ionen der Vorderfront mehr und mehr vorseilen, werden zurückbleibende Ionen sofort wieder in die scharfe konzentrierte Rückfront der Zone hineingetragen.

Das Zonenprofil der Abb. 2c beobachtet man bei der Wanderung leichter Ionen wie  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  auf Papier. Bei der trägerfreien Zonenionophorese tritt es auch bei solchen Ionen auf, die auf Trägern wegen der Adsorption das umgekehrte Profil (Abb. 2b) zeigen. Die Schweifbildung erschwert die exakte Angabe von Wanderungsgeschwindigkeiten.

Die durch teilweise Adsorption bedingte Verlangsamung der Ionen, die auch als chromatographischer Effekt bezeichnet wird, verbessert häufig die Trennmöglichkeiten. Während  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  bei der freien Ionophorese etwa gleich schnell wandern, gelingt ihre Trennung auf Papier sehr einfach, weil  $\text{Cu}^{2+}$  stark gebremst wird (67). Aus dem gleichen Grund ist mitunter die Verwendung von Ionenaustauscherpapieren (68, 69) und Elektrolyten, die organische Lösungsmittel enthalten (70), zweckmäßig.

### 3. Trennverfahren

Die klassischen und wichtigsten ionophoretischen Trennverfahren sind die *Methode der wandernden Grenzfläche* und die *Zonenionophorese*. Insbesondere vom letzteren Verfahren sind viele Varianten bekannt, die für bestimmte Trennaufgaben zu hoher Perfektion entwickelt wurden. Neben diesen wichtigsten Verfahren werden kurz die *fokussierende Ionophorese* und Trennungen nach dem Prinzip der *Gegenstromionenwanderung* behandelt.

#### 3.1. Methode der wandernden Grenzfläche

Das Phänomen, daß sich in einem Elektrolyten beim Stromdurchgang Konzentrationsänderungen einstellen und Grenzflächen auftreten können, ist seit langem bekannt (71). Die Wanderung der Grenzfläche zwischen zwei Lösungen, von denen eine farbige Ionen enthält (72–75), wird entsprechend den *Nernstschen* U-Rohrversuchen oft zur Demonstration der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld und zur quantitativen Bestimmung von Ionenbeweglichkeiten benutzt. Zum Zwecke der Ionentrennung ist die Methode der wandernden Grenzfläche zuerst von *Kendall* und in modifizierter Form von *Tiselius* verwendet worden.

##### 3.1.1. Methode nach Kendall

1923, zwei Jahre nach der theoretischen Voraussage *Lindemanns* (17), isotope Ionen sollten wegen ihres Massenunterschiedes geringe Unterschiede in den Ionenbeweglichkeiten aufweisen, unternahm *Kendall* und Mitarbeiter (76–81) den Versuch der Isotopenanreicherung durch Ionenwanderung. Sie verwendeten dazu die klassische Methode der wandernden Grenzfläche, die am Modell einer Anionentrennung erläutert wird:

Ein mit Agar-Agar-Gel zur Strömungsstabilisierung gefülltes Rohr enthält in einem kurzen Abschnitt das Trenngemisch der Anionen  $A_1^-$ ,  $A_2^-$ ,  $A_3^-$  mit den Ionenbeweglichkeiten  $u_1 > u_2 > u_3$  in Form verdünnter Salzlösungen. Das gemeinsame Gegenion ist  $M^+$ . In dem Gelstück vor dem Trenngemisch liegt die Base MOH, dahinter eine Salzlösung mit einem Anion kleiner Beweglichkeit, z. B. das Acetat,  $MAc$ , vor. (Abb. 3a) Der Anodenraum wird mit der konz. Base MOH, der Kathodenraum mit einem Gemisch aus Essigsäure und  $MAc$  gefüllt. Bei Stromdurchgang wandert die Zone des Trenngemisches langsam in Richtung Anode. Die Grenzflächen zu den Bereichen mit  $OH^-$ - und  $Ac^-$ -Ionen bleiben dabei völlig scharf. Gleichzeitig entmischen sich die Ionen  $A_1^- - A_3^-$  und ordnen

sich nach fallender Beweglichkeit an. Bei genügend großen Unterschieden in den Ionenbeweglichkeiten bilden sich scharfe Grenzflächen zwischen den Zonen aus (Abb. 3b).

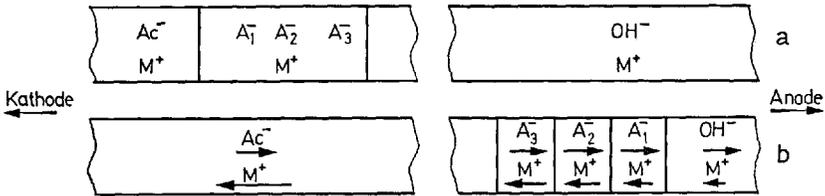


Abb. 3a u. b. Methode der wandernden Grenzfläche, Anionentrennung nach Kendall.  
a) Startsituation, b) Zustand der Trennung

Der Zustand der Trennung ist dadurch charakterisiert, daß alle Zonen und Grenzflächen, d.h. alle Anionen mit gleicher Geschwindigkeit  $v$  in Richtung Anode wandern. Demnach gilt:

$$u_{Ac} \cdot E_{Ac} = u_3 \cdot E_3 = u_2 \cdot E_2 = u_1 \cdot E_1 = v. \quad (33)$$

$E$  ist die Feldstärke in den durch die Indices gekennzeichneten Zonen.

Längs der Trennstrecke herrscht also kein gleichmäßiger Spannungsabfall, sondern die Feldstärke nimmt stufenförmig in Richtung Anode ab. Die Gegenionen  $M^+$  nehmen daher von Zone zu Zone größere Wanderungsgeschwindigkeiten an, wie das die Pfeile in Abb. 3b andeuten.

Der stufenförmige Feldstärkeverlauf bewirkt, daß die Zonen unabhängig von der Zeit und der durchlaufenen Strecke stets scharf bleiben. Ionen größerer Beweglichkeit eilen voraus, bis sie an Orten kleinerer Feldstärke die Geschwindigkeit  $v$  erreichen, Ionen zu kleiner Beweglichkeit hinken nach, bis sie im Bereich ihrer Zone eine ausreichend hohe Feldstärke antreffen, die sie mit der Geschwindigkeit  $v$  wandern läßt. Auf diese Weise kommt es zur Selbststabilisierung der Grenzflächen, und der fokussierende Effekt ermöglicht eine hohe Trennschärfe trotz Störung durch Diffusion und Konvektion.

Hinsichtlich der Konzentrationen der aneinander grenzenden Zonen muß die *Kohlrauschbeziehung* (71) erfüllt sein:

$$\frac{c_i}{T_i} = \text{const} \quad (34)$$

$c_i$  = Konzentration

$T_i$  = Überföhrungszahl der zu trennenden Ionen.

Wie insbesondere durch experimentelle Untersuchungen von *MacInnes* (82–84) und anderen (85–88) bekannt ist, gleichen sich geringe Abweichungen der Konzentrationen automatisch aus.

Obwohl *Kendall* bei dem historisch interessanten Isotopentrennversuch nacheinander Rohrstücke von insgesamt 30 m Länge durchwandern ließ, gelang es ihm damals nicht, einen Wanderungsunterschied zwischen den Chlorisotopen der Massen 35 und 37 festzustellen (76). Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde aber unter Beweis gestellt durch die Trennung der Ionenpaare  $\text{Ba}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{J}^-/\text{Cl}^-$  (78). Auch einige Seltenenerdmetallionen ließen sich zumindest stark anreichern (79).

Diese Methode der wandernden Grenzfläche ist in der Folgezeit für Trennversuche nicht mehr verwendet worden, sie diente im wesentlichen zur Messung von Überführungszahlen (82–90). Erst in jüngster Zeit sind von *Martin* und *Everaerts* (91) in trägerfreien engen Kapillaren eine Anzahl organischer Anionen nach diesem Prinzip getrennt worden. Zur Indizierung der Grenzflächen zwischen den farblosen Zonen erwies sich die Messung des differentiellen und integralen Temperaturverlaufs längs der Trennstrecke als geeignet.

Die Kombination dieser Methode der wandernden Grenzfläche mit dem Gegenstromprinzip führt zum Verfahren der Gegenstromionophorese (Kap. 3.3.2.).

### 3.1.2. Methode nach Tiselius

Bei der von *Tiselius* (92, 93) vorgeschlagenen Methode handelt es sich um ein Verfahren der freien Ionophorese. Man arbeitet ohne einen strömungsstabilisierenden Träger in einem U-förmigen Gefäß, das wegen der Verschiebbarkeit des mittleren Teils sehr scharfe Grenzen zwischen verschiedenen Lösungen herzustellen erlaubt. Das Trenngemisch wird in den unteren Teil des U-Rohres eingebracht und dann mit einer Pufferlösung überschichtet (Abb. 4a). Um die Grenzflächen scharf zu erhalten, müssen Konvektionsströmungen unterbunden werden. Die Trennlösung muß daher spezifisch schwerer sein als die überstehende Pufferlösung. Thermokonvektion läßt sich bei freier Ionophorese gut ausschalten, wenn die Apparatur bei  $+4^\circ\text{C}$ , dem Dichtemaximum des Wassers, betrieben wird. Die aneinander grenzenden Lösungen müssen etwa die gleiche Leitfähigkeit besitzen. Große Teilchen kleiner Beweglichkeit, wie Kolloide, große organische Ionen, Proteine und Enzyme werden deshalb in der Lösung eines Grund- oder Leitelektrolyten, meist ein Puffergemisch, eingesetzt.

Beim Stromdurchgang tritt in Richtung der Wanderung der Ionen eine Verschiebung der Grenzflächen zwischen Trenn- und Pufferlösung

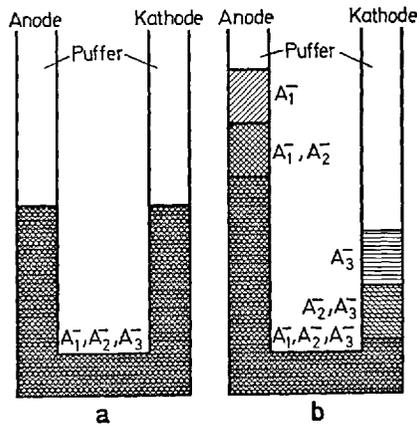


Abb. 4 a u. b. Methode der wandernden Grenzfläche. Anionentrennung nach *Tiselius*. a) Startsituation, b) Trennung

auf, und bei Gegenwart mehrerer unterschiedlich schnell wandernder Teilchen bilden sich innerhalb des Trenngemisches neue Grenzflächen aus (Abb. 4b). Während bei farbigen Ionen die Bildung und Wanderung der Grenzflächen direkt beobachtbar ist, lassen sich diese bei farblosen Verbindungen z.B. nach der *Töplerschen* Schlierenmethode (94, 95, 1), die die unterschiedliche Refraktion der verschiedenen dichten aneinander grenzenden Lösungen ausnutzt, sichtbar machen.

Die Stabilisierung der Grenzflächen beruht darauf, daß sich in den beiden Schenkeln des U-Rohrs stets spezifisch leichtere über dichteren Lösungen befinden. Solange diese Bedingung erfüllt ist und Erschütterungen vermieden werden, bleiben die Grenzflächen scharf, und nur bei langem Betrieb tritt eine gewisse Verschmierung durch Diffusion ein.

Im Gegensatz zum Verfahren von *Kendall* ist wegen des Vorhandenseins eines Grundelektrolyten nicht nur eine Entmischung der Komponenten möglich, sondern diese können theoretisch wie bei der Zonenionophorese (vgl. Kap. 3.2.) auch räumlich auseinanderwandern, da der Stromtransport im wesentlichen von dem Leitelektrolyten übernommen wird. In der Praxis wird jedoch die vollkommene Trennung nicht erreicht, weil zwangsläufig das Prinzip der zunehmenden Dichte der Lösungen von oben nach unten durchbrochen wird, wenn zwischen zwei wandernden Komponenten ein Gebiet reiner Pufferlösung entsteht. Durch Konvektion der Lösung kommt es dann zur Rückvermischung. Nur die am schnellsten bzw. am langsamsten wandernden Teilchen bilden an der Vorder- bzw. Rückfront ein schmales Gebiet ihrer reinen Lösungen und können so isoliert werden. Alle anderen Komponenten überlappen ein-

ander stark. Die Methode ist demnach weniger für Trennungen als für den qualitativen Nachweis der Zahl der Komponenten in einem Gemisch geeignet.

Die erstmals von *Tiselius* vorgeschlagene Versuchsanordnung ist vielfach erprobt und verbessert worden (96–98), jedoch blieb stets die U-förmige Trennzelle erhalten. Durch sinnreiche Kompensationseinrichtungen ließ sich zwar die Trennleistung verbessern, jedoch nur bei gleichzeitiger Vergrößerung des apparativen Aufwandes (99). Im wesentlichen dient die Methode zum Studium der Wanderung hochmolekularer organischer Stoffe bzw. zur Messung von ionophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten in bestimmten Puffersystemen. Dazu liegen zusammenfassende Arbeiten von *Longsworth* (1, 100–102) und *Dole* (103) vor. *Blasius* und *Bilal* (104) gelang mit dieser Methode die teilweise Trennung von stereoisomeren Kobaltkomplexen.

### 3.2. Zonenionophorese

Die bei der freien Ionophorese störenden und kaum vermeidlichen Konvektionsströmungen des Elektrolyten lassen sich durch die Anwendung poröser Trägermedien bzw. genügend feiner Kapillaren weitgehend ausschalten. So stabilisierte Elektrolytsysteme bilden die Grundlage der Zonenionophorese.

Auf den mit einem Grund- oder Leitelektrolyten (es muß sich nicht immer um ein Puffergemisch handeln) getränkten Träger wird das Trenngemisch der Ionen  $A_1^-$ ,  $A_2^-$ ,  $A_3^-$  als schmale Zone aufgetragen, (Abb. 5a). Die Leitfähigkeit der Analysenlösung sollte möglichst kleiner, höchstens aber gleich groß wie die des Grundelektrolyten sein. Bei Anlegen einer Spannung tritt wie im U-Rohr bei der *Tiselius*-Methode (Kap. 3.1.2.) die Entmischung der Komponenten entsprechend ihren Beweglichkeitsunterschieden ein (Abb. 5b). Die Ionophorese kann hier jedoch solange fort-

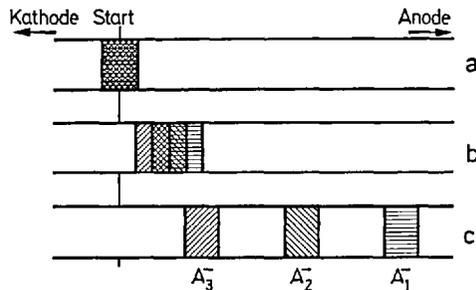


Abb. 5a–c. Zonenionophorese (schematisch). a) Zeitpunkt Null, b) kurze Trennzeit, c) längere Trennzeit

gesetzt werden, bis die Zonen vollkommen auseinandergerückt sind und durch „leere Bereiche“, in denen nur Grundelektrolyt vorliegt, getrennt sind (Abb. 5c).

Je schmaler der Bereich des Trenngemisches am Start ist, um so geringer ist der für die vollständige Trennung benötigte Wanderungsweg. Allerdings ergibt sich durch Diffusion eine gewisse Zonenverbreiterung. Sie ist proportional der Wurzel der Zeit (24) und um so geringer je schwerer die zu trennenden Ionen sind. Entsprechend ihrer großen Verbreiterung gibt es über die Zonenionophorese eine große Zahl guter Monographien (1–6) und Übersichtsarbeiten (105, 106). Das Schwergewicht liegt jedoch im allgemeinen bei Trennungen und Untersuchungen hochmolekularer Stoffe, wie Proteine und Enzyme sowie bei der biochemischen bzw. klinischen Anwendung (4, 107). Im folgenden werden deshalb die diskontinuierlichen und kontinuierlichen Verfahren im Hinblick auf Trennungen kleiner anorganischer Ionen behandelt.

### 3.2.1. Diskontinuierliche Zonenionophorese

Die diskontinuierliche Zonenionophorese dient in erster Linie zum qualitativ-analytischen Nachweis, seltener zur quantitativen Bestimmung von Ionen in Mehrkomponentengemischen. Mitunter wird die mikropräparative Isolierung einzelner Substanzen durch Elution ihrer Zonen vom Trägermaterial erreicht.

Die wichtigsten Apparaturen, Arbeitstechniken, Trennungen und ihre Auswertung werden im folgenden besprochen.

#### 3.2.1.1. Apparaturen und Arbeitstechnik

Der apparative Aufwand wächst mit dem Schwierigkeitsgrad der Trennungen. Bei Ionen mit großem Beweglichkeitsunterschied arbeitet man im Niederspannungsbereich (bis 20 V/cm), Trennungen chemisch sehr ähnlicher Ionen setzen die Hochspannungstechnik voraus (über 20 V/cm, bis mehrere 100 V/cm).

#### *Niederspannungsignophorese*

Die Niederspannungsignophorese ist durch das Arbeiten in einer feuchten Kammer gekennzeichnet (108–110) (vgl. Kap. 2.1.4.3.). Ein mit Leitelektrolyt getränkter Papierstreifen wird in einem verschließbaren Trog frei hängend zwischen den Elektroden aufgespannt. Ähnlich wie in einem Chromatographiegefäß stellt sich zwischen dem Streifen und seiner Umgebung ein Feuchtigkeitsgleichgewicht ein. Je nach Wanderungssinn der zu trennenden Ionen wird das Analysengemisch in der Mitte oder an

einem Ende des Streifens als schmale Zone aufgetragen. Wegen der geringen Feldstärke und der im allgemeinen verwendeten schwachen Pufferlösungen als Leitelektrolyt ist die entstehende *Joulesche* Wärme nur gering. Sie wird durch teilweise Verdunstung des Lösungsmittels abgeführt.

In den Anfängen der Zonenionophorese benutzte *Durum* (111–113) eine Anordnung, bei der mehrere feuchte Papierstreifen in Dachform über einem Steg aus Plexiglas nebeneinander hingen, so daß mehrere Versuche parallel zu einander ablaufen können. Bei einer von *Graßmann* und *Hannig* (114) entwickelten und weit verbreiteten Apparatur hängen die feuchten Streifen waagrecht zwischen den Elektrodenröhen, welche in mehrere Segmente unterteilt sind, um Elektrolyseprodukte von den Ionophoresestreifen fernzuhalten. Wegen ihrer geringen Kosten werden derartige Apparaturen noch vielfach für klinische Routineuntersuchungen sowie zur Demonstration der Wanderung farbiger Ionen im elektrischen Feld verwendet. Für schwierigere Trennungen besitzen sie keine Bedeutung.

#### *Hochspannungsignophorese*

Je höher die bei der Ionophorese verwendeten Feldstärken liegen, um so mehr verkürzt sich die Trenndauer, Gl. (4). Zeitabhängige Störungen wie Zonenverbreiterung durch Diffusion und Zerfall unbeständiger Substanzen werden deshalb bei der Hochspannungsignophorese weitgehend ausgeschaltet. Wegen der mit der Feldstärke quadratisch ansteigenden Wärmeentwicklung sind die Grenzen der Spannungssteigerung durch die Beherrschung des Kühlproblems gesetzt. Die Herabsetzung der Stromstärke durch Erniedrigung der Elektrolytkonzentration kommt nur für sehr dünne Analysenlösungen (115) und bei der Trennung trägerfreier Radionuklide in Betracht.

Die ersten Versuche, den elektrolytgetränkten Streifen direkt durch ein inertes mit Wasser nicht mischbares organisches Lösungsmittel zu kühlen, gehen auf *Cremer* und *Tiselius* (116) zurück. *Michl* (117) arbeitete nach Einhängen der Ionophoresestreifen in ein Toluolbad bereits bei Feldstärken bis zu 50 V/cm und erzielte scharfe Trennungen. Die Technik der flüssigen Kühlmittel (15, 118–121) schließt die Gefahr ein, daß gewisse Substanzen herausgelöst werden.

*Werner* und *Westphal* (122) entwickelten eine Apparatur, bei der die Elektrophoresestreifen in einer flachen feuchten Kammer auf einer von Kühlsole durchflossenen Kunststoffplatte liegen. *Wieland* und *Pfleiderer* (123, 124) wählten wegen der besseren Wärmeleitfähigkeit eine von unten gekühlte Glasplatte als Unterlage für sehr breite Ionophoresestreifen, die auch durch Stärkegel- oder Cellulosepulverschichten ersetzt

werden können (125). Wie stets beim Arbeiten in feuchten Kammern, sind trotz Kühlung bei beiden Verfahren gewisse Sogströmungen nicht auszuschließen.

In der Hochspannungstechnik setzt sich deshalb die „Sandwich-Technik“, die zuerst von *Michl* (126) und *Gross* (127, 128) vorgeschlagen wurde, durch. Der Papierstreifen wird dabei zwischen zwei gekühlte Glasplatten gelegt, die mit gleichmäßigem Druck aneinander gepreßt werden. Die zweiseitige Kühlung ist sehr wirksam, Verdunstungseffekte und dadurch bedingte Sogströmungen sind ausgeschaltet. Die Glasplatten selbst werden von wasserdurchströmten Kupferblöcken gekühlt. Bei ähnlichen Versuchsanordnungen werden kunststoffbeschichtete Metallplatten (126, 129–131), durch die Kühlsole fließt, verwendet. Die Kunststoffolie beeinträchtigt allerdings den Wärmedurchgang und besitzt nur geringe mechanische Festigkeit. Kleinste Beschädigungen führen zu Kurzschlüssen. Größere Sicherheit bieten die wesentlich stabileren gekammerten Glasplatten (132). Sie ermöglichen die intensive Kühlung der Ionophoresestreifen und besitzen gleichzeitig gute Isolatoreigenschaften. Zur Gewährleistung des gleichmäßigen Andrucks der Streifen kann die obere Kühlplatte als Trog ausgebildet werden, in dem sich Kühlflüssigkeit befindet, die an allen Stellen den gleichen hydrostatischen Druck ausübt (60, 133).

### 3.2.1.2. Trägermedien und Leitelektrolyte

Gegenüber der weitaus am häufigsten verwendeten Trägersubstanz Papier (4, 6, 134a–c) bieten in besonderen Fällen folgende Medien Vorteile: Zelluloseacetatfolien (135–139), Agar-Agar-Schichten (5, 140–143), Polyacrylamidgel (144–146), Stärkegel (147–148).

Inbesondere die Technik der Dünnschicht- (54, 149–155) und Säulenionophorese (3, 156, 157) erlaubt die Verwendung der verschiedenartigsten Trägermaterialien (68, 69, 158–163). Viele der genannten Folien und Gele sind in der Struktur außerordentlich homogen und zeigen gegenüber kleinen Ionen kaum Adsorption. Sie eignen sich deshalb vorzüglich zur Trennung chemisch sehr ähnlicher Ionen (139). Für die Ionophorese in aggressiven Medien, wie starken Säuren oder Basen, in Gegenwart starker Oxydationsmittel und bei hohen Temperaturen, z. B. in geschmolzenen Salzen (164–168) wird Glasfaserpapier verwendet. Die grobfaserige Struktur und die starke osmotische Strömung bewirken jedoch eine starke Zonenverbreiterung.

Bei der Ionophorese spielt die richtige Auswahl des geeigneten Leitelektrolyten eine wichtige Rolle. Das gilt insbesondere, wenn durch pH-abhängige Gleichgewichte, z. B. bei Ampholyten oder durch Komplexbildungsreaktionen Änderungen der Ionenbeweglichkeit oder gar des

Wanderungssinns eintreten (vgl. Kap. 2.1.3.2.). Oft werden durch die richtige Auswahl des Grundelektrolyten schwierige Trennungen erst ermöglicht, z. B. bei den Seltenen Erden (34, 135, 139, 169, 170).

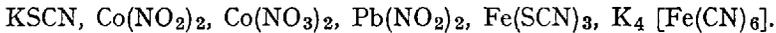
Im allgemeinen verwendet man Puffergemische hoher Kapazität, die einen bestimmten eingestellten pH-Wert stabilisieren, so daß sich die Ionen der Analysenlösung stets in der gleichen Umgebung befinden. Um das auch zu Beginn der Ionophorese zu gewährleisten, darf die Trennung im Verhältnis zum Grundelektrolyten nicht zu konzentriert sein, da sich sonst an der Auftragungsstelle wegen erhöhter Leitfähigkeit eine kleinere Feldstärke einstellt und eine Verbreiterung der Zone auftritt. Sehr vorteilhaft sind, insbesondere beim Arbeiten in feuchter Kammer, Pufferlösungen, die mit Wasser etwa gleichmäßig verdampfen, weil dann in der  $\pi$ -Zone Pufferanreicherungen vermieden werden, z. B. Pyridinacetat und Äthylendiamin-Essigsäure-Mischungen. Aber auch andere flüchtige Grundelektrolyten wie Ameisensäure-Essigsäure-Mischungen, Pyridinium-Ammonium-, Trimethylammonium-Formiate bzw. Acetate sind vorteilhaft bei der mikropräparativen Substanzgewinnung durch Elution der einzelnen Zonen. Für die Trennung vieler anorganischer Ionen spielen Chelatbildner wie Amino- und Hydroxy-polycarbonsäuren eine wichtige Rolle. Für den speziellen Fall muß stets geprüft werden, welches von den vielen vorgeschlagenen Puffergemischen (2, 4) die besten Trennungen ermöglicht. Nur bei weitgehend inerten Ionen, z. B. Alkali-Ionen, bei kinetisch stabilen Komplexen und Mineralsäureanionen, sind fast alle Grundelektrolyte anwendbar, da die Beweglichkeit praktisch nur von der Ionenstärke, nicht aber von der Ionenart abhängig ist.

### 3.2.1.3. Auswertung von Ionopherogrammen

Für den Nachweis der durch Ionophorese getrennten Substanzen sind grundsätzlich die gleichen Methoden und Verfahren wie bei der Papier- und Dünnschichtchromatographie geeignet. Rein visuell kann während des Versuches nur die Entmischung farbiger Substanzen verfolgt werden. Viele andere Ionen absorbieren kurzwelliges Licht und können daher unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden. In den meisten Fällen müssen jedoch zum qualitativen Nachweis besondere auf chemischen Umsetzungen beruhende Anfärbemethoden angewendet werden. Dazu wird das mit Warmluft getrocknete Pherogramm mit einer geeigneten Reagenzlösung besprüht oder in einer feuchten Kammer der Einwirkung gasförmiger Chemikalien ausgesetzt. Für Aminosäuren, organische Ionen und Inhaltsstoffe von Seren sind eine große Anzahl teils spezifischer Entwicklungsreagentien bekannt (4, 107).

Für anorganische Ionen eignen sich vor allem die in der qualitativen Analyse verwendeten Reagentien, die Farbreaktionen verursachen. Bei

der Behandlung mit  $\text{H}_2\text{S}$  geben Mn, Mo und Bi braune, Pb, Cu, Fe, Co, Ni, Hg und Ag schwarze, Cd, As und Sb gelbe bzw. orange Zonen. Besonders Schwermetallionen bilden charakteristisch gefärbte Komplexe mit organischen Chelatbildnern wie 8-Hydroxychinolin, Dithizon, Rubanwasserstoffsäure, Alizarin, Chinalizarin, Natriumrhodizonat, Diacetyldioxim u. a. Zur Komplex- oder Salzbildung eignen sich auch:



Geeignete Oxydationsmittel sind  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{NaOBr}$ ,  $\text{Cl}_2$ -Dämpfe.

Als Reduktionsmittel dienen  $\text{SO}_2$ -Dämpfe und salzsaure  $\text{SnCl}_2$ -Lösungen. Durch die Anwendung dieser Entwicklungsmittel in bestimmten Mischungen und in einer sinnvollen Reihenfolge lassen sich für viele Ionen die Nachweise spezifisch gestalten (171, 172).

Radioaktive Ionen lassen sich durch Autoradiographie oder durch Ausmessen der Pherogramme mit einem Radiopapierchromatographen (16, 135, 169) sowohl qualitativ wie auch quantitativ sehr genau bestimmen.

Die größte Bedeutung für quantitative Bestimmungen besitzen photometrische Messungen. Nach geeigneter Anfärbung der Zonen, zweckmäßig parallel zu Vergleichsproben bekannten Gehalts, werden entweder in Remission bzw. nach Transparentierung (138, 173) der Streifen in Adsorption die Zonen photometrisch ausgemessen (143, 174–177). Auch Bestimmungen der Substanzflecken auf dem Papier oder nach Elution sind bekannt.

### 3.2.1.4. Trennungen anorganischer Ionen

Seit den Anfängen der Ionophorese wurden auch Trennungen anorganischer Ionen durchgeführt. Annähernd alle Elemente sind hinsichtlich ihrer ionophoretischen Trennbarkeit untersucht worden. Im folgenden wird hauptsächlich über neuere und verbesserte Trennungen berichtet.

#### *Alkalielemente*

Die Beweglichkeit der Alkaliionen wird durch die meisten Elektrolyten nur wenig beeinflusst. Die Trennung von Li, Na, K ist daher in allen Medien gut durchführbar. Die erste qualitative und quantitative Bestimmung dieser Ionen gelang in Ammoniumcarbonatlösung (178). Bei einer Feldstärke von 140 V/cm beträgt der Zeitbedarf nur 5 Minuten (179, 180). Schwierig ist die Trennung der sehr ähnlichen Ionen  $\text{Rb}^+$  und  $\text{Cs}^+$  (43, 172, 179, 181, 182). Sie gelingt durch Hochspannung-ionophorese bei Zulassung langer Wanderungsstrecken (179), wenn der Grundelek-

trolyt  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -Ionen enthält (183) oder der Träger mit Salzen von Heteropolysäuren imprägniert ist (153). In den letztgenannten Fällen vergrößern sich wegen der unterschiedlichen Assoziationstendenz die Beweglichkeitsunterschiede der Ionen. Auch in einer Anzahl organischer Lösungsmittel ist die Trennung der Alkalienelemente studiert worden (184). In einigen Fällen ändert sich gegenüber wäßrigen Elektrolyten die Reihenfolge der Ionen auf dem Pherogramm. Gute Trennungen werden in Nitromethan und Trichloressigsäure erzielt.

### *Erdalkalielemente*

Während in starken Mineralsäuren alle Erdalkalitionen stets kathodisch wandern (185), bilden sich in schwach sauren oder basischen Lösungen, die Hydroxy- oder Aminopolycarbonatsäureionen enthalten, unterschiedlich stabile Komplexe (181). Ihre Trennung gelingt sehr gut in 0,05 m Zitronensäure, die mit Ammoniak auf pH 5,5 eingestellt ist (172, 179).

### *Metallkationen*

Zur analytischen Klassifizierung sind fast alle Metallkationen, häufig entsprechend den Gruppen des analytischen Trennungsganges in einer großen Zahl verschiedener Elektrolytlösungen untersucht worden. Nur in wenigen Fällen wird bewußt auf die Beeinflussung der Ionenbeweglichkeiten durch den Grundelektrolyten verzichtet (43). Den meisten Arbeiten ist zu entnehmen, daß gezielte Komplexbildung der Ionen mit geeigneten Grundelektrolyten die Trennungen im allgemeinen erheblich verbessern, oft überhaupt erst ermöglichen.

Besonders *Jokl* (22, 23, 34, 170) und *Pučar* (35–37) haben sich wiederholt mit dem grundsätzlichen Problem der Auffindung der besten Trennbedingungen für ähnliche Ionengruppen befaßt (vgl. Kap. 2132). Unter Ausnutzung chemischer Gleichgewichte läßt sich die effektive Ionenbeweglichkeit in Abhängigkeit von der Art, Konzentration und dem pH-Wert der Grundlösung in gerichteter Weise beeinflussen.

*Majumdar* und *Singh* haben systematisch die Ionen der Salzsäure-Gruppe (186), Schwefelwasserstoff-Gruppe (187), Urotropin-Gruppe (188) und Ammoniumsulfid-Gruppe (189) papierionophoretisch in Gegenwart von etwa 30 verschiedenen Grundelektrolyten untersucht und jeweils die Reihenfolge der Wanderung der Ionen festgestellt. In nicht zur Komplexbildung neigenden Mineralsäuren wie  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  und deren Ammoniumsalzen werden nur Kationen gefunden. In Salzsäure,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -,  $\text{KCl}$ - und  $\text{NaCl}$ -Lösungen wandert  $\text{Hg}$  infolge von Chlorokomplexbildung zur Anode. Bei Gegenwart von Citrat, Oxalat, Tartrat, Äthylendiammin-tetraessigsäure,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$  und  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  entstehen insbesondere mit vielen Schwermetallkationen anionische Komplexe.

Die Reihenfolge der Ionenwanderung ist in Abhängigkeit vom Komplexbildner und dem pH-Wert der Lösung oft sehr verschieden.

Von den rein anorganischen komplexbildenden Ionen sind besonders häufig die Halogenide und Pseudohalogenide verwendet worden.

*Lederer* (190) erzielte in 0,5 n HCl, *Pučar* (37) in HBr- bzw. KBr-Lösungen gute Trennungen der Elemente Cu, Pb, Cd, Hg und Bi. Zur Trennung von Co, Ni, Fe eignen sich alkoholische KSCN-Lösungen. In Abhängigkeit der SCN<sup>-</sup>-Konzentration ist die Komplexbildung mit Fe<sup>3+</sup> studiert worden (191). In Halogenidlösung wurden bleiorganische Verbindungen (192) und eine Anzahl verschiedener Ionengruppen (171, 193–194), teils unter Zugabe organischer Lösungsmittel getrennt (195, 197). In Sulfatlösungen verhalten sich die Beweglichkeiten einiger Ionen umgekehrt wie ihre Ladungszahlen (198). Die Wanderungsgeschwindigkeit des Hg<sup>2+</sup> wird stark durch die Konzentration des Grundelektrolyten, HNO<sub>3</sub>, beeinflußt (199). Für die Abtrennung von Goldionen aus einer kolloidalen Goldlösung eignet sich ein thiosulfathaltiger Leitelektrolyt (200).

Eine weit größere Bedeutung und Anwendungsbreite besitzen organische Komplexbildner. In Gegenwart verschiedener mehrbasiger organischer Säuren sind die Trennmöglichkeiten für Ga und In studiert worden (201). Für eine große Zahl Schwermetallionen ist für Leitelektrolyte mit Citrat, Tartrat, Oxalat, Oxin u. a. die Reihenfolge der Wanderung festgelegt worden (172, 202–205). Besonderes Interesse verdienen die Trennungen mit Hilfe von Aminopolycarbonsäuren und Hydroxyaminosäuren. Fast alle anorganischen Metallionen sind hinsichtlich der Konzentrations- und pH-Abhängigkeit ihrer Wanderungsgeschwindigkeit untersucht worden (28, 152). *Jokl* (170) hat die Beweglichkeitskurven von 64 anorganischen Ionen in N-2-Hydroxyäthyliminodiessigsäure bestimmt und interessante Trennmöglichkeiten aufgezeigt.

Die Trennung der Gruppe der Platinelemente ist in den verschiedensten Medien versucht worden (206). Die mikrochemische Bestimmung nach der ionophoretischen Trennung wurde mehrfach beschrieben (207, 208). Bei den meisten Trennungen stören die trägen Gleichgewichte zwischen verschiedenen Hydrolyseprodukten eines Elementes, die einen Multispoteffekt verursachen (19, 132, 209).

### *Lathaniden, Actiniden, Spaltprodukte*

Die Gruppe der Seltenen Erden besteht aus 14 chemisch sehr ähnlichen Elementen, deren freie Ionen sich nur sehr geringfügig in ihren Beweglichkeiten unterscheiden. Erst die Bildung unterschiedlich stabiler Komplexe ermöglicht ionophoretische Trennungen. Da die Seltenen Erden zu den oxophilen Kationen zählen, sind vor allem Hydroxycarbon-

säuren wie Milch- und Weinsäure (210, 211) als Komplexbildner verwendet worden. Es lassen sich jedoch damit nicht alle Seltenenerdionen einwandfrei trennen, die Entmischung nachbarständiger Elemente bleibt unvollständig. Das gilt auch für die Anwendung von Glykolsäure (212).

Jokl (34, 172) bestimmte die Beweglichkeitskurven der Seltenen Erden in Gegenwart von N-2-Hydroxyäthylimino-diessigsäure sowie die Zusammensetzung und Stabilität der Chelatkomplexe. Während die Trennung der leichteren Seltenen Erden einwandfrei möglich ist, gelingt die Trennung der Elemente Dy/Ho und Tm/Yb/Lu nicht. Aizetmüller u. a. (135, 139) erzielten bei Verwendung von 0,3 m  $\alpha$ -Hydroxyisobuttersäure als Grundelektrolyt auf Celluloseacetat-Streifen bei Feldstärken zwischen 130 und 170 V/cm in etwa 20 min. die vollständige Trennung aller Lanthaniden. Auch Bächmann (171, 213) gelang es, alle Lanthaniden in 0,7 m  $\alpha$ -Hydroxyisobuttersäure-Lösung zu trennen. Der Zeitbedarf bei der Feldstärke von 90 V/cm beträgt jedoch bis zu 2 Std. Mit Hilfe der Dünnschichthochspannungssionophorese ergeben sich die gleichen Ergebnisse (150). Allerdings ist trotz größerer eingesetzter Mengen die Trennschärfe besser. Für die Trennung der Aktiniden, insbesondere des sehr ähnlichen Paares Am/Cm erwies sich 2,0 m  $\alpha$ -Hydroxyisobuttersäure, mit  $\text{NH}_3$  auf pH 2,1 eingestellt, als am geeignetsten. Kraak und Waals (214) berichten über die Trennung von Am/Cm in Äthylendiammin-tetraessigsäurelösung, die 0,1 m an Glycin war und mit  $\text{HClO}_4$  auf pH 1,6 eingestellt wurde. Auch in Zitronen- und Weinsäure wurde das Komplexverhalten einiger Transurane in Abhängigkeit vom pH-Wert studiert (215, 216). Th, Pa und U bilden Oxalatokomplexe mit stark zunehmenden Wanderungsgeschwindigkeiten (217).

Die Hochspannungspapierionophorese hat sich besonders zur schnellen Abtrennung radioaktiver Spaltprodukte und trägerfreier Nuklide, wie sie z. B. bei der Szilard-Chalmers-Reaktion entstehen, vielfach bewährt (218–224). In einigen Fällen erwiesen sich konz. Mineralsäuren als Leitelektrolyten zur Trennung von Actiniden und Transuranen als geeignet (225–228).

### *Kinetisch stabile Komplexe*

Wie Untersuchungen von Ligandenaustauschreaktionen an einer großen Zahl von Halogenokomplexen verschiedener Platinelemente ergaben, sind diese bis zu Temperaturen von etwa 30° C kinetisch weitgehend stabil (229–232). Erst bei höheren Temperaturen erfolgt eine schnelle Umwandlung der verschiedenen im Gleichgewicht mit einander stehenden Komplexarten. Unter den Bedingungen der Ionophorese (Kühlung auf 0° C) gelingt daher die Trennung der in Lösung nebeneinander vorliegenden Spezies.

*Lederer* (233), *Shukla* u. a. fanden bei ihren Untersuchungen über Rh (III) in Perchlorsäure (234), Salzsäure (235), Sulfat- (236) und Oxalatlösungen (237) fast immer mehrere, teils anionisch, teils kationisch wandernde verschiedenfarbige Zonen. Während in schwach salzsauren Lösungen Chloroaquokomplexe beständig sind, treten in konz. HCl vermutlich di- und trimere Formen auf (235). Bei der Alterung des  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_5]^{2-}$  in 0,1 n HCl stellte *Shukla* (238, 239) durch Ionophorese sukzessiven Austausch der Cl-Liganden gegen Wasser bis zur Bildung des Hexaquokomplexes fest. Der Nachweis und die quantitative Bestimmung der Platinelemente nebeneinander wird durch das Auftreten mehrerer Zonen eines Elementes (Multispoteffekt) sehr erschwert (209).

*Blasius* und *Preetz* (19, 132, 240) untersuchten systematisch durch Hochspannungspapierionophorese die Hydrolyse von Pt(IV), Ir(IV), Ir(III) und Rh(III) in Abhängigkeit von der freien Chloridionenkonzentration. Auf Grund der Wanderungstrecken ließen sich den Zonen eindeutig Chloroaquokomplexe zuordnen. Entsprechende Untersuchungen sind kürzlich mit radioaktiv markierten Iridiumkomplexen durchgeführt worden (232a).

Die in Gemischen aus HCl und HBr entstehenden chemisch sehr ähnlichen Gemischtligandkomplexionen des Typs  $[\text{MCl}_x\text{Br}_{6-x}]^{2-}$  ( $M = \text{Ir}, \text{Os}, \text{Pt}, \text{Re}; x = 0, 1, \dots, 6$ ) ließen sich bei Feldstärken von 75 V/cm innerhalb von 1½ Stunden einwandfrei trennen. (19, 20, 240, 241) Wegen der intensiven und unterschiedlichen Farbe dieser Ionen läßt sich der Trennvorgang gut beobachten. Beim Os (IV) gelang auch der Nachweis einiger Glieder der Reihen  $[\text{OsCl}_x\text{J}_{6-x}]^{2-}$  und  $[\text{OsBr}_x\text{J}_{6-x}]^{2-}$ , die größere Beweglichkeitsunterschiede aufweisen. Während bei einigen Kobaltkomplexen die Trennung der cis-trans-Isomeren durch Hochspannungspapierionophorese gelang (104), ist das bei den entsprechenden Gemischtligandkomplexen der Platinelemente ( $x = 2, 3, 4$ ) nicht möglich. Erst durch stereospezifische Reaktionsführung beim Ligandaustausch entstehen Lösungsgemische, die entweder nur die cis- oder die trans-Formen enthalten. Für Os (IV) und Ir (IV) ließen sich daraus die reinen stereoisomeren Chlorobromo-Komplexe isolieren (242, 243). Viele der erwähnten Gemischtligandkomplexe wurden in mikropräparativen Mengen durch Elution der Zonen erstmals dargestellt und physikalisch und chemisch näher charakterisiert.

*Müller* (244–247) stellte die Bildung von Chlorobromo-Komplexen des Rheniums aus Mischkristallen von  $\text{K}_2[\text{ReBr}_6]$  und  $\text{K}_2[\text{SnCl}_6]$  als Folge von  $(n, \gamma)$ -Reaktionen fest. Er bestimmte die Zonen nach der ionophoretischen Trennung radiometrisch.

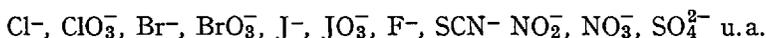
Bei der Behandlung von Osmiumammin-Komplexen mit konz. HBr entstehen über eine große Zahl unbekannter, teils anodisch, teils kathodisch wandernder Zwischenprodukte, zwei sehr stabile mehrkernige

Bromoamido-Komplexe des Os (IV) (248). Bei der Reaktion von  $\text{RuO}_4$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{HClO}_4$  — bzw.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  — saurer Lösung bilden sich mehrere stabile Zwischenprodukte (249).

Die Ionophorese liefert auf dem Gebiet der kinetisch inerten und chemisch sehr ähnlichen Komplexionen die besten Trennergebnisse. Oft genügt ein Handversuch, um zu zeigen, wie viele verschiedene Teilchen in einer homogen erscheinenden Lösung enthalten sind.

### Anorganische Anionen

Für die papierionophoretische Trennung vieler anorganischer Anionen eignen sich Ammonium- oder Natriumcarbonat-Lösungen (250–252). Allerdings ändern sich die Werte der Wanderungsgeschwindigkeiten so beständiger Ionen wie



relativ zueinander kaum, wenn Natron- oder Kalilauge als Grundelektrolyt verwendet wird (253). Trotz der verschiedenen Ladungen zwischen den Ionen  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  und  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  sind die Unterschiede in den Wanderungsgeschwindigkeiten nur gering (250). Unter den Bedingungen der Hochspannung-ionophorese ergeben sich aber für viele Ionengemische sehr gute Trennmöglichkeiten. Zur Festlegung der relativen Wanderungsgeschwindigkeiten sind oft  $\text{CrO}_4^{2-}$  oder  $\text{Cl}^-$  als Bezugsionen gewählt worden (251, 252, 254).

*Sansoni* und *Klement* (255, 256) gelang in einem Boratpuffer vom pH 10 die Trennung von Ortho-, Di-, Tri-, Tetra-, Poly-, Trimeta-, Tetrameta- und Polymetaphosphationen. Auch Phosphit, Hypophosphit und Hypodiphosphit sind trennbar (257). Die Abhängigkeit vom pH-Wert wurde mit radioaktiven Phosphorverbindungen in einem phosphathaltigen Grundelektrolyten studiert (258).

In Puffern verschiedenen pH-Wertes konnten *Blasius* und Mitarbeiter (16, 259, 260) beim Studium der Wackenroderschen Reaktion und der Hydrolyse des  $\text{N}_4\text{S}_4$  eine Anzahl Polythionate, Sulfit, Sulfat und Sulfid von einander trennen. Auch eine Anzahl Selenopolythionate (254) wurden papierionophoretisch nachgewiesen. Über die Trennung von radioaktiv markiertem Jodid, Jodat und Perjodat liegen Untersuchungen von verschiedenen Seiten vor (151, 260b–d).

### 3.2.2. Kontinuierliche Verfahren

Bei den Verfahren der kontinuierlichen Ionophorese, die vorwiegend für präparative Problemstellungen herangezogen werden, wird der Wanderung der geladenen Teilchen im elektrischen Feld eine rechtwinklig

dazu wirkende Elektrolytströmung überlagert. Die Bahn der Ionen ergibt sich als Resultierende dieser beiden Bewegungen.

An einer engbegrenzten Stelle im oberen Bereich der Trennfläche läßt man die Analysenlösung kontinuierlich dem laminar und gleichmäßig strömenden Leitelektrolyten zufließen. Die Ionen durchlaufen unter für sie charakteristischen Ablenkungswinkeln die Apparatur und verlassen sie an verschiedenen Stellen (Abb. 6).

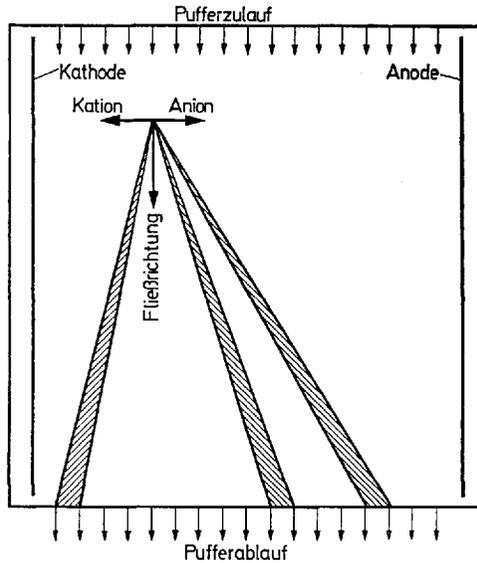


Abb. 6. Fließschema zur Elektrochromatographie und zur trägerfreien Durchfluß- oder Ablenkung-ionophorese

Wichtigste Voraussetzung für das Gelingen kontinuierlicher Trennungen ist die Konstanz aller Parameter an jedem Punkt der Apparatur. Insbesondere muß der gleichmäßige laminare Pufferfluß gewährleistet sein. Konzentration, Temperatur und pH-Wert der Lösung sowie die Feldstärke dürfen während eines Versuches nicht wesentlich schwanken. Das ist bei der Elektrochromatographie auf Trägern und bei der trägerfreien Durchfluß- oder Ablenkung-ionophorese der Fall.

### 3.2.2.1. Elektrochromatographie

*Haugaard* und *Kroner* (261) legten bei der chromatographischen Trennung von Aminosäuren quer zur Fließrichtung eine elektrische Gleichspan-

nung an und erreichten dadurch eine weitgehende Auftrennung der Komponenten. Aufbauend auf diese Versuche entwickelten *Graßmann* (262) sowie *Svensson* und *Brattsten* (263) das Verfahren der Elektrochromatographie. Die Trennebene bestand zunächst aus einer dünnen Schicht von feinem Glaspulver oder Seedsand.

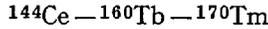
Gleichmäßige Pufferströmungsgeschwindigkeit läßt sich aber einfacher nach dem Prinzip der absteigenden Chromatographie in einem Filtrierpapierbogen erzeugen. Dieser saugt mit seiner oberen Kante aus einem Trog die Pufferlösung an und wird nach einer gewissen Einstellzeit sehr gleichmäßig durchströmt. Die ersten apparativen Vorschläge stammen von *Graßmann* und *Hannig* (264, 265), *Durrum* (266), *Strain* und *Sullivan* (267). Zusammenfassende Darstellungen der älteren Untersuchungen veröffentlichte *Pučar* (268, 269).

Die grundsätzlichen Nachteile des Verfahrens ergeben sich durch das Arbeiten in einer feuchten Kammer (vgl. Kap. 2143). Wegen des Fehlens einer Kühlvorrichtung kann nur mit verdünnten Leitelektrolyten bei kleiner Feld- und Stromstärke gearbeitet werden. Trotzdem stellt sich auf dem Papiervorhang eine erhöhte Temperatur ein, so daß bei empfindlichen Substanzen Zersetzung eintritt. Die Fließgeschwindigkeit läßt sich nur durch Auswahl der Papiersorte geringfügig beeinflussen. Im allgemeinen beträgt die Verweilzeit der Analysenlösung in der Trennfläche mehrere Stunden, die Trennausbeute ist dem entsprechend gering. Wegen der langen Trennzeiten ist die diffusionsbedingte Zonenverbreiterung sehr störend, so daß nur bei Beweglichkeitsunterschieden von mehr als 10% gute Trennungen möglich sind. Bei Anwendung von 3 mm starkem Filtrierkarton als Trägermedium ließen sich Verdunstungseffekte durch Kühlung mit einem Kaltluftstrom und gleichzeitiges Aufdampfen von Feuchtigkeit weitgehend kompensieren (270). Die Durchsatzleistung erhöhte sich auf einige Gramm pro Tag. Der Vorteil des Verfahrens liegt im einfachen Aufbau der Apparaturen und dem geringen Kostenaufwand.

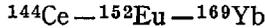
Seit 1951 sind die verschiedensten anorganischen Ionen elektrochromatographisch getrennt worden (171, 267, 271, 272). Als Leitelektrolyten dienten vorwiegend 0,01 m Lösungen der Ammoniumsalze von Milch-, Wein-, Oxal-, Malon- und Citronensäure sowie Äthylendiammin-tetraessigsäure. In den abtropfenden Fraktionen bereitet die quantitative Bestimmung der getrennten Ionen keine Schwierigkeiten (273).

*Sansoni* und *Klement* (274) gelang die kontinuierliche Trennung kondensierter Phosphate bei pH 10 in Boratpuffer. *Blasius* und *Preetz* (132, 240) isolierten aus gealterten Lösungen von Ir (III) und Rh (III) verschiedene nebeneinander vorliegende Chloroquo-Komplexe. Durch Elementaranalyse der getrennten Fraktionen wurde die Zusammensetzung der Verbindungen ermittelt.

Verbreitete Anwendung fand die Elektrochromatographie zur kontinuierlichen Trennung trägerfreier Radionuklide (275–277). *Pučar* und *Jacovac* (278, 279) befaßten sich mit der Trennung der Seltenen Erden. Gruppen weniger ähnlicher Elemente wie



oder



sind in 0,05 m Milchsäure trennbar. Mit zunehmender Ordnungszahl nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit zur Kathode stetig ab. Für eine saubere Trennung aller Seltenenerdionen sind die Unterschiede jedoch zu gering.

### 3.2.2.2. Trägerfreie Durchflußionophorese

Die prinzipielle Versuchsanordnung der trägerfreien Durchfluß- oder Ablenkungionophorese gibt Abb. 6 wieder. Die Trennfläche besteht aus einem dünnen Film des Leitelektrolyten, der sich zwischen zwei horizontal im Abstand von 0,5 mm angeordneten gekühlten Glasplatten befindet. Die Hauptnachteile der Elektrochromatographie, wie Störungen durch das Trägermaterial infolge Absorptions- und Reduktionsvorgängen sowie Verdunstungseffekte, Temperaturschwankungen, Beschränkung auf geringe Feldstärken und verdünnte Elektrolytlösungen wegen der fehlenden Kühlvorrichtung, sind ideal ausgeschaltet. Dafür muß andererseits auf die strömungsstabilisierende Wirkung des Trägers verzichtet werden. Die Trennschärfe wird deshalb nicht nur durch Diffusion, sondern auch durch Thermokonvektion beeinträchtigt.

Die besondere Schwierigkeit dieses Verfahrens liegt darin, das vollkommen gleichmäßige und laminare Durchströmen des Leitelektrolyten über die gesamte Breite der Trennfläche zu erreichen. Bei der ersten trägerfreien Anordnung nach *Barrollier, Watzke* und *Gibian* (280) wurde die Trennfläche an der Ein- und Auslaßseite durch schmale Filtrierpapierstreifen von der Dicke des Pufferfilms abgeschlossen. Am oberen Ende tropfte die Pufferlösung kontinuierlich zu, der mit Zipfeln versehene untere Papierstreifen wirkte wie ein Docht und ließ einzelne Fraktionen abtropfen. Infolge von Verstopfungen und Grabenbildung im Träger wird jedoch keine Langzeitkonstanz der Strömung erreicht. Deshalb wurde die Apparatur mit einer Vorrichtung versehen, die über die gesamte Breite der Abnahmeseite verteilt 49 kleine Becher enthält, die sich nach dem Prinzip kommunizierender Röhren langsam auffüllen und nach wählbaren Zeitabständen über eine Schaltuhr entleert werden (281).

Bei einer ähnlichen Versuchsanordnung von *Hannig* (282) wird der gleichmäßige Pufferfluß durch mehrfache Schlauchpumpen erreicht. In jüngster Zeit ersetzen *Preetz* und *Pfeifer* (283) alle Pumpen und mechanisch bewegten Teile der Abnahmevorrichtung durch gleichmäßig tropfende Kapillaren, deren Auslaufmenge sehr einfach durch den einstellbaren hydrostatischen Druck regelbar ist. Auf diese Weise werden die durch die Pumpvorgänge verursachten Diskontinuitäten in der Strömungsgeschwindigkeit ausgeschlossen.

Das Hauptanwendungsgebiet der kontinuierlichen Durchflußionophorese war bisher die Trennung und Reinigung von *Seren und Peptiden* (281, 284–286). In guter Ausbeute ließen sich verschiedene Chloro-aquo-Komplexe von Ir(III) und Rh(III) isolieren (132, 240). Bei chemisch sehr ähnlichen Ionen ist den Trennmöglichkeiten durch die endliche Ausdehnung der Apparatur eine natürliche Grenze gesetzt. Bei Vergrößerung der Wanderungsstrecke verbessert sich zwar das Trennergebnis geringfügig, gleichzeitig wächst der apparative Aufwand aber erheblich. Die Isolierung gemischter Chlorobromokomplexe des Ir(IV) mit Beweglichkeitsunterschieden von 1,5–2% verlief ergebnislos (19, 20). Auch bei der Durchflußionophorese ist für saubere Trennungen ein Beweglichkeitsunterschied von mindestens 10% erforderlich.

Nach *Hannig* (284, 287–289) lassen sich hochmolekulare und grobdisperse Teilchen wie Zellen und Zellorganellen kontinuierlich trennen, wenn der trägerfreie Elektrolytfilm senkrecht angeordnet wird, so daß es nicht durch Sedimentation zur Verstopfung des Trennspalts kommt.

*Kolin* (290, 291) führte kontinuierliche Trennungen in dünnen Flüssigkeitsschichten durch, die durch magnetisch induzierte Rotation stabilisiert wurden.

### 3.3. Gegenstromionenwanderung

Je kleiner die Beweglichkeitsunterschiede zwischen zu trennenden Ionen sind, um so längere Trennstrecken sind für die Entmischung erforderlich. Sehr lange Wanderungswege lassen sich in den üblichen Ionophoreseapparaturen nur durch schrittweises Anstückeln des Trägers (19, 20) oder etwa durch Abspulen eines Trägerstreifens von einer Vorratsrolle gegenläufig zur Ionenwanderungsrichtung realisieren (292).

*Brewer* und Mitarbeiter (293, 294) wendeten erstmalig das Gegenstromprinzip auf Trennungen durch Ionenwanderung an. Danach läßt man den im elektrischen Feld wandernden Ionen einen Elektrolyten mit gleicher Geschwindigkeit entgegenströmen, der ihre Bewegung gerade kompensiert, so daß sie relativ zur Apparatur stets an der gleichen Stelle verharren. Der Betrieb über längere Zeit entspricht dann sehr langen Wanderungsstrecken.

Die Verfahren der Gegenstromionenwanderung, *Gegenstromelektrolyse* und *Gegenstromionophorese*, dienen zur Trennung von Ionen gleichen Ladungssinns aber unterschiedlicher Beweglichkeit. Die Hauptanwendungsgebiete liegen bei der Trennung chemisch sehr ähnlicher Ionen, im Grenzfall bei der Isotopenanreicherung.

### 3.3.1. Gegenstromelektrolyse

Die Verfahren der Gegenstromelektrolyse sind fast ausschließlich zu Isotopenanreicherungsversuchen herangezogen worden. Die schwierige Regelung der Gegenstromgeschwindigkeit bei den älteren Verfahren ist durch die Methode der Selbststabilisierung überwunden worden.

#### 3.3.1.1. Gesteuerte Gegenstromelektrolyse

Bei der einfachsten Brewerschen Versuchsanordnung (293, 294), Abb. 7, war der untere gerade Teil eines U-förmigen Elektrolysiergefäßes von etwa 10 cm Länge und 1,4 cm Durchmesser mit feinem Sand gleichmäßiger Körnung gefüllt. Darin befand sich KCl-Lösung mit den zu trennenden isotopen Ionen  $^{39}\text{K}^+$  und  $^{41}\text{K}^+$ . Der Kathodenraum enthielt HCl, der Anodenraum KOH. Die bei der Elektrolyse einsetzende Wanderung der  $\text{K}^+$ -Ionen wurde durch Zutropfen von HCl in den Kathodenraum kompensiert. Die Lösung durchströmt die Sandfüllung und fließt durch einen Überlauf der Anodenkammer ab. Zur Neutralisation der anodisch entstehenden  $\text{H}^+$ -Ionen tropft KOH in den Anodentrog.

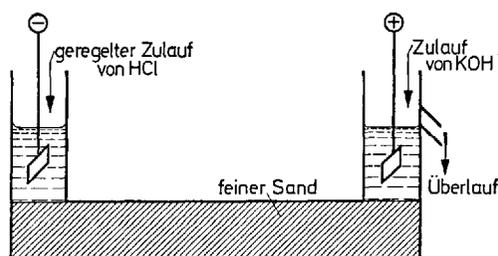


Abb. 7. Trennzelle zur Gegenstromelektrolyse

Die Schwierigkeit besteht darin, die Strömungsgeschwindigkeit in der Trennzelle so zu steuern, daß sie zwischen den sehr ähnlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der K-Isotope liegt. Dazu dient ein Regelventil am HCl-Zulauf, das durch eine Vorrichtung, die ständig den pH-Wert in der Kathodenkammer kontrolliert, gesteuert wird. Die Gesamtüberführung der Kationen ist Null. Wegen der geringfügigen Beweglichkeits-

unterschiede reichern sich jedoch die leichteren Isotope an der Vorderfront, die schwereren an der Rückfront an. Nach 500stündigem Betrieb der Trennzelle stellten *Brewer* und Mitarbeiter in einem kathodennahen Teilstück ihrer Trennsäule eine Verschiebung des natürlichen Isotopenverhältnisses  $^{89}\text{K}/^{41}\text{K}$  von 14,2 auf 24,0 fest. In entsprechender Weise ließ sich  $^{35}\text{Cl}$  in einer NaCl-Lösung von 75,7% auf 80,7% anreichern (295).

*Westhaver* (296) führte umfangreiche Berechnungen über die Strömungsverhältnisse in Trennsäulen mit unterschiedlichen Füllkörpern und die erreichbaren Trennfaktoren durch. Bei späteren Ausführungen der Elektrolysezellen wurde die Grenzfläche zwischen den zu trennenden Kationen und dem Gegenstromelektrolyten aus dem Füllkörperbett herausgezogen und an gut beobachtbarer Stelle in der Nähe der Kathodenkammer durch geregelte Zugabe der HCl annähernd ortsfest gehalten.

*Taylor* und *Dibeler* (297) grenzten das Trenngemisch zwischen schnell wandernden Ionen am Gegenstromzulauf und langsam wandernden Ionen am Ablauf ein. Die Grenzflächen blieben stabil, wenn die Kohlrauschbeziehung Gl. (34) erfüllt war. Diese Forderung ließ sich durch intensive Spülung der begrenzenden Endzonen mit Lösungen geeigneter Konzentration erfüllen.

*Klemm* und Mitarbeiter (298–300) erzielten durch Gegenstromionenwanderung bei der Elektrolyse von Salzschnmelzen erhebliche Anreicherungen.

*Clusius* und *Ramirez* (301–303) gingen von Füllkörpersäulen ab und verwendeten als Trennzelle einen mit zahlreichen Diaphragmen unterteilten Trog, aus dem Gasblasen leicht entweichen können. Konzentrations- und Temperaturunterschiede werden durch Konvektion in senkrechter Richtung schnell ausgeglichen. Die Entmischung der Ionen vollzieht sich in den dünnen Diaphragmen. *Martin* und Mitarbeiter (9, 304–307) verwendeten neben Füllkörpersäulen auch gebündelte Kapillarrohre bei der gegenstromelektrolytischen Trennung von Mg-Isotopen und wiesen auf die Bedeutung von Austauschgleichgewichten für den Trenneffekt hin. *Konstantinov* und Mitarbeiter (308–318) führten verschiedene Isotopentrennungen in einzelnen feinen Kapillaren durch.

Bei allen genannten Versuchsanordnungen bereitet die genaue Einhaltung der Gegenstromgeschwindigkeit Schwierigkeiten. Längerer Betrieb der Apparaturen erfordert ein Regelsystem.

### 3.3.1.2. Selbststabilisierende Gegenstromelektrolyse

Bei der selbststabilisierenden Gegenstromelektrolyse nach *Wagener* und Mitarbeiter stellt sich längs der Trennzelle eine stationäre Salzverteilung ein, die sich bei gewissen Schwankungen der Betriebsbedingungen nur unwesentlich ändert und daher kein Regelsystem erfordert. Die Ver-

suchsanordnung zeigt Abb. 8. Sie enthält als Trennzelle den von *Clusius* und *Ramirez* (301) vorgeschlagenen durch Diaphragmen unterteilten Trog. Als Gegenstromlösungen eignen sich besonders schwache Elektrolyten, im Falle der Kationentrennung z.B. Essigsäure, für Anionentrennungen Ammoniak.

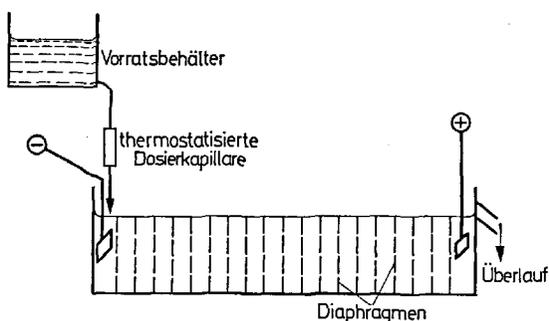


Abb. 8. Trennzelle zur selbststabilisierenden Gegenstromelektrolyse

Wird eine Salzlösung in den mit Essigsäure gefüllten Trog gebracht, so wandern bei nicht zu großer Gegenstromgeschwindigkeit die Kationen stromauf und sammeln sich vor der Kathode. In dem Maße wie die Leitfähigkeit in Kathodennähe steigt, sinkt dort die Feldstärke ab. Es wandern solange Ionen zu, bis die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld,  $E \cdot u$ , gleich der Gegenstromgeschwindigkeit  $v$  des Elektrolyten ist. Es ergibt sich eine Rechteckverteilung der Salzkonzentration. Die Trennsäule enthält also in der Nähe des Gegenstromzulaufs ein Gebiet, das den Gegenstromelektrolyten und ein Salz enthält, während in dem angrenzenden Gebiet bis zum Ablauf nur die reine Gegenstromlösung vorliegt. Schwankungen der Gegenstromgeschwindigkeit bzw. der angelegten Spannung bewirken eine Änderung der Konzentration, d.h. der salzerfüllte Bereich der Trennzelle dehnt sich etwas aus oder zieht sich zusammen. Bei Gegenwart verschieden schnell wandernder Teilchen in der Salzzone tritt Entmischung ein, indem sich die Ionen der größten Beweglichkeit direkt an der Kathode anreichern, die Ionen der kleinsten Beweglichkeit das Ende der Salzzone bilden.

Mit Hilfe der selbststabilisierenden Gegenstromelektrolyse verliefen Isotopenanreicherungen verschiedener Alkali- oder Erdalkalielemente sowie des Kohlenstoff (als Formationen) erfolgreich (321–323). Um den bei höheren Konzentrationen oft größeren Isotopieeffekt auszunützen, wurden Trennungen in engen Kapillarrohren ausgeführt (324). Häufig

wird der Isotopieeffekt durch Ionenaustauschgleichgewichte mit dem Gegenion (Bildung schwacher Komplexe) vergrößert. Für die Trennung von Li-Isotopen läßt sich das unterschiedliche Dissoziationsgleichgewicht der Acetate ausnutzen (322, 325).

### 3.3.2. Gegenstromionophorese

Das von *Preetz* (326–328) vorgeschlagene Verfahren der Gegenstromionophorese basiert auf der Methode der wandernden Grenzfläche, wie sie von *Kendall* beschrieben wurde (vgl. Kap. 3.1.1.). Die Wanderung der Grenzflächen wird durch eine Gegenströmung gleicher Geschwindigkeit der entgegengesetzten Richtung kompensiert. Bei geeigneter Auswahl der begrenzenden Ionen ist weder bei der diskontinuierlichen noch bei der kontinuierlichen Arbeitsweise eine besondere Regeleinrichtung erforderlich.

#### 3.3.2.1. Diskontinuierliche Arbeitsweise

##### *Verfahren und stationärer Zustand*

Ein gegen Konvektionsstörungen weitgehend stabilisiertes Trennrohr (z. B. eine enge Kapillare) enthält im mittleren Bereich ein Gemisch der Anionen  $A_2^-$  und  $A_3^-$  mit den Beweglichkeiten  $u_2 > u_3$ . Im Bereich des Gegenstromzulaufs und des Diaphragmas, das die Verbindung zwischen der Trennzelle und der Anodenkammer herstellt, liegen Anionen  $A_1^-$  mit der Beweglichkeit  $u_1 \gg u_2$ , im Gebiet des Abflusses und Kathodendiaphragmas Anionen  $A_4^-$  mit  $u_4 \ll u_3$  vor. Das gemeinsame Gegenion ist  $M^+$  mit der Beweglichkeit  $u_M$ . Der Kathodentrog enthält zur Neutralisation der dort gebildeten  $OH^-$ -Ionen die Säure  $HA_4$ , im Anodentrog werden die entstehenden  $H^+$ -Ionen durch die Lösung der Base  $MOH$  abgefangen. Die Gegenstromlösung,  $MA_1$ , mit der Konzentration  $c_1$  fließt im Trennrohr mit der Geschwindigkeit  $v$ . Bei Anlegen einer ausreichend hohen Spannung stellt sich innerhalb einer gewissen Zeit der durch Abb. 9 wiedergegebene stationäre Zustand ein, der beliebig lange aufrecht erhalten werden kann. Alle Ionen ordnen sich in durch Grenzflächen gegeneinander abgegrenzten Zonen nach fallender Beweglichkeit an. Der Zustand entspricht dem, wie er sich auch bei der Methode der wandernden Grenzfläche ausbildet, allerdings wird hier die Wanderung aller Anionen und damit auch der Grenzflächen gerade kompensiert. Es gilt Gl. (33), wenn man unter  $v$  die Gegenstromgeschwindigkeit in cm/sec versteht.

Längs des Trennrohrs herrscht im stationären Zustand ein treppenförmiger Feldstärkeverlauf. Je größer die Beweglichkeitsunterschiede

zweier Anionen sind, um so größer ist gemäß Gl. (33) der Feldstärkesprung zwischen ihren Zonen (Abb. 9).

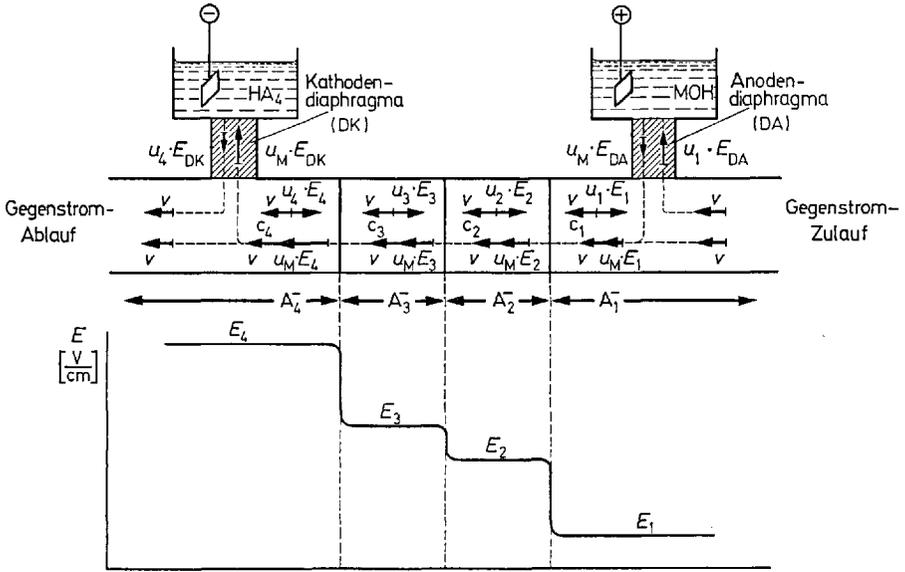


Abb. 9. Stationärer Zustand bei der Gegenstromionophorese (Anionentrennung)

Befindet sich z.B. das Anion  $A_2^-$  im Bereich der Zone  $A_3^-$ , so wandert es mit der Geschwindigkeit  $u_2 (E_3 - E_2)$  dem Gegenstrom entgegen, bis es die Zone  $A_3^-$  erreicht hat. Andererseits bewegt sich das Anion  $A_3^-$ , das sich im Bereich der niedrigeren Feldstärke, d.h. in der Zone  $A_2^-$  aufhält, in Richtung des Gegenstroms mit der Geschwindigkeit  $u_3 (E_3 - E_2)$  bis es die Zone  $A_3^-$  erreicht hat, wo seine Geschwindigkeit auf Null absinkt. Die Entmischung der zunächst längs des Trennrohres gleichmäßig verteilten Ionen erfolgt somit von zwei Seiten und um so schneller, je größer die Unterschiede in den Ionenbeweglichkeiten und je höher die herrschenden Feldstärken sind, d.h. je höher die angelegte Spannung ist.

Während sich bei der Zonenionophorese im gleichmäßigen Spannungsfälle die Zonen mit der Zeit durch Diffusion und Konvektion irreversibel verbreitern, bewirken die Feldstärkesprünge die Fokussierung der Ionen in Gebiete gleichbleibender Größe. Der Feldstärkeverlauf und die Länge der Zonen im stationären Zustand wird durch die Anzahl, Art und Menge der getrennten Ionen bestimmt. Die Konzentration der im Trennrohr vorliegenden Lösungen  $c_2 - c_4$  stellen sich entsprechend der

Kohlrauschbeziehung Gl. (34) in Abhängigkeit von der Konzentration des Gegenstromelektrolyten  $c_1$  ein.

Die Diaphragmen aus Asbestwolle verhindern nicht nur die konvektive Vermischung der Lösungen in den Elektrodenrögen mit der im Trennrohr, sondern sie übernehmen gleichsam Elektrodenfunktion. Sie wirken aber nicht, wie sonst Elektroden in wäßrigen Lösungen als Quellen für  $H^+$ - bzw.  $OH^-$ -Ionen, sondern sie sind Quellen bzw. Senken für das Kation  $M^+$  und die Anionen  $A_1^-$  und  $A_2^-$ , wie das in Abb. 9 die gestrichelt gezeichneten Bahnen dieser Ionen veranschaulichen. Alle mit der Gegenstromlösung herangebrachten Anionen  $A_1^-$  wandern in den Anodentrog, nur das Lösungsmittel und die Gegenionen  $M^+$  werden überführt, wobei letztere wie die Pfeile in Abb. 9 zeigen, das Trennrohr mit von Zone zu Zone wachsender Geschwindigkeit durchlaufen.

An die Konzentration der Elektrodenlösungen sind keine bestimmten Anforderungen zu stellen. Wichtig ist nur, daß die Anodenlösung stets alkalisch, die Kathodenlösung stets sauer reagiert. In der Praxis wählt man deshalb möglichst konzentrierte Lösungen, um sie nur gelegentlich erneuern zu müssen.

### Automatische Steuerung

Abb. 10 verdeutlicht am Beispiel der Trennung der beiden Anionen  $A_1^-$  und  $A_2^-$  mit  $u_1 \gg u_2$ , wie Schwankungen der Versuchsbedingungen, in diesem Fall der angelegten Spannung, sich automatisch ausgleichen.

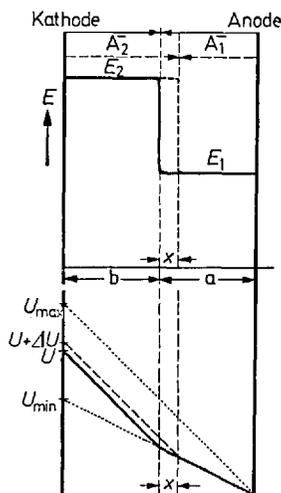


Abb. 10. Steuerung des stationären Zustands

Das obere Teilbild zeigt den Feldstärke-, das untere den Spannungsverlauf für den stationären Zustand. Für die Spannung  $U$  bzw.  $U + \Delta U$  gilt:

$$E_1 \cdot a + E_2 \cdot b = U \quad (35a)$$

$$E_1 (a - x) + E_2 (b + x) = U + \Delta U \quad (35b)$$

daraus folgt

$$x = \frac{\Delta U}{E_2 - E_1} \quad (36)$$

Die gestrichelten Kurven zeigen, wie das System durch die Verschiebung der Grenzfläche um die Strecke  $x$  die erhöhte Spannung auffängt und damit die Feldstärkeverhältnisse des stationären Zustands erhält. Je größer die Feldstärkedifferenz  $E_2 - E_1$  zwischen den Zonen ist, d. h. je mehr sich die Beweglichkeiten der Ionen unterscheiden, um so geringer ist die Verschiebung der Fronten im Trennrohr bei einer gewissen Spannungsänderung. Erst bei Überschreiten von  $U_{\max}$  bzw. bei Unterschreitung von  $U_{\min}$ , bricht der stationäre Zustand zusammen. Entsprechende Überlegungen gelten für Schwankungen der Gegenstromgeschwindigkeit.

Die *einzig*e Bedingung für die automatische Steuerung der Gegenstromionophorese ist demnach, daß die zu trennenden Ionen zwischen Zonen sehr schnell wandernder Ionen am Gegenstromzulauf und sehr langsam wandernder Ionen am Gegenstromablauf eingegrenzt werden.

### Trennungen

Der Ablauf der Gegenstromionophorese wurde von Preetz und Pfeifer (329) in einfachen Kapillarrohren an Hand von Modelltrennungen eingehend studiert. Sie untersuchten die Einflüsse verschiedenster Parameter auf die Trennschärfe und -dauer. Durch Einführung von Sonden in eine spezielle Trennzelle ließen sich die Einstellung des treppenförmigen Feldstärkeverlaufs und der Konzentration in den einzelnen Zonen als Funktion der Gegenstromlösung messend verfolgen. Während die Entmischung so unterschiedlicher Ionen wie  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{MnO}_4^-$ ,  $[\text{IrCl}_6]^{2-}$ ,  $\text{BrO}_3^-$ ,  $[\text{IrBr}_6]^{2-}$  und  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  maximal 30 min erforderte, mußte die Versuchsdauer bei den chemisch sehr ähnlichen Gemischtligandkomplexen des Typs  $[\text{IrCl}_x\text{Br}_{6-x}]^{2-}$  ( $x = 0, 1, \dots, 6$ ) auf etwa zwei Stunden erhöht werden.

#### 3.3.2.2. Kontinuierliche Arbeitsweise

Da bei der Gegenstromionophorese Flüssigkeitsbewegungen senkrecht zum elektrischen Feld und zur Gegenstromrichtung die Entmischung nicht stören, läßt sich das diskontinuierliche „eindimensionale“ Ver-

fahren in einer Kapillare auf eine laminar durchströmte Fläche erweitern (330). Der Trennvorgang wird so wie bei der trägerfreien Durchflußionophorese (vgl. Kap. 3.2.2.2.) kontinuierlich gestaltet. Abb. 11 zeigt das schematische Fließbild für die kontinuierliche Trennung der Anionen  $A_1^-$  und  $A_2^-$  mit  $u_1 > u_2$ .

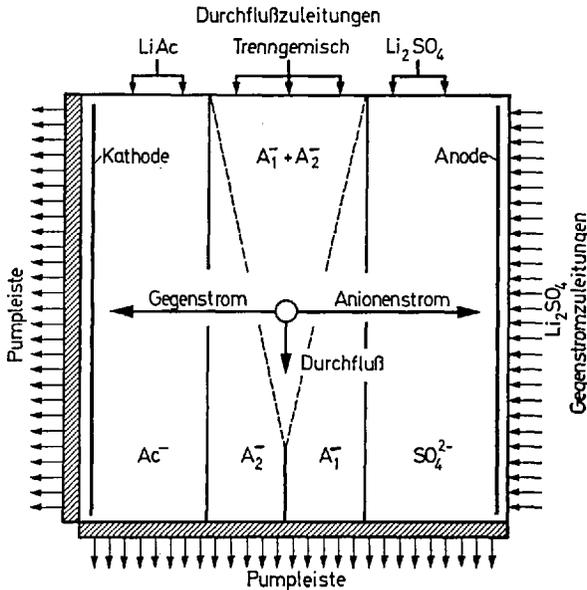


Abb. 11. Fließschema zur kontinuierlichen Gegenstromionophorese

Durch die Eingrenzung des Gemisches zwischen schnellen Ionen ( $SO_4^{2-}$ ) an der Seite des Gegenstromzulaufs und langsamen Ionen ( $Ac^-$ ) am Ablauf sind die Voraussetzungen zur Einstellung stationärer Verhältnisse erfüllt. Nach Einschalten des elektrischen Stroms und der Gegenströmung läßt man das Gemisch und die Begrenzungslösungen in gleichmäßig laminarer Strömung parallel zu den Elektroden fließen. Auf dem Weg durch die Trennfläche tritt Entmischung ein, indem  $A_1^-$  und  $A_2^-$  nach rechts und links zu reinen Zonen auswandern. Die Verweilzeit wird so bemessen, daß erst nach vollständiger Trennung die Apparatur durchlaufen ist. Die keilförmige Mischzone muß noch innerhalb der Fläche enden. Das gleichmäßige Gegen- und Durchströmen wird durch Dosierkapillaren im Zulauf und zwei Pumpleisten mit je 49 Zapfstellen, die nach dem Prinzip kommunizierender Röhren arbeiten, erreicht. Bei der Weiterentwicklung des Verfahrens wurden die mecha-

nischen Pumpen durch gleichmäßig tropfende Kapillaren ersetzt. Diese Maßnahme führte zum Ausschluß der kleinen Diskontinuitäten der Strömung, die durch das rhythmische Arbeiten der Pumpen verursacht wurden und die Trennschärfe beeinträchtigt (331).

Der Verlauf der kontinuierlichen Trennung wurde am Beispiel der Entmischung farbiger Komplexanionen studiert (330). Für die Trennung einer Lösung mit  $[\text{IrCl}_6]^{2-}$ - und  $[\text{IrBr}_6]^{2-}$ -Ionen, die sich als etwa 10 cm breiter Stromfaden durch die Apparatur bewegte, genügte eine Verweilzeit von etwa 30 Minuten. In den abtropfenden reinen wäßrigen Komplexsalzlösungen waren weder Acetat- noch Sulfationen nachweisbar. Auch die kontinuierliche Isolierung verschiedener Chloro-Bromo-Komplexe von Ir(IV) und Os(IV) gelang. Allerdings mußte bei diesen chemisch sehr ähnlichen Ionen die Verweilzeit auf etwa zwei Stunden erhöht werden.

### 3.4. Fokussierende Ionophorese

Das von *Schumacher* und Mitarbeitern (332–334) entwickelte Trennverfahren ist unter der Bezeichnung „fokussierender Ionenaustausch“ bekannt geworden. Um jedoch den aufgetretenen Verwechslungen mit Trennvorgängen an heterogenen Ionenaustauschern zu begegnen, ist von *Friedli* und *Schumacher* (335) der Name „elektrophoretische Ionenfokussierung“ empfohlen worden.

Das Verfahren ist gekennzeichnet durch die Einstellung eines stationären Zustandes, bei dem sich verschiedene Teilchen an solchen Orten anhäufen, wo sie genau die Beweglichkeit Null annehmen. Vorzeichen und Betrag der Ladung der Teilchen sind eine Funktion des Ortes. Dazu müssen reversible Austauschreaktionen ablaufen, die von Ladungsänderungen begleitet sind.

Ein Metallion, das sich in einer Lösung mit einem Konzentrationsgefälle eines Komplexbildners befindet, liegt teils als Kation, teils als Anion vor. Unter der Wirkung eines in Richtung des Gradienten angelegten elektrischen Feldes wandert es an die Stelle, wo seine kationischen und anionischen Formen gleich häufig sind. Dieser Ort hängt bei festliegendem Konzentrationsgefälle des Komplexbildners nur von der Komplexstabilitätskonstanten, nicht aber von der Ionenbeweglichkeit des Metallions ab.

Zur Herstellung eines stabilen Gradienten eines Komplexbildners auf einem Ionophoresestreifen taucht man diesen in eine Anodenkammer, die z. B. HCl als Komplexzerstörer enthält, und in eine Kathodenkammer mit der Lösung eines Komplexbildners, z. B. Äthylendiammintetraacetat. Der mittlere Teil mit der aufgetragenen Zone wird in einem Kohlenstofftetrachloridbad gekühlt, Abb. 12.

Bei Stromdurchgang bildet sich sehr schnell ein pH-Gradient aus, und in Abhängigkeit davon entsteht ein Konzentrationsgefälle an freien Ligandanionen in Richtung zur Anode. Die Ionen eines Gemisches ordnen sich innerhalb weniger Minuten als scharfe getrennte Zonen stationär an, die stärkeren Komplexbildner näher an der Anode, die schwächeren näher an der Kathode.

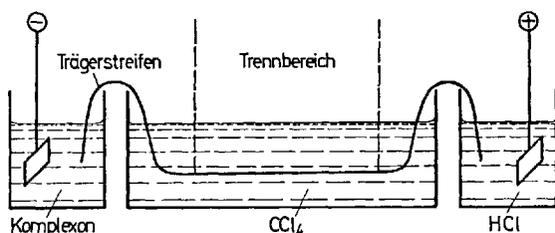


Abb. 12. Fokussierende Ionophorese

*Schumacher* und Mitarbeiter stellten neben der eingehenden theoretischen Behandlung des Fokussierungsvorganges die Leistungsfähigkeit ihres Verfahrens durch umfangreiche experimentelle Untersuchungen unter Beweis. Neben der Schnelltrennung vieler Metallkationen und trägerfreier Radionuklide (333) befaßten sie sich insbesondere mit der Analyse der Seltenen Erden (335, 336). Da die Fokussierung um so schärfer ist, je kleiner die eingesetzten Probemengen sind, wurden insbesondere Trennungen radioaktiver Seltener Erden und verschiedener Transuranelemente durchgeführt (337–341).

#### 4. Schluß

Die Ergebnisse ionophoretischer Trennungen lassen sich durch die folgenden beiden Maßnahmen verbessern:

1. Vergrößerung der Unterschiede in den Ionenbeweglichkeiten,
2. Ausschaltung irreversibler Störeffekte.

In allen Fällen, wo die Beweglichkeit der zu trennenden Teilchen vom Grundelektrolyten, den pH-Bedingungen, durch Komplexbildung und chromatographische Effekte an speziellen Trägern beeinflusst wird, lassen sich optimale Trennbedingungen finden, unter denen die Beweglichkeitsunterschiede am größten werden.

Oft verbieten sich jedoch die Wanderungsgeschwindigkeit beeinflussende Reaktionen, weil bestimmte Ionen unverändert zu isolieren sind. Ein gegebenes, bei chemisch ähnlichen Ionen, meist sehr kleiner

Beweglichkeitsunterschied, bildet dann die Grundlage der Trennung. Diese gelingt nur, wenn große Strecken bei weitgehender Ausschaltung irreversibler Störungen durchlaufen werden. Diffusion und Konvektion lassen sich durch Verwendung möglichst homogener gut stabilisierender Träger und durch Verkürzung der Trenndauer beim Arbeiten mit hohen Feldstärken zurückdrängen. Bei den Verfahren der Gegenstromionenvanderung und der fokussierenden Ionophorese entsteht ein stabiler Gradient der Feldstärke bzw. eines Komplexbildners, der die irreversible Verbreiterung der Zonen verhindert.

## 5. Literatur

1. Bier, M.: Electrophoresis. London: Academic Press, Inc. 1959.
2. Blasius, E.: Chromatographische Methoden in der analytischen und präparativen anorganischen Chemie. Stuttgart: Enke Verlag 1958.
3. Bloemendal, H.: Zone Electrophoresis in Blocks and Columns. Amsterdam—London—New York: Elsevier Publishing Company 1963.
4. Clotten, R., u. A. Clotten: Hochspannungselektrophorese. Stuttgart: G. Thieme Verlag 1962.
5. Wieme, R. J.: Agar Gel Electrophoresis. Amsterdam—London—New York: Elsevier Publishing Company 1965.
6. Wunderly, Ch.: Principles and Applications of Paper Electrophoresis. Amsterdam—London—New York: Elsevier Publishing Company 1961.
7. Strickland, R. D.: Anal. Chem. 38, 99 R (1966).
8. — Anal. Chem. 40, 74 R (1968).
9. Martin, H.: Chimia 14, 202 (1960).
10. Edward, J. T.: Chem. Ind. (London) 929 (1956).
11. —, and D. Waldron-Edward: J. Chromatog. 20, 563 (1965).
12. Elworthy, P. H.: J. Chem. Soc. 3718 (1962).
13. — J. Chem. Soc. 388 (1963).
14. Gonick, F.: J. Phys. Chem. 50, 291 (1946).
15. Markham, R., and J. D. Smith: Nature 168, 406 (1951).
16. Blasius, E., u. H. Thiele: Z. Anal. Chem. 197, 347 (1963).
17. Lindemann, F. A.: Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A 99, 102 (1921).
18. Klemm, A.: Naturwissenschaften 32, 69 (1944).
19. Preetz, W.: Dissertation, Technische Universität Berlin, 1963.
20. Blasius, E., u. W. Preetz: Z. Anorg. Allgem. Chem. 335, 16 (1965).
21. Hais, I. M.: Chem. Listy 49, 709 (1955).
22. Jokl, V.: J. Chromatog. 13, 541 (1964).
23. — J. Chromatog. 14, 71 (1964).
24. Peniston, Q. P., H. D. Agar, and J. L. McCarthy: Anal. Chem. 23, 994 (1951).
25. Kortüm, G.: Lehrbuch der Elektrochemie. Weinheim: Verlag Chemie 1966.
26. Consden, R., A. H. Gordon, and A. J. P. Martin: Biochem. J. 40, 33 (1946).
27. Alberty, R. A., and E. L. King: J. Am. Chem. Soc. 73, 517 (1951).
28. Wenger, P. E., I. Kapetanidis u. W. v. Janstein: Mikrochim. Acta 961 (1960) und 184 (1962).
29. Kraus, K. A., and G. W. Smith: J. Am. Chem. Soc. 72, 4329 (1950).

30. *Timberlake, F. C.*: J. Chem. Soc. 1229 (1964).
31. *Wetzel, K.*, u. *G. Voigt*: Z. Physik. Chem. 216, 7 (1961).
32. *Johl, V.*, u. *A. Muchova*: Acta Fac. Pharm. Bohemoslov. 11, 23 (1965).
33. — u. *J. Majer*: Acta Fac. Pharm. Bohemoslov. 11, 55 (1965).
34. — —, *H. Scharf* u. *H. Kroll*: Mikrochim. Acta 63 (1966).
35. *Pučar, Z.*: Arhiv. Chem. 26, 29, 41 (1954).
36. — Anal. Chim. Acta 17, 476, 485 (1957).
37. — Anal. Chim. Acta 18, 290 (1958).
38. *Kiso, Y.*: J. Sci. Hiroshima Univ. 27, 17, 23 (1963).
39. *Klamberg, H.*: persönl. Mitteilung.
40. *Kunkel, H. G.*, and *A. Tiselius*: J. Gen. Physiol. 35, 89 (1951).
41. *Tiselius, A.*: Discussions Faraday Soc. 13, 29 (1953).
42. *Edward, J. T.*: J. Chromatog. 1, 466 (1958).
43. *Gross, D.*: J. Chromatog. 10, 221 (1963).
44. *McDonald, H. J.*: Ionography, Electrophoresis in Stabilized Media. Chicago: Year Book Publishers 1955.
45. —, and *R. H. Spitzer*: Circulation Res. 1, 396 (1953).
46. *Bermes, E. W.*, and *H. J. McDonald*: J. Chromatog. 4, 34 (1960).
47. *Boyack, J. R.*, and *J. C. Giddings*: Arch. Biochem. Biophys. 100, 16 (1963).
48. *Giddings, J. C.*, and *J. R. Boyack*: Anal. Chem. 36, 1229 (1964).
49. *Gross, D.*: Chem. Ind. (London) 1219 (1959).
50. *Lahiri, M. M.*: J. Indian Chem. Soc. 42, 843 (1965).
51. *McDonald, H. J.*, *M. C. Urbin*, and *M. B. Williamson*: Science 112, 227 (1950).
52. *Schmid, G.*: Chem.-Ingr.-Tech. 37, 616 (1965).
53. *Kowalczyk, J.*: Chem. Anal. (Warsaw) 8, 823 (1963).
54. — Chem. Anal. (Warsaw) 14, 411 (1964).
55. *Wood, S. E.*, and *H. H. Strain*: Anal. Chem. 26, 1869 (1954).
56. *Jermyn, M. A.*, and *R. Thomas*: Nature 172, 728 (1953).
57. *Kowalczyk, J.*, u. *A. Czaplinski*: Chem. Anal. (Warsaw) 9, 1021 (1964).
58. — Chem. Anal. (Warsaw) 9, 899 (1964).
59. — Chem. Anal. (Warsaw) 10, 29 (1965).
60. *Klamberg, H.*, *W. Krey* u. *H. Saran*: Z. Anal. Chem. 215, 365 (1966).
61. *Macheboeuf, M.*, *P. Rebeyrotte*, *J. Dubert* et *M. Brunerie*: Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 334 (1953).
62. —, *J. Dubert* et *P. Rebeyrotte*: Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 346 (1953).
63. *Kowalczyk, J.*: Chem. Anal. (Warsaw) 8, 659, 823, 835 (1963).
64. — Chem. Anal. (Warsaw) 9, 21, 891 (1964).
65. *Schilling, K.*, and *H. Waldmann-Meyer*: Acta Chem. Scand. 13, 1, 13 (1959).
66. *Weber, R.*: Helv. Chim. Acta 34, 2031 (1951).
67. *Lederer, M.*, *H. Michl*, *K. Schlögl* u. *A. Siegel*: Handbuch der Mikrochemischen Methoden, Band III. Wien: Springer 1961.
68. *Alberti, G.*, *A. Conte*, *G. Grassini* u. *M. Lederer*: Electroanal. Chem. 4, 301 (1962).
69. *Gijbels, R.*, *L. de Meyer*, and *J. Hoste*: Anal. Chim. Acta 31, 159 (1964).
70. *Kowalczyk, J.*: Chem. Anal. (Warsaw) 9, 29 (1964).
71. *Kohlrausch, F.*: Ann. Physik 62, 209 (1897).
72. *Wetham, W. C. D.*: Phil. Trans. A 184, 337 (1893).
73. *Nernst, W.*: Z. Elektrochem. 3, 308 (1897).
74. *Masson, H.*: Phil. Trans. A 192, 331 (1899).
75. *Denison, R. B.*, u. *B. D. Steele*: Z. Physik. Chem. 57, 110 (1906).
76. *Kendall, J.*, and *E. D. Crittenden*: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 9, 75 (1923).
77. — Nature 150, 136 (1942).

78. —, and *J. F. White*: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 10, 458 (1924).
79. —, and *B. L. Clarke*: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 11, 393 (1925).
80. —, *E. R. Jette*, and *W. West*: J. Am. Chem. Soc. 48, 3114 (1926).
81. —, and *W. West*: J. Am. Chem. Soc. 48, 2619 (1926).
82. *MacInnes, D. A.*, and *E. R. Smith*: J. Am. Chem. Soc. 45, 2246 (1923).
83. —, and *T. B. Brighton*: J. Am. Chem. Soc. 47, 994 (1925).
84. —, and *M. Dole*: J. Am. Chem. Soc. 53, 1357 (1931).
85. *Muir, D. R.*, *J. R. Graham*, and *A. R. Gordon*: J. Am. Chem. Soc. 76, 2157 (1954).
86. *Hartley, G. S.*: Trans. Faraday Soc. 30, 648 (1934).
87. *Drew, E.*, and *G. S. Hartley*: Trans. Faraday Soc. 30, 653 (1934).
88. *Cady, H. P.*, and *L. C. Longworth*: J. Am. Chem. Soc. 51, 1656 (1929).
89. *Smith, E. R.*: J. Am. Chem. Soc. 50, 1904 (1928).
90. *Collie, B.*, and *G. S. Hartley*: Trans. Faraday Soc. 30, 657 (1934).
91. *Martin, A. J. P.*, and *F. M. Everaerts*: Anal. Chim. Acta 38, 233 (1967).
92. *Tiselius, A.*: Trans. Faraday Soc. 33, 524 (1937).
93. — Kolloid-Z. 85, 129 (1938).
94. *Töpler, A.*: Ann. Physik 127, 556 (1866).
95. — Ann. Physik 134, 194 (1868).
96. *Wiedemann, E.*: Helv. Chim. Acta 31, 2037 (1948).
97. *Antweiler, H. J.*: Kolloid-Z. 115, 130 (1949).
98. — Kolloid-Z. 117, 110 (1950).
99. *Hoch-Ligeti, C.*, and *H. Hoch*: Biochem. J. 43, 556 (1948).
100. *MacInnes, D. A.*, and *L. G. Longworth*: Chem. Rev. 11, 171 (1932).
101. *Longworth, L. G.*: Chem. Rev. 30, 323 (1942).
102. — J. Am. Chem. Soc. 67, 1109 (1945).
103. *Dole, V. P.*: J. Am. Chem. Soc. 67, 1119 (1945).
104. *Blasius, E.*, and *B. A. Bilal*: J. Chromatog. 18, 134 (1965).
105. *Gross, D.*: Analyst 90, 380 (1965).
106. *Sehera, A.*: Chim. Anal. (Paris) 46, 613 (1964).
107. *Dittmer, A.*: Plasmaeiweiß und Elektrophorese. Jena: VEB G. Fischer Verlag 1965.
108. *Wieland, Th.*: Angew. Chem. 60, 313 (1948).
109. —, u. *E. Fischer*: Naturwissenschaften 35, 29 (1948).
110. *Turba, F.*, u. *H. J. Enekel*: Naturwissenschaften 37, 93 (1950).
111. *Durrum, E.*: J. Am. Chem. Soc. 72, 2943 (1950).
112. — J. Am. Chem. Soc. 73, 4875 (1951).
113. *Williams, F.*, *E. Pickels*, and *E. Durrum*: Science 121, 829 (1955).
114. *Grassmann, W.*, u. *K. Hannig*: Z. Physiol. Chem. 290, 1 (1952).
115. *Schneider, G.*, u. *G. Sparmann*: Naturwissenschaften 42, 156, 391 (1955).
116. *Cremer, H. D.*, u. *A. Tiselius*: Biochem. Z. 320, 273 (1950).
117. *Michl, H.*: Monatsh. Chem. 82, 489 (1951).
118. *Kickhöfen, B.*, u. *O. Westphal*: Z. Naturforsch. 7b, 655 (1952).
119. *Turba, F.*, *H. Pelzer* u. *H. Schuster*: Z. Physiol. Chem. 296, 97 (1954).
120. *Lange, G.*: Biochem. Z. 326, 172 (1955).
121. *Katz, A. M.*, *W. J. Dreyer*, and *C. Anfinsen*: J. Biol. Chem. 234, 2897 (1959).
122. *Werner, G.*, u. *O. Westphal*: Angew. Chem. 67, 251 (1955).
123. *Wieland, Th.*, u. *G. Pfeiderer*: Angew. Chem. 67, 257 (1955).
124. — — Angew. Chem. 69, 199 (1957).
125. *Michl, H.*: Monatsh. Chem. 85, 1251 (1954).
126. — Monatsh. Chem. 83, 737 (1952).
127. *Gross, D.*: Nature 172, 908 (1953).

128. — *Nature* 773, 487 (1954).
129. — *J. Chromatog.* 5, 194 (1961).
130. — *Lab. Pract.* 10, 622 (1961).
131. *Dose, K.*: *J. Chromatog.* 2, 575 (1959).
132. *Blastus, E.*, u. *W. Preetz*: *Z. Anorg. Allg. Chem.* 335, 1 (1965).
133. *Lloyd, P. F.*, and *K. Syers*: *Lab. Pract.* 13, 841 (1964).
- 134a. *Grüne, A.*: *Chimia* 11, 173, 213 (1957).
- 134b. *Bailey, R. A.*, and *L. Yaffe*: *Chromatog. Rev.* 3, 158 (1961).
- 134c. *Klug, O.*: *Magy. Kem. Lap.* 333 (1965).
135. *Aizetmüller, K.*, *K. Buchtela*, and *F. Grass*: *J. Chromatog.* 22, 431 (1966).
136. *Clanet, F.*, *J. Clarence*, and *M. Very*: *J. Chromatog.* 13, 440 (1964).
137. *Keller, H.*, u. *H. Seeger*: *Z. Anal. Chem.* 212, 125 (1965).
138. *Maier, K. H.*, u. *K. Voggel*: *Z. Anal. Chem.* 186, 257 (1962).
139. *Aizetmüller, K.*, *K. Buchtela*, *F. Grass* u. *F. Hecht*: *Mikrochim. Acta* 1089 (1964).
140. *Dose, K.*, u. *S. Risi*: *Z. Anal. Chem.* 205, 394 (1964).
141. *Pfründer, B.*, *R. Zurflüh*, *H. Feiler* u. *H. Erlenmeyer*: *Helv. Chim. Acta* 45, 1153 (1962).
142. *Grabar, P.*, and *C. A. Williams*: *Biochim. Biophys. Acta* 17, 67 (1955).
143. *Bockemüller, W.*: *Z. Naturforsch.* 13b, 772 (1958).
144. *Nachr. Chem. Techn.* 13, 457 (1965).
145. *Schrouwen, J.*: *J. Chromatog.* 23, 177 (1966).
146. *Raymond, S.*, and *L. S. Weintraub*: *Science* 130, 711 (1959).
147. *Pilz, W.*, u. *J. Johann*: *Z. Anal. Chem.* 215, 105 (1966).
148. *Wagner, F.*: *Experientia* 20, 588 (1964).
149. *Moghissi, A.*: *Anal. Chim. Acta* 30, 91 (1964).
150. *Bächmann, K.*, and *H. Görrisch*: *J. Chromatog.* 23, 336 (1966).
151. *Dobici, F.*, and *G. Grassini*: *J. Chromatog.* 10, 98 (1963).
152. *Buchtela, K.*, u. *M. Lesigang-Buchtela*: *Mikrochim. Acta* 380 (1967).
153. *Lesigang-Buchtela, M.*, u. *K. Buchtela*: *Mikrochim. Acta* 1164 (1967).
154. *Pastuska, G.*, u. *H. Trinks*: *Chemiker Ztg.* 86, 135 (1962).
155. *Honegger, C. G.*: *Helv. Chim. Acta* 44, 173 (1961).
156. *Flodin, P.*, and *J. Porath*: *Biochim. Biophys. Acta* 13, 175 (1954).
157. *Pierce, T. B.*, u. *P. F. Peck*: *Chem. Ind. (London)* 1202 (1963).
158. *Lopiekes, D. V.*, *F. R. Dastoli*, and *S. Price*: *J. Chromatog.* 23, 182 (1966).
159. *Criddle, W. J.*, *G. J. Moody*, and *J. D. R. Thomas*: *J. Chromatog.* 16, 350 (1964).
160. — — — *Nature* 202, 1327 (1964).
161. *Mitchell, K. H.*, and *L. A. Herzenberg*: *Anal. Chem.* 29, 1229 (1957).
162. *MacDonell, H. L.*: *Anal. Chem.* 33, 1554 (1961).
163. *Pierce, T. B.*, and *P. F. Peck*: *Analyst* 89, 662 (1964).
164. *Alberti, G.*, *G. Grassini* u. *R. Trucco*: *J. Electroanal. Chem.* 3, 283 (1962).
165. *Bailey, R. A.*, and *A. Steger*: *J. Chromatog.* 11, 122 (1963).
166. *Alberti, G.*, *S. Allulli*, and *G. Modugno*: *J. Chromatog.* 15, 420 (1964).
167. *Kühnl, H.*, and *M. A. Khan*: *J. Chromatog.* 23, 149 (1966).
168. *Forcheri, S.*, and *A. Berlin*: *J. Chromatog.* 26, 239 (1967).
169. *Bächmann, K.*: *Z. Anal. Chem.* 218, 321 (1966).
170. *Johl, V.*, *M. Undeutsch*, and *J. Majer*: *J. Chromatog.* 26, 208 (1967).
171. *Sherma, J.*, *G. H. Evans*, *H. D. Frame*, and *H. H. Strain*: *Anal. Chem.* 35, 224 (1963).
172. *de Vries, G.*, *G. P. Schütz*, and *E. van Dalen*: *J. Chromatog.* 13, 119 (1964).

173. Winter, E.: *Z. Anal. Chem.* 233, 104 (1968).
174. Barrolier, J., J. Heilmann, and E. Watzke: *J. Chromatog.* 1, 434 (1958).
175. — J. *Chromatog.* 4, 99 (1960).
176. Mukerjee, H. G., u. H. R. Mukerjee: *Z. Anal. Chem.* 196, 325 (1963).
177. Masłowska J.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 10, 1151 (1965).
178. Schier, O.: *Angew. Chem.* 68, 63 (1956).
179. Gross, D.: *Nature* 180, 596 (1957).
180. — J. *Chromatog.* 10, 233 (1963).
181. Evans, G. H., and H. H. Strain: *Anal. Chem.* 28, 1560 (1956).
182. Pompowski, T., J. Kowalczyk u. J. Siemianowska: *Chem. Anal. (Warsaw)* 6, 393 (1961).
183. Shvedov, V. P., u. G. F. Nichugovskii: *Radiokhimiya* 6, 107 (1964).
184. Tuckman, M. M., and H. H. Strain: *Anal. Chem.* 32, 695 (1960).
185. Majumdar, A. K., and B. R. Singh: *Anal. Chim. Acta* 20, 275 (1959).
186. — — *Anal. Chim. Acta* 17, 541 (1957).
187. — — *Anal. Chim. Acta* 18, 220 (1958).
188. — — *Anal. Chim. Acta* 18, 224 (1958).
189. — — *Anal. Chim. Acta* 19, 520 (1958).
190. Ledever, M., and F. L. Ward: *Anal. Chim. Acta* 6, 355 (1952).
191. Jozefowicz, E., u. J. Masłowska: *Zeszyty Nauk. Politech. Lodz.* 50, 13 (1963).
192. Giustiniani, M., G. Faraglia, and R. Barbieri: *J. Chromatog.* 15, 207 (1964).
193. Mukerjee, H. G.: *Z. Anal. Chem.* 162, 28 (1958).
194. — *Z. Anal. Chem.* 163, 87, 408 (1958).
195. Pompowski, T., J. Kowalczyk u. A. Krasowska: *Chem. Anal. (Warsaw)* 6, 387 (1961).
196. — — u. S. Czun-Jen: *Chem. Anal. (Warsaw)* 8, 719 (1963).
197. Pučar, Z., and Z. Jakovac: *J. Chromatog.* 2, 320 (1959).
198. Chakraborty, H. C.: *J. Chromatog.* 5, 121 (1961).
199. Shukla, S. K., and J. P. Adloff: *J. Chromatog.* 17, 391 (1965).
200. Been, U., and A. Hoyer: *J. Chromatog.* 17, 631 (1965).
201. Bailey, R. A., and A. Steger: *J. Chromatog.* 18, 374 (1965).
202. Mukerjee, H. G.: *Z. Anal. Chem.* 167, 182 (1959).
203. Lancina, M. H.: *J. Chromatog.* 2, 438 (1959).
204. Chakraborty, H. C.: *J. Electroanal. Chem.* 2, 261 (1961).
205. Biswas, S. D., and A. K. Dey: *J. Indian Chem. Soc.* 42, 763 (1965).
206. Majumdar, A. K., and M. M. Chakraborty: *Anal. Chim. Acta* 17, 228 (1957).
207. Jasim, F., R. J. Magee, and C. L. Wilson: *Mikrochim. Acta* 160 (1962).
208. Das, M. K.: *Mikrochim. Acta* 1124 (1965).
209. Blasius, E., u. M. Fischer: *Z. Anal. Chem.* 177, 412 (1960).
210. Sato, T. R., H. Diamond, W. P. Norris, and H. H. Strain: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 6154 (1952).
211. Pučar, Z., and Z. Konrad-Jacovac: *J. Chromatog.* 9, 106 (1962).
212. de Carvalho, R. A. G.: *J. Chromatog.* 18, 381 (1965).
213. Bäckmann, K.: *Radiochim. Acta* 4, 124 (1965).
214. Kraak, W., and G. D. Waals: *J. Chromatog.* 20, 197 (1965).
215. Marcu, G., u. K. Samochocka: *Studia. Univ. Babes-Bolyai Chem.* 15 (1965).
216. — — *Studia. Univ. Babes-Bolyai* 71 (1965).
217. Merz, E.: *Z. Anal. Chem.* 221, 331 (1965).
218. Jach, J., H. Kawahara, and G. Harbottle: *J. Chromatog.* 1, 501 (1958).
219. Meikle, R. W.: *Nature* 196, 61 (1962).
220. Shukla, S. K.: *J. Chromatog.* 9, 255 (1962).
221. Adloff, J. P., and R. Bertrand: *J. Electroanal. Chem.* 5, 461 (1963).

222. — Chromatog. Rev. 7, 52 (1965).  
 223. Marazovic, L., and Z. Pušar: J. Chromatog. 27, 450 (1967).  
 224. Grass, F., K. Aizetmüller u. K. Buchtela: Z. Anal. Chem. 228, 261 (1967).  
 225. Shukla, S. K., and J. P. Adloff: J. Chromatog. 8, 501 (1962).  
 226. Clanet, F., J. Clarence, and M. Verry: J. Chromatog. 13, 440 (1964).  
 227. Bachelet, M.: Compt. Rend. 260, 6622 (1965).  
 228. Venkateswarlu, K. S., and V. Subramanyan: Radiochim. Acta 5, 174 (1966).  
 229. Wahl, A. C., and N. R. Bonner: Radioactivity Applied to Chemistry. New York: John Wiley and Sons, Inc. 1951.  
 230. Schmidt, G., u. W. Herr: Z. Naturforsch. 16a, 748 (1961).  
 231. Blasius, E., W. Preetz, and R. Schmitt: J. Inorg. Nucl. Chem. 19, 115 (1961).  
 232. van Ooij, W. J., and J. P. W. Houtman: Radiochim. Acta 7, 115 (1967).  
 232a. — — Z. Anal. Chem. 236, 407 (1968).  
 233. Lederer, M.: The Contribution of Chromatographic and Electrophoretic Methods to the Study of the Chemistry of Aqueous Solutions of Metal Salts, Conferenza tenuta al IV° Corso Estivo di Chimica Inorganica avanzata, Varenna, Italy, 1959.  
 234. Shukla, S. K.: J. Chromatog. 7, 457 (1958).  
 235. Kristjanson, A. M., and M. Lederer: J. Less-Common Metals 1, 245 (1959).  
 236. Shukla, S. K., and M. Lederer: J. Less-Common Metals 1, 255 (1959).  
 237. — J. Less-Common Metals 1, 333 (1959).  
 238. — Thèse. Paris: 1961.  
 239. — J. Chromatog. 8, 96 (1962).  
 240. Blasius, E., and W. Preetz: Chromatog. Rev. 6, 191 (1964).  
 241. Preetz, W., u. E. Blasius: Z. Anorg. Allg. Chem. 332, 140 (1964).  
 242. — Angew. Chem. 77, 734 (1965); intern. Ed. 4, 710 (1965).  
 243. — Z. Anorg. Allg. Chem. 348, 151 (1966).  
 244. Müller, H.: Naturwissenschaften 49, 182 (1962).  
 245. — Z. Anal. Chem. 189, 336 (1962).  
 246. — Habilitationsschrift, Universität Freiburg, 1964.  
 247. — J. Inorg. Nucl. Chem. 27, 1745 (1965).  
 248. Preetz, W., u. H. L. Pfeifer: unveröffentlicht.  
 249. Koch, H., and H. Bruchertseifer: Radiochim. Acta 4, 82 (1965).  
 250. Lederer, M.: Anal. Chim. Acta 17, 606 (1957).  
 251. — J. Electroanal. Chem. 2, 174 (1961).  
 252. Belling, G. B., and R. E. Underdown: Anal. Chim. Acta 22, 203 (1960).  
 253. Grassini, G., and M. Lederer: J. Chromatog. 2, 326 (1959).  
 254. Blasius, E., and G. Schönhard: J. Chromatog. 28, 385 (1967).  
 255. Sansoni, B., u. R. Klement: Angew. Chem. 65, 422 (1953).  
 256. —, u. L. Baumgartner: Z. Anal. Chem. 158, 241 (1957).  
 257. Klement, R., u. H. Frieser: Angew. Chem. 66, 138 (1954).  
 258. Engelke, J. L., and H. H. Strain: Anal. Chem. 26, 1872 (1954).  
 259. Blasius, E., and R. Krämer: J. Chromatog. 20, 367 (1965).  
 260. —, and H. Wagner: J. Chromatog. 26, 549 (1967).  
 260b. Shukla, S. K., M. Bacher, and J. P. Adloff: J. Chromatog. 10, 93 (1963).  
 260c. Gordon, B. M.: J. Inorg. Nucl. Chem. 29, 287 (1967).  
 260d. Behrens, H.: Z. Anal. Chem. 236, 396 (1968).  
 261. Haugaard, G., and T. D. Kroner: J. Am. Chem. Soc. 70, 2135 (1948).  
 262. Grassmann, W.: Angew. Chem. 62, 170 (1959).  
 263. Svensson, H., and I. Brattsten: Arkiv Kemi 1, 409 (1949).  
 264. Grassmann, W., u. K. Hannig: Naturwissenschaften 37, 397 (1950).  
 265. — — Z. Physiol. Chem. 292, 32 (1953).

266. *Durrrum, E. L.*: J. Am. Chem. Soc. *73*, 4875 (1951).  
267. *Strain, H. H.*, and *J. C. Sullivan*: Anal. Chem. *23*, 816 (1951).  
268. *Pučar, Z.*: J. Chromatog. *4*, 261 (1960).  
269. — Chromatog. Rev. *3*, 38 (1961).  
270. *Hannig, K.*: Z. Physiol. Chem. *311*, 63 (1958).  
271. *Sherma, S.*, *G. H. Evans*, *H. D. Frame*, and *H. H. Strain*: Anal. Chem. *35*, 224 (1963).  
272. *Qureshi, M.*, and *A. H. Israili*: Anal. Chim. Acta *41*, 523 (1968).  
273. *Cavallaro, L.*, *C. Bigli* e *G. TrabANELLI*: Ann. Chim. (Rome) *47*, 189 (1957).  
274. *Sansoni, B.*, u. *R. Klement*: Angew. Chem. *66*, 598 (1954).  
275. *Sato, T. R.*, *W. P. Norris*, and *H. H. Strain*: Anal. Chem. *24*, 776 (1952).  
276. — — — Anal. Chem. *26*, 267 (1954).  
277. *Ledever, M.*: Anal. Chim. Acta *11*, 145 (1954).  
278. *Pučar, Z.*, and *Z. Jacovac*: J. Chromatog. *3*, 477 (1960).  
279. *Konrad-Jacovac, Z.*, and *Z. Pučar*: J. Chromatog. *7*, 380 (1962).  
280. *Barvollier, J.*, *E. Watzke* u. *H. Gibian*: Z. Naturforsch. *13b*, 75 (1958).  
281. *Wiek, K.*: J. Chromatog. *13*, 111 (1964).  
282. *Hannig, K.*: Z. Anal. Chem. *181*, 244 (1961).  
283. *Preetz, W.*, u. *H. L. Pfeifer*: unveröffentlicht.  
284. *Hannig, K.*: Habilitationsschrift, Universität München, 1964.  
285. *Schroeder, E.*, and *S. Matthes*: J. Chromatog. *17*, 189 (1965).  
286. *Wiek, K.*, *H. F. v. Oldershausen* u. *F. Klaschka*: Klin. Wochschr. *42*, 357 (1964).  
287. *Hannig, K.*: Z. Physiol. Chem. *338*, 211 (1964).  
288. —, u. *H. Wrba*: Z. Naturforsch. *19b*, 860 (1964).  
289. —, *W. Klofat* u. *H. Endres*: Z. Naturforsch. *19b*, 1072 (1964).  
290. *Kolin, A.*: J. Chromatog. *26*, 164 (1967).  
291. — J. Chromatog. *26*, 180 (1967).  
292. *Bonin, A.*, *M. Chemla* et *P. Sue*: Compt. Rend. *241*, 40 (1955).  
293. *Brewer, A. K.*, *S. L. Madorsky*, and *J. W. Westhaver*: Science *104*, 156 (1946).  
294. — —, *J. K. Taylor*, *V. H. Dibeler*, *P. Bradt*, *O. L. Parham*, *R. J. Britten*, and *J. G. Reid*: J. Res. Natl. Bur. Std. *38*, 137 (1947).  
295. *Madorsky, S. L.*, and *S. Straus*: J. Res. Natl. Bur. Std. *38*, 185 (1947).  
296. *Westhaver, J. W.*: J. Res. Natl. Bur. Std. *38*, 169 (1947).  
297. *Taylor, J. K.*, and *V. H. Dibeler*: J. Res. Natl. Bur. Std. *38*, 158 (1947).  
298. *Klemm, A.*: Z. Elektrochem. *58*, 609 (1954).  
299. *Herzog, W.*, u. *A. Klemm*: Z. Naturforsch. *13a*, 7 (1958).  
300. *Neubert, A.*, u. *A. Klemm*: Z. Naturforsch. *16a*, 685 (1961).  
301. *Clusius, K.*, and *E. R. Ramirez*: Helv. Chim. Acta *36*, 1160 (1953).  
302. *Ramirez, E. R.*: J. Am. Chem. Soc. *76*, 6237 (1954).  
303. — J. Phys. Chem. *62*, 760 (1958).  
304. *Martin, H.*: Z. Naturforsch. *4a*, 28 (1949).  
305. —, u. *E. Ruhtz*: Z. Elektrochem. *54*, 560 (1950).  
306. *Martin, H.*, u. *E. Harmsen*: Z. Elektrochem. *62*, 152 (1958).  
307. —, u. *H. J. Lübke*: Z. Naturforsch. *19a*, 115 (1964).  
308. *Konstantinov, B. P.*, *E. A. Kaimakov* u. *N. L. Varshavskaya*: Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *36*, 535, 540 (1962).  
309. — — Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *36*, 437 (1962).  
310. *Kaimakov, E. A.*: Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *36*, 436 (1962).  
311. *Bakulin, E. A.*, *V. P. Troshin* u. *V. B. Fiks*: Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *38*, 1221 (1964).  
312. *Fiks, V. B.*, u. *E. V. Stepin*: Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *38*, 1219 (1964).

313. — Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *38*, 1218 (1964).
314. *Konstantinov, B. P.*, u. *V. B. Fiks*: Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *38*, 1038, 1216 (1964).
315. *Troshin, Y. P.*: Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *38*, 1116 (1964).
316. *Bakulin, E. A.*: Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *39*, 568 (1965).
317. *Konstantinov, B. P.*, *E. A. Kaimakov* u. *I. V. Basargin*: Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *39*, 442 (1965).
318. —, u. *E. A. Bakulin*: Russ. J. Phys. Chem. (English Transl.) *39*, 1, 315 (1965).
319. *Wagener, K.*: Z. Elektrochem. *64*, 922 (1960).
320. — Habilitationsschrift, Techn. Universität Berlin, 1964.
321. *Thiemann, W.*, u. *K. Wagener*: Z. Naturforsch. *18a*, 228 (1963).
322. *Behne, D.*, u. *K. Wagener*: Ber. Bunsenges. Physik. Chem. *69*, 378 (1965).
323. *Freyer, H. D.*, u. *K. Wagener*: Angew. Chem. *79*, 734 (1967).
324. *Wagener, K.*, u. *B. A. Bilal*: Z. Naturforsch. *21a*, 1352 (1966).
325. *Behne, D.*, *H. D. Freyer* u. *K. Wagener*: Ber. Bunsenges. Physik. Chem. *69*, 893 (1965).
326. *Pretz, W.*: Chem. Ing. Techn. *7*, 798 (1966).
327. — *Talanta* *13*, 1649 (1966).
328. — *Naturwissenschaften* *54*, 85 (1967).
329. —, u. *H. L. Pfeifer*: *Talanta* *14*, 143 (1967).
330. — — *Anal. Chim. Acta* *38*, 255 (1967).
331. —, *S. Datta* u. *U. Wannemacher*: unveröffentlicht.
332. *Schumacher, E.*: *Helv. Chim. Acta* *40*, 221 (1957).
333. —, u. *H. J. Streif*: *Helv. Chim. Acta* *40*, 228, 234 (1957).
334. — *Helv. Chim. Acta* *43*, 2322 (1957).
335. *Friedli, W.*, u. *E. Schumacher*: *Helv. Chim. Acta* *44*, 1829 (1961).
336. *Schumacher, E.*, u. *H. J. Streif*: *Helv. Chim. Acta* *41*, 1771 (1958).
337. *Kiso, Y.*, *I. Yamada*, and *Y. Yamato*: *Bull. Chem. Soc. Japan* *38*, 695 (1965).
338. *Op de Beeck, J.*: *Anal. Chim. Acta* *40*, 221 (1968).
339. *Marcu, G.*: *Studia Univ. Babes-Bolyai, Chem.* *61* (1966).
340. —, u. *C. Lehrer*: *Studia Univ. Babes-Bolyai, Chem.* *67* (1966).
341. *Gee, H. Y.*, *A. H. Heimbuch*, and *M. W. Nathans*: *Anal. Chem.* *39*, 98 (1967).

Eingegangen am 27. Juni 1968

# Neuere Methoden und Geräte der Schmelzpunktbestimmung

Dr. H. Jucker und Dr. H. Suter

Mettler, Forschungslaboratorium, Greifensee (Schweiz)

## Inhalt

1. Einleitung .....	430
1.1. Bedeutung .....	430
1.2. Begriffe und Definitionen .....	431
2. Physikalische Schmelzpunktphänomene .....	432
2.1. Aggregatzustand .....	432
2.2. Mischschmelzen .....	433
2.3. Schmelzwärme .....	434
3. Die visuelle Schmelzpunktbestimmung .....	436
3.1. Im Kapillarröhrchen .....	436
3.2. Mikroskopische Methoden .....	438
3.3. Übrige Methoden .....	440
4. Automatisierung der optischen Methode .....	442
4.1. Bisherige Entwicklung .....	442
4.2. Die Schwellwertmethode .....	443
4.3. Anwendungen .....	446
5. Thermische Methoden .....	454
5.1. Erstarrungspunkt, Haltepunktmethode .....	454
5.2. Differential-Thermoanalyse .....	456
6. Durch Konvention festgelegte Meßpunkte .....	460
6.1. Erweichungspunkt .....	460
6.2. Fließschmelzpunkt, Steigschmelzpunkt .....	461
6.3. Tropfpunkt .....	463
7. Normungsbestrebungen .....	465
7.1. Gesetzliche Vorschriften der Pharmakopöe .....	465
7.2. Testsubstanzen .....	467
8. Literatur .....	470

## 1. Einleitung

### 1.1. Bedeutung

Der Schmelzpunkt gehört zu den ältesten Identifikations- und Prüfungsmethoden, insbesondere für organische Substanzen. Er ist relativ leicht zu bestimmen und läßt sich, da es sich um eine Meßgröße handelt, bequem tabellieren und klassieren. Da der Schmelzpunkt stark reinheitsab-

hängig ist, dient er auch zur *Qualitätsbeurteilung* von Substanzen. Es gibt heute umfangreiche Tabellenwerke, die entweder nach den Zahlenwerten der Schmelzpunkte oder aber nach der chemischen Formel geordnet sind. In der Schmelzpunkttafel sind im allgemeinen in Intervallen von  $11^{\circ}\text{C}$  die entsprechenden Verbindungen aufgeführt.

Das Schmelzverhalten von organischen Stoffen gibt aber auch Aufschluß über die qualitative Zusammensetzung. Insbesondere die von *Kofler* <sup>8)</sup> eingeführten Methoden der Thermomikroskopie erlauben es, die Eigenschaften des Mischschmelzpunktes oder von Hilfsreaktionen zur Identifikation beizuziehen. Kennt man die Mischschmelzdiagramme von binären oder ternären Gemischen, ist es möglich, zu qualitativen und quantitativen Resultaten gleichzeitig zu gelangen. Über den Reinheitsgrad der zu prüfenden Substanz lassen sich so sehr genaue Angaben machen.

Der Schmelzpunkt ist also eine der verbreitetsten Bestimmungsmethoden in der organischen Chemie, hat aber bei Verbesserung der Meßmethode noch *bedeutend mehr Aussagekraft als heute im allgemeinen ausgenützt wird*. Es schien daher lohnend, die Bestimmungsmethoden vergleichend zu überprüfen und Verbesserungen vorzuschlagen.

## 1.2. Begriffe und Definitionen

Reine kristalline Stoffe gehen bei einer genau definierten Temperatur in den flüssigen Zustand über. Diese Temperatur wird *Schmelzpunkt* (Schmelztemperatur) genannt und bleibt während des Schmelzens konstant. Sie ist charakteristisch für jeden kristallinen Stoff und hängt nur vom Druck ab. Die Druckabhängigkeit ist allerdings unbedeutend, bei Wasser beispielsweise beträgt die Schmelzpunktänderung bei einer Druckänderung von 10 Atm nur  $0,015^{\circ}\text{C}$ . Kühlt man eine Schmelze oder eine Flüssigkeit ab, dann erfolgt der Übergang in den festen Zustand bei derselben Temperatur, die in diesem Falle Erstarrungstemperatur (*Erstarrungspunkt*) genannt wird. Die meisten Verbindungen lassen sich allerdings mehr oder weniger stark unterkühlen, d.h. der Übergang vom flüssigen in den festen Zustand erfolgt mit Verspätung, da Kristallisationskeime fehlen. Eine solche unterkühlte Flüssigkeit ist aber nicht stabil und erstarrt nach Impfung mit einem Kristall oder oft schon bei Erschütterung sehr schnell, wobei die Temperatur dann auf die Erstarrungstemperatur steigt und dort so lange konstant bleibt, bis die gesamte Flüssigkeit erstarrt ist. Kristalliner Stoff und Schmelze können also nur beim Schmelzpunkt dauernd nebeneinander existieren.

Taucht ein Thermometer in die feste Substanz und wird das ganze Probenrohr linear aufgeheizt, so ergeben sich die in Abb. 1 dargestellten Verhältnisse. Solange die Substanz fest ist, wird die Temperatur in der

Probe entsprechend der spezifischen Wärme der Substanz linear ansteigen. Beginnt die Substanz zu schmelzen, so muß die Schmelzwärme zugeführt werden. Bis dies der Fall ist, wird die Temperatur in der Probe konstant bleiben und der Schmelztemperatur entsprechen. Ist die Substanz vollständig geschmolzen, so steigt die Temperatur wiederum linear an, bis die Siedetemperatur erreicht wird, dort entsprechend wird die Temperatur wieder konstant bleiben, bis die Verdampfungswärme zugeführt ist.

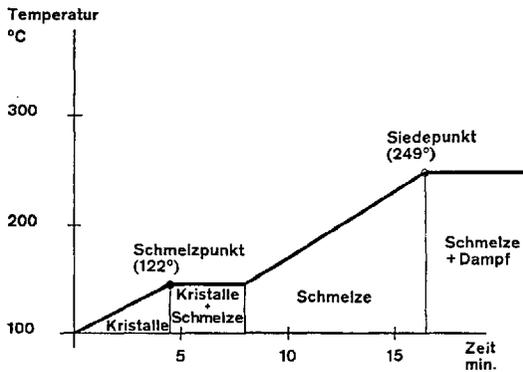


Abb. 1. Probestemperatur in Abhängigkeit der zugeführten Wärme (Beispiel: Benzoesäure)

Diese Definitionen gelten nur für mehr oder weniger reine Verbindungen, die zudem eine gewisse Schmelzwärme aufweisen. Bei einem Gemisch von Kohlenwasserstoffen (Paraffin) beispielsweise ist der Übergang gleitend; man spricht von einem *Erweichungspunkt*. Da jedoch auch Fette, Öle, Paraffine und Wachse charakteristische thermische Punkte aufweisen, wurden hier Meßpunkte durch Konventionen festgelegt. Diese Meßpunkte beziehen sich stets auf eine genau definierte meßtechnische Anordnung. Vor allem haben der *Erweichungspunkt*, der *Fließschmelzpunkt*, der *Steigschmelzpunkt* und der *Tropfpunkt* in der Technik Eingang gefunden. Die genauen Definitionen werden in Kapitel 6 gegeben.

## 2. Physikalische Schmelzpunktphänomene

### 2.1. Aggregatzustand

Die meisten visuellen und automatischen Meßmethoden für den Schmelzpunkt bedienen sich der bei der Änderung des Aggregatzustandes sichtbar werdenden Phänomene. Der feste Zustand entspricht dem Zustand

höchster Ordnung, die Bausteine der Verbindung sind in geometrischer Anordnung beinahe starr. Das Kristallgitter manifestiert sich optisch im Phänomen der Doppelbrechung, der Reflexion und der Beugung von elektromagnetischer Strahlung beinahe aller Wellenlängen. Die Flüssigkeit dagegen weist eine sehr schwache geometrische Ordnung auf, Ionen und Moleküle bewegen sich mit Geschwindigkeiten von Bruchteilen von Millimetern bis zu Millimetern in der Minute. Die Struktur ist für Licht der meisten Wellenlängen nicht erkennbar. Im gasförmigen Zustand schließlich ist die Anordnung völlig willkürlich, die Moleküle bewegen sich mit Geschwindigkeiten von einigen hundert Metern in der Sekunde.

Aus diesen Eigenschaften lassen sich die möglichen Bestimmungsmethoden ableiten. Beim Übergang fest-flüssig ändern sich folgende optische und mechanische Eigenschaften:

optische Dichte  
Doppelbrechung  
Beugung  
Geometrie  
Festigkeit, Viscosität  
Reflexionsvermögen

in selteneren Fällen auch:

Farbe  
elektrische Leitfähigkeit

Daraus lassen sich verschiedene mögliche Bestimmungsverfahren ableiten, in erster Linie offensichtlich visuelle oder automatisch-optische Verfahren.

## 2.2. Mischschmelzen

Ist eine Substanz verunreinigt oder sind zwei Substanzen gemischt, ändert sich der Schmelzpunkt. Abb. 2 zeigt ein klassisches Diagramm für zwei Substanzen. Auf der Abszisse ist das Mischungsverhältnis Substanz A zu Substanz B aufgetragen, die Ordinate zeigt die zugehörige Schmelztemperatur. Bei 100% A bzw. 100% B entsprechen die Temperaturen genau dem Schmelzpunkt der reinen Substanz A bzw. der reinen Substanz B. Dazwischen liegen die Schmelztemperaturen der Mischung tiefer, um beim Punkt E das Minimum, das sog. Eutektikum zu erreichen. Entsprechend dem Diagramm kristallisieren in der Zone A + Schmelze reines A, in der Zone B + Schmelze reines B, während unterhalb der eutektischen Temperatur sich alles im festen Zustand befindet und über der Schmelzkurve alles geschmolzen ist. Das Diagramm wird für Stoffe,

die Mischkristalle bilden, wesentlich komplizierter. Aus diesem Verhalten lassen sich über die Schmelzpunktbestimmung Reinheitsprüfungen aufbauen.

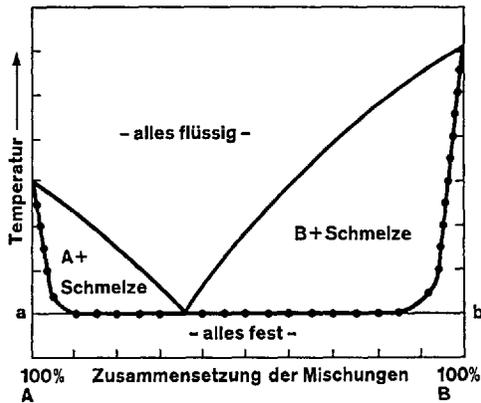


Abb. 2. Schmelzdiagramm eines binären Systems

### 2.3. Schmelzwärme

Wie bereits im Kapitel 1.2. beschrieben, ist der Übergang fest-flüssig vor allem durch den Verbrauch der *Schmelzwärme* charakterisiert. Die Ermittlung des Haltepunktes im Temperaturanstieg zählt somit zu den wesentlichsten Bestimmungsmethoden des Schmelzpunktes. Entsprechend kommt auch dem Wärmetransfer in die zu messende Probe grundsätzliche Bedeutung zu. In kleinen Proben ist es ja nicht möglich, ein Thermometer in die Substanz einzubetten, da nur einige Milligramme zur Verfügung stehen. Abb. 3. veranschaulicht die Situation. Es geht also darum, Wärme in ein Probengefäß zu transferieren. Während die Temperatur des umgebenden Wärmebades dauernd ansteigt, muß die Wärme zuerst durch die Gefäßwand (meistens Glas) zur pulvrigen Sub-

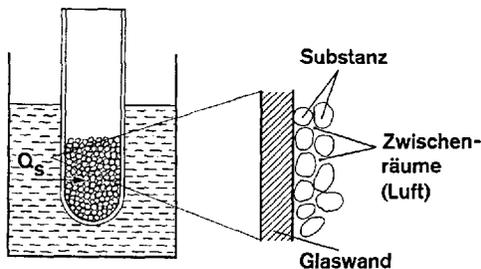


Abb. 3. Transfer der Schmelzwärme in die Probe, rechts Detail vergrößert

stanz gelangen. Die pulvrigen Körner andererseits weisen nur kleine Berührungsflächen auf, so daß die Wärme zwischen jedem Korn einen weiteren Widerstand zu überwinden hat. Wir setzen nun voraus, daß in unserem Apparat mit den klassischen Schmelzpunktkapillaren und 1–2 mg Substanz mittlerer Schmelzwärme gearbeitet werden soll. Abb. 4 zeigt, wieviel Zeit bei den verschiedenen Aufheizgeschwindigkeiten verstreicht, bis die Schmelzwärme  $QS$  zugeführt worden ist. Daraus läßt sich andererseits ableiten, daß für eine Anstiegsgeschwindigkeit von  $10^{\circ}\text{C}$  pro Minute ein Fehler in der Schmelzpunktindikation von etwa  $3\text{--}5^{\circ}\text{C}$ , bei  $2^{\circ}\text{C}$  pro Minute ein Fehler von etwa  $1\text{--}1,5^{\circ}\text{C}$  entsteht. Eine erste wesentliche Voraussetzung zur Entwicklung einer Meßmethode ist also gegeben: die Anstiegsgeschwindigkeit muß linear und für Präzisionsmessungen außerdem klein sein. Ist die Anstiegsgeschwindigkeit nicht linear, so wird an jedem Punkt der Kurve eine andere Schmelzverzögerung auftreten, sie läßt sich nicht korrigieren.

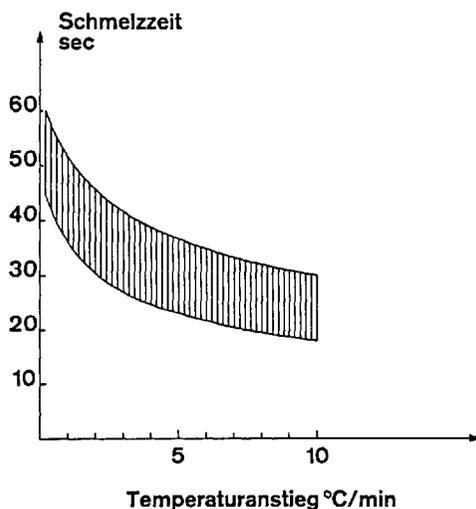


Abb. 4. Schmelzzeit als Funktion des Temperaturanstieges

In letzter Zeit ist man auch dazu übergegangen, die Schmelzwärme zum Schmelzpunktkriterium auszubauen. Dazu dient die sog. *Differential-Thermoanalyse* (DTA). In einem linear aufheizbaren Ofen befinden sich in einem Tiegel die zu messende Probe, im anderen Tiegel eine inerte Referenzsubstanz, z.B. Aluminiumoxyd. In beide Tiegel taucht ein Temperaturfühler, z.B. ein Thermoelement oder ein Thermistor. Schaltet

man nun die beiden Fühler als Meßbrücke, so läßt sich die Temperaturdifferenz der beiden Probenmitten als Funktion der Ofentemperatur darstellen. Im Schmelzpunkt zeigt sich nun ein deutlicher Peak, der auch über den Schmelzverlauf Auskunft gibt.

### 3. Die visuelle Schmelzpunktbestimmung

#### 3.1. Im Kapillarröhrchen

Bei der klassischen Methode zur Bestimmung von Schmelzpunkten verwendet man als Probengefäß eine Kapillare. Es handelt sich dabei um ein einseitig zugeschmolzenes Glasröhrchen mit einer lichten Weite von ca. 1 mm und einer Wanddicke von 0,1–0,2 mm. Die fein pulverisierte Substanz wird bis zu einer kompakten Schichthöhe von 2–3 mm in das Kapillarröhrchen eingefüllt. Die Probe wird in einem Heizbad, dessen Temperatur gemessen wird, mit einer bestimmten Geschwindigkeit aufgeheizt, wobei die Substanz dauernd beobachtet wird. Die Temperatur, bei welcher die Substanz schmilzt, wird als Schmelzpunkt abgelesen und notiert.

Eine einfache, häufig verwendete Anordnung ist der Schmelzpunktapparat nach *Thiele* <sup>1)</sup>. Die an einem Thermometer befestigte Kapillare taucht in ein flüssiges Heizbad, welches bis über den Ansatz des oberen Schenkels reicht. Beim Erhitzen des Apparates mit einer Gasflamme beginnt die Badflüssigkeit (Schwefelsäure, Paraffinöl, Siliconöl) zu zirkulieren, wobei sie in dem senkrechten Teil des Rohres von oben nach unten strömt. Die Quecksilberkugel des Thermometers und das geschlossene Ende der Kapillare sollen sich in mittlerer Höhe der Badflüssigkeit befinden.

In zahlreichen Varianten wird der von *Roth* <sup>2)</sup> beschriebene Apparat verwendet, der vom Deutschen Arzneibuch vorgeschlagen wird. Ein Reagenzglas von 2 cm Durchmesser und 30 cm Länge wird in einen Rundkolben eingesetzt, dessen Kugel ein Volumen von etwa 100 ml und dessen Hals einen Durchmesser von 3 cm und eine Länge von 20 cm aufweist. Im Reagenzglas befindet sich eine 4 cm hohe Schicht Badflüssigkeit, beispielsweise *Siliconöl*. Der Rundkolben wird so weit gefüllt, daß die Kugel nach dem Einsetzen des Reagenzglases mit Flüssigkeit ausgefüllt ist. Das Thermometer, an welchem ein 1 ml-Mikrobecherglas zur Aufnahme des Kapillarröhrchens angebracht ist, wird mit Hilfe eines durchbohrten Stopfens eingesetzt. Der Apparat wird mit einer regulierbaren Gasflamme beheizt.

Die Schmelzpunktapparate mit Flüssigkeitsbädern sind im Laufe der Zeit stark verbessert worden. Die wesentlichen Neuerungen sind der Einbau eines Rührwerkes, sowie eine regulierbare elektrische Heizung. Das Hauptmerkmal des von *Tottoli* <sup>3)</sup> und *Ebert* <sup>4)</sup> beschriebenen Apparates ist ein U-förmiges Glasgefäß (Abb. 5), dessen beide oben offene Schenkel in der Mitte durch eine Querverbindung miteinander kommunizieren. In einem der Schenkel befindet sich ein Rührer, welcher durch den darüber angeordneten Elektromotor angetrieben wird.

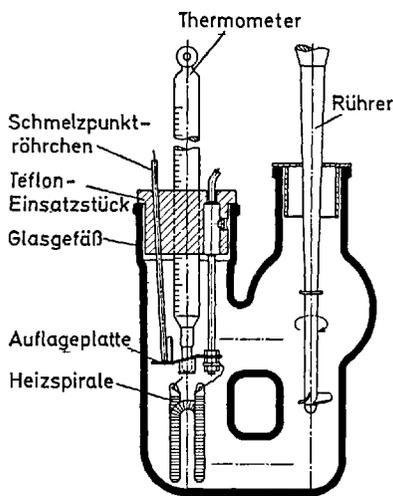


Abb. 5. Schmelzpunktapparat nach *Tottoli*

Der zweite Schenkel wird mit einem Teflon-Einsatz, der die Bohrungen zur Aufnahme des Thermometers und der Proberöhrchen enthält, verschlossen. Außerdem sind am Einsatz die Heizspirale mit der Zuleitung sowie eine Auflageplatte befestigt. Auf die Platte, die in die Heizflüssigkeit eintaucht, kommen die drei Schmelzpunktröhrchen und das Thermometer zu stehen. Das U-Gefäß wird so hoch mit Siliconöl gefüllt, daß dieses durch das Verbindungsrohr zirkulieren kann und die unteren Enden der Schmelzpunktröhrchen und das Thermometer genügend tief eintauchen. Die stufenlose Regulierung des Heizstromes erfolgt mit einem Regeltransformator.

*Berl* und *Kuhlmann* <sup>5)</sup> beschreiben einen Metallblockofen. Er besteht aus einem Kupferzylinder mit zwei weiten Bohrungen für die Thermometer und zwei engeren für die Kapillarröhrchen. Thermometer und Kapillaren müssen zwecks guter Wärmeleitung dem Metall fest anliegen. Zur Beobachtung der Substanz sind senkrecht zu den Kapillarbohrungen Querkanäle vorhanden, die mit Quarzglas- oder Glimmerfenstern verschlossen werden. Die Probe wird mit einer Lupe gegen eine mit Papier diffus abgeblendete, hinter dem gegenüberliegenden Fenster befindliche Lichtquelle beobachtet. Der mit Asbest umkleidete Zylinder ist mit Widerstandsdraht zur elektrischen Beheizung umwickelt. *Matthäus* und *Sauthoff* <sup>6)</sup> schlagen einen ähnlichen Metallblockofen, bei welchem jedoch die Probe im schräg seitwärts einfallenden Licht beobachtet wird, vor. Solche zum Teil mit Gas beheizte Apparate werden heute noch verwendet.

### 3.2. Mikroskopische Methoden

Unter thermomikroskopischer Analyse versteht man Methoden, mit welchen das thermische Verhalten von Substanzen oder Substanzgemischen mikroskopisch untersucht werden kann. Ausgangspunkt und Grundlage dieses Verfahrens bildet die *Schmelzpunktbestimmung unter dem Mikroskop*, die sogenannte Mikro-Schmelzpunktbestimmung. Diese wurde erstmals von *Lehmann*<sup>7)</sup> erwähnt. Die Mikro-Schmelzpunktbestimmung erfordert sehr geringe Substanzmengen. Außerdem kann, im Gegensatz zur Kapillarröhrchenmethode, das Verhalten von einzelnen Kristallen vor und während des Schmelzens untersucht werden. Vorgänge wie Zersetzung, Verfärbung, polymorphe Umwandlungen, Abgabe von Kristallwasser usw. können direkt beobachtet werden.

Erst durch die umfangreichen Arbeiten von *L. und A. Kofler*<sup>8)</sup> haben die Thermo-Mikromethoden, vorab die Mikro-Schmelzpunktbestimmungen, im chemischen Laboratorium allgemein Verbreitung gefunden.

Eine genaue Bestimmung der *eutektischen Temperatur* von binären Gemischen unter dem Mikroskop gestattet eine systematische Identifizierung organischer Verbindungen. Substanzen mit gleichem oder ähnlichem Schmelzpunkt können unterschieden werden, wenn man sie mit geeigneten Testsubstanzen mischt und die eutektischen Temperaturen der Mischungen vergleicht. In umfangreichen Tabellenwerken<sup>8,9)</sup> sind die eutektischen Temperaturen der nach steigendem Schmelzpunkt geordneten Substanzen mit zwei Testsubstanzen angegeben.

Vorrichtungen zur Durchführung von thermomikroskopischen Analysen sind unter dem Namen Heiztisch, Heiztischmikroskop, Mikro-Schmelzpunktapparat bekannt. Ein Heiztisch besteht im Prinzip aus einer heizbaren Metallplatte mit einer Bohrung in der Mitte, welche den Durchtritt des Lichtes ermöglicht. Ein Objektträger, auf welchem sich die mit einem Deckglas abgedeckte Substanz befindet, liegt während der Untersuchung auf der Metallplatte. Das Präparat wird mit einem Mikroskop entweder im durchfallenden, vorzugsweise polarisierten oder im auffallenden Licht bei 60–100-facher Vergrößerung betrachtet (Abb. 6). Die Temperaturmessung erfolgt in der Regel mit Thermoelementen oder Glasthermometern. Bei dem von *Kofler und Hilbeck*<sup>10)</sup> beschriebenen Apparat dient zur Temperaturmessung ein Kupfer-Konstantan-Thermoelement und ein Millivoltmeter. Eine der Lötstellen des Thermoelementes ist auf der Heizplatte neben dem mikroskopischen Präparat befestigt, soll also immer die gleiche Temperatur haben wie die zu untersuchende Substanz. Bei anderen zum Teil käuflichen Apparaten wird die Temperatur mit Glasthermometern gemessen. Direkt unter der Oberfläche der Heizplatte ist eine passende Metallhülse mit einem offenen Ende ange-

bracht, in welche das Thermometer seitlich eingeschoben wird. Die Hülse endet unmittelbar neben der für den Lichtdurchtritt vorhandenen zentralen Bohrung der Heizplatte, so daß sich die Quecksilberkugel des Thermometers unterhalb des Präparates befindet. Apparate nach dem in Abb. 6 dargestellten Prinzip wurden von *Kofler*<sup>8)</sup> entwickelt und beschrieben. Die elektrische Widerstandsheizung wird mit einem Transformator oder einem Schiebewiderstand geregelt. Bei derartigen Anordnungen besteht zwischen Thermometer und Präparat stets ein von der Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit abhängiges Temperaturgefälle, welches besonders bei höheren Temperaturen stark ausgeprägt ist und bei Nichtbeachtung große Meßfehler ergibt. In der Praxis wird dieser Fehler durch Eichung mit reinen Substanzen, deren Schmelz- bzw. Erstarrungstemperaturen mit der erforderlichen Genauigkeit bekannt sind, experimentell ermittelt und graphisch oder tabellarisch als Funktion der Temperatur und der Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit dargestellt.

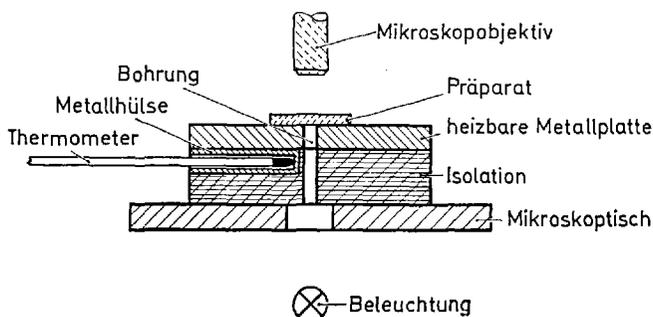


Abb. 6. Prinzipschema eines Heiztisches

*Suter* und *Scheidegger*<sup>11)</sup> beschreiben einen *neuartigen Heiztisch*, bei welchem das Prinzip der beidseitigen Beheizung des Präparates<sup>12, 13)</sup> zur Anwendung kommt. Der Objektträger mit der Substanz befindet sich in einem flachen, rechteckigen Probenraum des aus zwei Metallplatten bestehenden Ofenheizkörpers und kann während der Untersuchung mit einem Kreuztisch verschoben werden. Zur homogenen Wärmeverteilung sind die Heizelemente entsprechend angeordnet. Die Temperatur wird mit einem Platin-Widerstandsthermometer, welches in der unteren Platte nahe der runden Beobachtungsöffnung eingebettet ist, gemessen. Der aus den beiden Heizplatten bestehende Ofen ist in ein doppeltes Gehäuse eingebaut. Eine wirksame Wärmeisolation wird durch Verspiegelung des inneren Gehäuses und durch Kühlluft, welche mittels eines Ventilators zwischen dem inneren und äußeren Gehäuse durchgeblasen wird, erreicht.

Die Beobachtungsöffnung ist durch ein Wärmeschutzfilter abgedeckt. Durch diese Maßnahmen gelingt es, nach oben und nach unten über kurze Distanzen ein Wärmegefälle von  $300^{\circ}\text{C}$  auf Raumtemperatur zum Schutze der empfindlichen Mikroskopteile herzustellen. Der Heiztisch ist mitsamt der oberen Heizplatte aufklappbar, so daß der Probenraum frei zugänglich wird (Abb. 7). Er ist über ein Kabel mit einem Steuergerät verbunden. Dieses enthält die elektrischen Schaltungen, die Bedienungs-

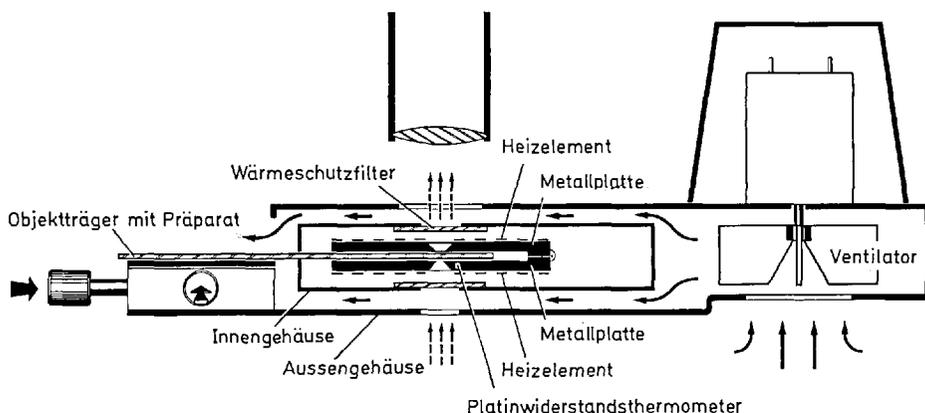


Abb. 7. Querschnitt des Heiztisches nach Suter und Scheidegger

organe, sowie die Zählwerke für die digitale Temperaturanzeige und die Speicherung der Resultate (siehe Abschnitt 4.2.). Zur Erreichung der außergewöhnlichen Genauigkeit der Temperaturmessung, welche unterhalb  $100^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  und zwischen  $100$  und  $300^{\circ}\text{C} \pm 1/100$  beträgt, ist das Platinwiderstandsthermometer des Heiztisches mit dem zugehörigen Steuergerät individuell geeicht. Es besteht die Möglichkeit, die Heiztischtemperatur konstant zu halten oder mit verschiedenen, wählbaren Geschwindigkeiten ansteigen zu lassen. Durch die Linearität der Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit wird die Reproduzierbarkeit der Resultate stark verbessert.

### 3.3. Übrige Methoden

Die von Kofler<sup>8)</sup> entwickelte Heizbank dient vor allem zur raschen, orientierenden Bestimmung von Schmelzpunkten und eutektischen Temperaturen. Sie besteht aus einem 37 cm langen und 4 cm breiten flachen Metallkörper, der auf der einen Seite elektrisch geheizt wird. Durch geeignete Maßnahmen wird auf der verchromten Oberfläche ein annähernd lineares Temperaturgefälle von ca.  $260$  auf  $50^{\circ}\text{C}$  erzeugt.

Ein Eisenwasserstoff-Widerstand dient als Spannungsstabilisator und sorgt für gleichbleibende Erwärmung. Die gepulverte Substanz wird auf die Oberfläche der Bank aufgestreut, wobei je nach Reinheit des Stoffes eine mehr oder weniger scharfe Grenze zwischen fester und flüssiger Phase entsteht. Die Ablesung erfolgt über einen Abdeckzeiger an Temperaturlinien von 2 zu 2° C. Die Meßgenauigkeit wird mit 1–2° C angegeben. Die Koflerbank muß vor Gebrauch mit Substanzen bekannten Schmelzpunktes geeicht werden, da die Temperatur an einer bestimmten Stelle unter anderem auch von der Umgebungstemperatur abhängig ist. Bei Verwendung schlechter Eichpräparate werden auch die zu bestimmenden Schmelzpunkte ungenau. Da bei gealtertem Eisenwasserstoff-Widerstand die Linearität der Bank teilweise verloren geht, soll die Bank nicht nur an einer einzigen Stelle geeicht werden.

Ein zu wenig bekanntes Verfahren ist der sogenannte *Sofortschmelzpunkt*, der von der Pharmacopée Française <sup>14)</sup> als zweite Methode empfohlen wird. Die Vorrichtung besteht aus einem heizbaren Messingblock mit polierter Oberfläche und einer Bohrung zur Einführung des Thermometers. Während der Block aufgeheizt wird, streut man in kurzen Zeitabständen kleine Mengen der gepulverten Substanz auf die Blockoberfläche und notiert diejenige Temperatur, bei welcher die Substanz ohne Verzögerung schmilzt. Hierauf wird bei fallender Blocktemperatur in gleicher Weise die Temperatur, bei welcher die Substanz eben nicht mehr sofort schmilzt, ermittelt. Der Sofortschmelzpunkt ist das arithmetische Mittel aus beiden Ablesungen.

Schließlich lassen sich auch noch *Reflexion* und *Doppelbrechung* zur Schmelzpunktsindikation verwenden <sup>15, 16)</sup>. Die pulvrige Substanz wird mit polarisiertem Licht beleuchtet und mit einem Analysator wieder beobachtet. Die Reflexion an den vielen Flächen und Bruchstellen dreht die Polarisations ebene, so daß die Kristalle hell leuchten. Dies gilt nicht für das die Substanz umschließende Röhrchen, das nach diesem Verfahren völlig unsichtbar bleibt. Andererseits sind auch vollkommen schwarze

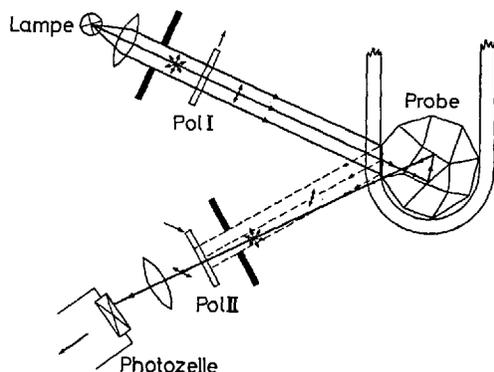


Abb. 8. Prinzip der Reflexionsmethode

Substanzen, die kristallin vorliegen, deutlich sichtbar. Dieses Verfahren erlaubt es, entweder unter dem Mikroskop mit Auflicht oder mit einer besonderen Einrichtung mit Photozelle die Schmelzpunkte von vollkommen schwarzen oder undurchsichtigen Substanzen zu bestimmen (Abb. 8). Die Verwendung einer Brewsterplatte oder einer Ringoptik erlaubt das Arbeiten mit koaxialen Strahlen, was in einem geschlossenen Ofen bedeutend leichter möglich ist, da konvergierende Strahlen entweder zwei Betrachtungsöffnungen oder eine sehr große Ofenöffnung erfordern würden.

#### 4. Automatisierung der optischen Methode

##### 4.1. Bisherige Entwicklung

Visuelle Schmelzpunktbestimmungen sind wegen der subjektiven Interpretation des Schmelzvorganges sehr unzuverlässig. Die von verschiedenen Beobachtern mit ein und derselben Substanz auf der gleichen Apparatur gefundenen Resultate weichen in der Regel beträchtlich voneinander ab. Da der Schmelzpunkt oder das Schmelzintervall sehr häufig zur Bestimmung der Reinheit einer Substanz herangezogen wird, drängt sich eine Methode auf, welche von der persönlichen Arbeitstechnik der Bedienungsperson *unabhängige* Ergebnisse liefert. Nur so ist es überhaupt möglich, Resultate, welche in verschiedenen Laboratorien erhalten werden, unter Berücksichtigung der für Reinheitsbestimmungen geforderten Genauigkeit miteinander zu vergleichen. Bekanntlich wird die durch Strahlung übertragene Lichtenergie von einer Substanz zum Teil

reflektiert,  
absorbiert und  
durchgelassen.

Alle drei Energieanteile ändern sich während des Schmelzvorganges und können grundsätzlich zu seiner objektiven Erfassung herangezogen werden. Unmittelbar auf optischem Wege meßbar sind nur Transmission und Reflexion. Versuche, auf diese Weise Schmelzpunkte und Schmelzintervalle objektiv zu erfassen, sind bekannt. *Kardos* <sup>17)</sup> erläutert eine modifizierte thermomikroskopische Versuchsanordnung zur Bestimmung von Schmelzpunkten. Dabei wird die Intensität des vom mikroskopischen Präparat durchgelassenen Lichtes mit einer Selen-Photozelle gemessen und auf einem Galvanometer angezeigt. Zur Aufnahme von Schmelzkurven werden Temperatur und Photostrom von Zeit zu Zeit abgelesen und in einem Diagramm eingetragen. In diesem Zusammenhang wird auf die Möglichkeit der Automatisierung des Verfahrens hingewiesen.

Eine ähnliche Apparatur wird von *Kolb* u. Mitarb. <sup>18)</sup> vorgeschlagen. Die Änderung der Doppelbrechungsintensität des Präparates wird mit einer mit dem Mikroskop verbundenen Photozelle gemessen und auf der y-Achse eines xy-Schreibers registriert. Die Heiztischtemperatur wird mit einem Kupfer-Konstantan-Thermoelement erfaßt und auf die x-Achse des Schreibers übertragen. Auf diese Weise können Schmelzkurven von organischen Substanzen und Polymeren aufgenommen werden, wobei das Präparat gleichzeitig beobachtet oder fotografiert werden kann.

In einer Patentschrift <sup>19)</sup> werden ein Verfahren sowie ein Gerät zur Bestimmung des Schmelzpunktes von hochpolymeren Substanzen beschrieben. Die Lichtdurchlässigkeit oder das Reflexionsvermögen der Probe wird in Abhängigkeit der Temperatur beobachtet und aus ihrer Änderung auf den Schmelzpunkt geschlossen. Die Intensität des durchgelassenen oder reflektierten Lichtes kann mit Photozellen, Photowiderständen oder Bolometern gemessen werden.

Die Automatisierung der optischen Methode wurde ganz besonders von *Jucker* u. Mitarb. <sup>20)</sup> untersucht. Dabei wurde eine Apparatur entwickelt, welche sowohl die Registrierung von Schmelzkurven als auch die Bestimmung von Schmelzpunkten nach der sogenannten „Schwellwertmethode“ gestattet.

#### 4.2. Die Schwellwertmethode

Das Kernstück der von *Jucker* u. Mitarb. <sup>20)</sup> beschriebenen Apparatur ist ein zylindrischer Aluminiumblockofen (Abb. 9). Der Heizdraht liegt außen in einer isolierten Spiralnut mit kleinem Wärmewiderstand. Der

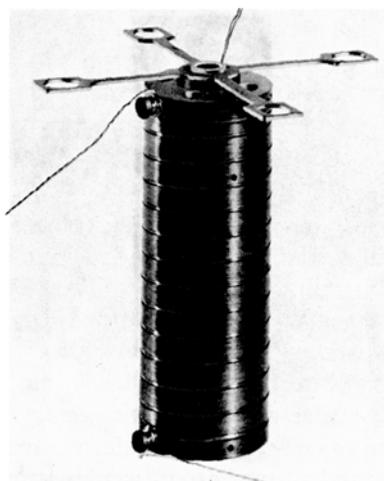


Abb. 9. Aluminiumblockofen

Ofen enthält eine mittlere Bohrung für die zentrische Beleuchtung mit Lichtleitstab. Auf einem Kreis befinden sich vier kleine Bohrungen, davon drei für Proberöhrchen und eine für den Temperaturfühler. Einen Querschnitt durch den Ofen zeigt die in Abb. 10 dargestellte Prinzipskizze. Sie veranschaulicht die photoelektrische Erfassung des Schmelzvorganges. Das zur Beleuchtung im Durchlichtverfahren benötigte Licht kommt von einer zentral unter dem Ofenkörper angeordneten Glühlampe. Das Licht wird über einen als Lichtleiter wirkenden Glasstab zu den um dessen Kegelspitze herum angeordneten Querbohrungen geleitet und beleuchtet die in ihren Meßkanälen eingesetzten Proben. Als Probengefäße werden Schmelzpunktröhrchen mit einer speziell kleinen Toleranz des äußeren Durchmessers von  $\pm 0,1$  mm verwendet. Lichtdetektor ist ein Photowiderstand mit einem zwischen 600 und 650 nm liegenden Empfindlichkeitsmaximum. Der Träger des Ofens sowie das äußere Gehäuse sind zwecks Erreichung größtmöglicher Symmetrie rund und zentrisch angeordnet. Ein rohrförmiger Spiegel dient als Wärmereflektor. Die Ofeneinheit ist über ein Kabel mit einem Steuergerät verbunden.

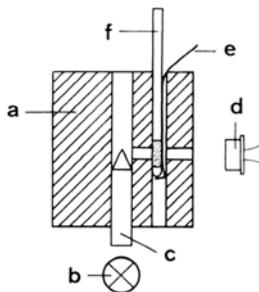


Abb. 10. Prinzip der photoelektrischen Schmelzpunkterfassung. *a* Ofenkörper; *b* Beleuchtungslampe; *c* Lichtleiter; *d* Photowiderstand; *e* Anschlagfeder; *f* Glas-kapilläre mit Substanz

Die Temperatur des vom Steuergerät elektronisch geregelten Ofens wird mit einem geeichten Platin-Widerstandsthermometer gemessen und kann an einem Zählwerk digital abgelesen werden. Die Regelung erfolgt mit einer Sollwert-Istwert-Vergleichsschaltung. Der Temperaturfühler meldet die aktuelle Ofentemperatur ins Steuergerät. Dort wird das Signal mit dem Sollwert des Sollwertgebers verglichen, die Differenz verstärkt und über die Leistungsstufen der Heizwicklung zugeführt. Der mechanische Zähler wird durch einen Schrittmotor, dessen Geschwindigkeit durch einfache elektrische Umschaltung variiert werden kann, über ein Stirnrad angetrieben. Die Zahlenrollen sitzen auf einzelnen Achsen. Das elektrische

Programm zur Vorgabe des Temperatursollwertes ist durch das Getriebe stark gekuppelt. Da bei Platin-Widerstandsthermometern der Zusammenhang zwischen Temperatur und Widerstand nicht linear ist, muß dem Sollwert eine dem Temperaturfühler analoge Charakteristik gegeben werden. Die mit der Anordnung erreichbare Genauigkeit der Temperaturmessung beträgt  $\pm 0,1^\circ \text{C}$  unterhalb  $100^\circ \text{C}$  und  $\pm 1\text{‰}$  zwischen  $100$  und  $300^\circ \text{C}$ . Es besteht die Möglichkeit, die Ofentemperatur konstant zu halten oder mit verschiedenen wählbaren Geschwindigkeiten linear ansteigen zu lassen.

Gemeinsam bei allen Substanzen ist die letzte Phase des Schmelzvorganges. Sie zeigt einen sehr ausgeprägten abrupten Übergang von der rasch zunehmenden Lichtdurchlässigkeit auf einen konstanten Wert. Da sich die Endwerte für alle Substanzen (farbige ausgenommen) in der gleichen Größenordnung bewegen, wurde etwas unterhalb des Knickpunktes ein *Schwellwert festgelegt*. Wird dieser Schwellwert überschritten,

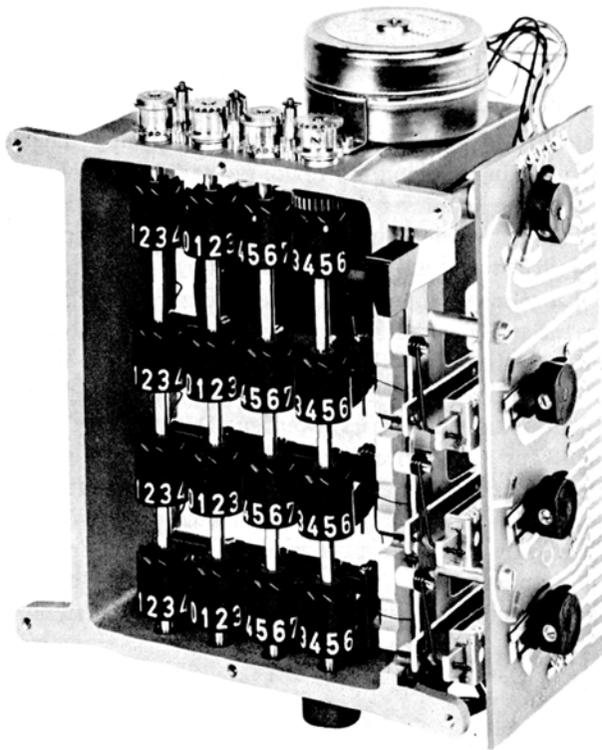


Abb. 11. Speicherzählwerk

so gilt die Substanz als geschmolzen. Zur Anzeige der Schmelzpunkte wurde ein neuartiges Speicherzählwerk (Abb. 11) entwickelt. Die Zahlenrollen der drei übereinanderliegenden Speicherzähler sitzen auf kleinen, in die Einzelachsen eingepreßten Bolzen und werden in der Stellung des Hauptzählers mitgeführt. Ihre Stellung entspricht der aktuellen Ofentemperatur. Sie sind jedoch durch eine Blende verdeckt und somit für den Bedienenden nicht sichtbar. Erreicht eine Probe den Schwellwert, so hebt ein Rechen, ausgelöst durch eine elektromechanische Sperrklinke, die Zahlenrollen auf ihren senkrecht stehenden Achsen an, löst sie von den Kupplungsbolzen und rastet sie in einem Gegenhalter. Die Achsen können darnach leer weiterdrehen. Durch das Anheben erscheinen die Zahlen im Blendenausschnitt und zeigen digital gespeichert den Schmelzpunkt an. In gleicher Weise wurden die Schmelzpunkte der beiden anderen Proben angezeigt. Nach dem Auslösen aller drei Speicherzählwerke wird das Temperaturprogramm gestoppt und der Ofen bleibt isotherm auf der letzten Schmelztemperatur stehen. Für die nächste Messung ist außer dem Wechsel der Proben und dem Einstellen der gewünschten Starttemperatur nur die Rückstelltaste zu drücken. Eine Klinke senkt dabei den Rechen, die Zahlenrollen fallen längs der Achsen mittels einer Herzkurve in die korrespondierende Stellung des Hauptzählers zurück und sind für die folgende Bestimmung bereit.

Das Speicherzählwerk ist im Steuergerät, welches die elektrischen Schaltungen und die Bedienungsorgane enthält, untergebracht. Drucktasten gestatten die Wahl der Starttemperatur mit den Vor- und Rückwärtsschnellgängen sowie der Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeiten. Ein elektronisch betätigtes Blinklicht zeigt durch den Übergang in Dauerlicht den Einschwingvorgang und die erfolgte Übereinstimmung der Ofentemperatur mit der am Hauptzählwerk eingestellten Temperatur an. Das Blockschema der Meßanordnung ist in Abb. 12 dargestellt. Die Intensität des von der Probe durchgelassenen, auf den Photowiderstand fallenden Lichtes kann registriert werden. Dazu besitzt die Apparatur einen Anschluß für einen Potentiometerschreiber mit einer Empfindlichkeit von 100 mV und einem minimalen Eingangswiderstand von 5 k $\Omega$ . Der Photowiderstand wird dadurch automatisch in ein Widerstandsnetzwerk eingefügt. Mit Hilfe dieser Anordnung ist es möglich, Schmelzkurven sowie alle anderen Vorgänge, bei welchen sich die Lichtdurchlässigkeit in Abhängigkeit der Temperatur ändert, zu registrieren (siehe Abschnitt 4.3).

#### 4.3. Anwendungen

Die wichtigsten Anwendungen der Schmelzpunktbestimmung sind die Prüfung der Identität einer Substanz sowie die Ermittlung der Reinheit.

Die Identitätsprüfung durch Bestimmung des sog. Mischschmelzpunktes ist ein qualitativer Test. In der Praxis bestimmt man drei Schmelzpunkte in einem Arbeitsgang, d.h. je eine Probe mit den reinen Komponenten

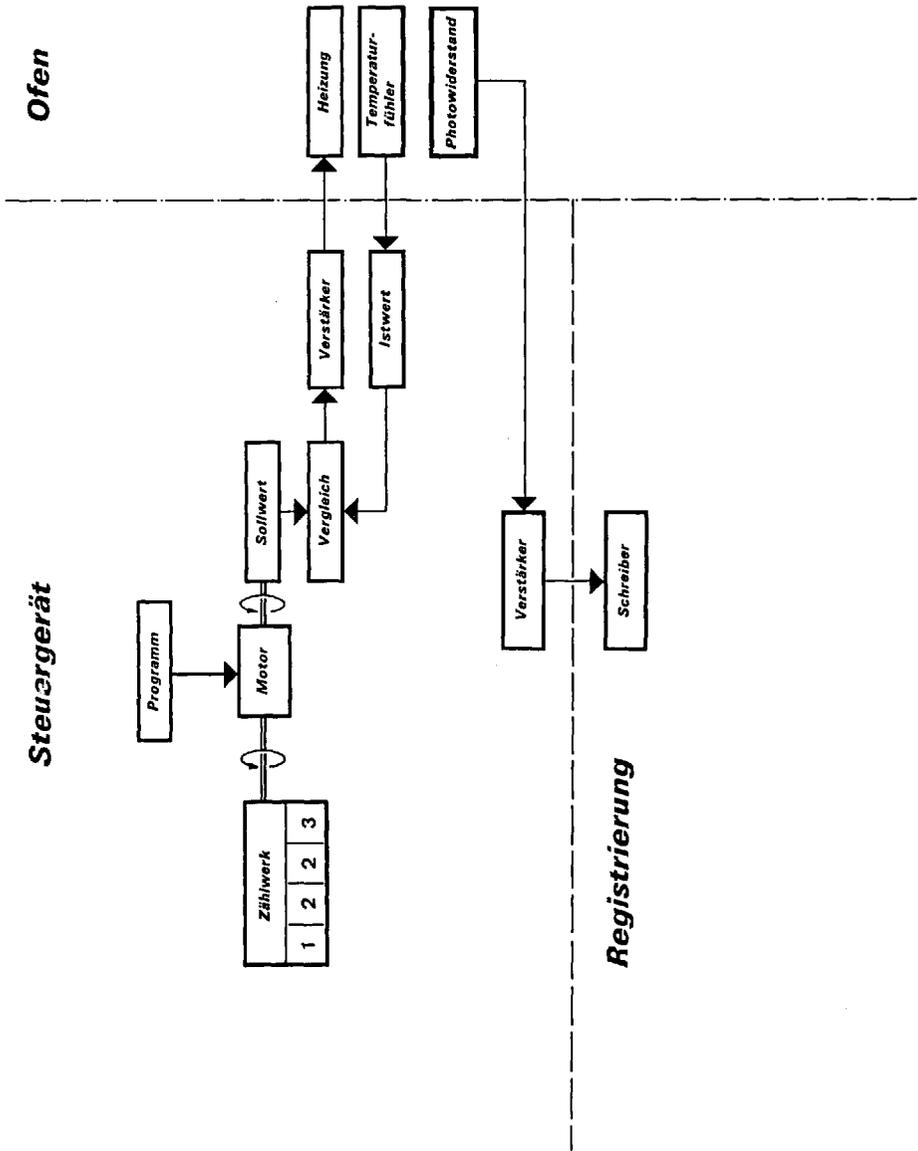


Abb. 12. Blockschema der automatischen Schmelzpunktbestimmung mit Registrierung

gleichen oder ähnlichen Schmelzpunktes, deren Identität oder Nichtidentität geprüft werden soll, und eine Mischprobe im ungefähren Verhältnis 1:1. Die Schmelzpunktdepression der Mischprobe ist bei Nichtidentität sehr ausgeprägt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

o-Aminobenzoesäure: 150,0° C  
o-Nitrobenzoesäure : 149,5° C  
Gemisch ca. 1:1 : 109,9° C

Dieser Test wurde nach der Schwellwertmethode durchgeführt. Da die Anforderungen an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit bei Mischschmelzpunktbestimmungen nicht sehr groß sind, konnte mit einem Temperaturanstieg von 10° C/min. gearbeitet werden.

Interessant für den Analytiker ist vor allem der quantitative Zusammenhang zwischen der Reinheit einer Substanz und ihrem Schmelzpunkt. Maßgebend ist die substanzspezifische kryoskopische Konstante, welche der Menge Verunreinigung in Molprozenten entspricht, welche den Schmelzpunkt um 1° C senkt. Eine Großzahl von kryoskopischen Konstanten wird von *Witschonke* <sup>21)</sup> angegeben. Für aromatische Substanzen beträgt der Wert durchschnittlich zwei Molprozent pro Grad Celsius. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß Substanzen mit extrem kleinen kryoskopischen Konstanten vorkommen. Die lineare Beziehung zwischen Reinheit und Schmelzpunkt ist praktisch nur im Bereich von 95–100% gültig; in Spezialfällen kann sie bis zu 90%-iger Reinheit ausgedehnt werden. Die Bestimmung der Reinheit wird um so genauer, je reproduzierbarer der Schmelzpunkt ermittelt werden kann. Konventionelle Schmelzpunkt-Bestimmungsmethoden mit ihrer bekanntlich schlechten Reproduzierbarkeit liefern relativ ungenaue Resultate. *Kofler* <sup>22)</sup> hat Arzneistoff-Gemische geprüft und gibt die Genauigkeit der Methode mit 1% an. Nach *Schudel* <sup>23)</sup> erfolgt die Bestimmung von Dulzin in Gemischen mit Saccharin auf 2% genau.

Absolute Reinheitsbestimmungen durch Ermittlung der Schmelzpunktdepression erfordern ein reines Vergleichspräparat sowie die Kenntnis der kryoskopischen Konstanten. Es hat sich in der Praxis als zweckmäßig erwiesen, für eine bestimmte Substanz den Zusammenhang zwischen Schmelzpunkt und dem Grad der Verunreinigung experimentell zu ermitteln und als Eichkurve darzustellen. Abb. 13 zeigt die Abhängigkeit des Schmelzpunktes von Benzil vom Reinheitsgrad. Ausgegangen wurde von einem reinen, zweimal aus Alkohol umkristallisierten Präparat, welchem bekannte Mengen Benzoin zugemischt wurden. In der organisch-präparativen Chemie muß oft die Reinheit einer Substanz beurteilt werden, ohne daß von vornherein ein reines Vergleichspräparat zur Verfügung steht. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn eine neue

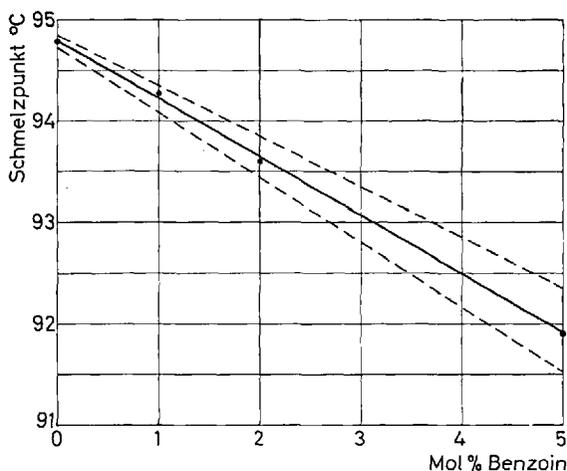


Abb. 13. Abhängigkeit des Schmelzpunktes von der Reinheit. Ausgezogene Linie: Mittelwert aus 9 Bestimmungen; Gestrichelte Linien: Standardabweichung

chemische Verbindung hergestellt wird. Das Rohprodukt wird in der Regel einer mehrstufigen Reinigungsoperation unterworfen, wobei von jeder Stufe der Schmelzpunkt bestimmt wird. Der Schmelzpunkt steigt so lange an, bis die Substanz entweder rein ist oder sich nach dem angewendeten Verfahren nicht mehr weiter reinigen läßt. Man beurteilt die Schmelzpunktdifferenzen von Stufe zu Stufe. Die Reinigung verläuft im allgemeinen asymptotisch d.h. die Differenzen pro Stufe werden bei zunehmender Reinheit immer geringer. Das Beispiel in Tabelle 1 zeigt die Schmelzpunkte verschiedener Kristallisate von Azobenzol. Ausge-

Tabelle 1. Schmelzpunkt von Azobenzol

	Mittelwert $\bar{x}^*$ [° C]	Standardabweichung $S$ [° C]
Handelspräparat	67,08	$\pm 0,14$
1. Kristallisat	67,79	$\pm 0,08$
2. Kristallisat	67,10	$\pm 0,10$
3. Kristallisat	68,18	$\pm 0,10$
4. Kristallisat	68,21	$\pm 0,08$

\* Aus 9 Bestimmungen, berechnet auf zwei Dezimalen bei einer Ablesegenauigkeit von einer Dezimale.

gangen wurde von einem mit „pract“ bezeichneten Handelspräparat. Dieses wurde mehrmals aus Alkohol umkristallisiert. Die Schmelzpunkte wurden nach der Schwellwertmethode bei einem Temperaturanstieg von  $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . bestimmt.

Die in Abb. 13 und Tabelle 1 zusammengestellten Resultate zeigen, daß die Schwellwertmethode bei einem Temperaturanstieg von  $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . außerordentlich gut reproduzierbare Ergebnisse liefert. Dadurch ist es möglich, selbst kleine Reinheitsunterschiede mit großer Sicherheit zu erfassen. Sind die Schmelzpunkt-Differenzen der zu beurteilenden Präparate gering, berechnet man die Mittelwerte und Standardabweichungen vorzugsweise aus einer größeren Anzahl von Bestimmungen. Mit Hilfe statistischer Methoden <sup>24)</sup> kann entschieden werden, ob die auf Grund der Schmelzpunktbestimmung ermittelten Reinheitsunterschiede gesichert sind oder nicht. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Reproduzierbarkeit der Schmelzpunktbestimmung bei zunehmendem Grad an Verunreinigung schlechter wird (Abb. 13).

Der Einfluß der Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit auf die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit, welche bei Reinheitsbestimmungen maßgebend sind, soll im folgenden erläutert werden. Wird bei einer Schmelzpunktbestimmung die Temperatur nicht direkt in der Substanz, sondern außerhalb des Proberöhrchens, d. h. im Heizbad gemessen, erhält man Resultate, welche von der Aufheizgeschwindigkeit abhängig sind. Die Temperatur einer reinen, schmelzenden Substanz bleibt konstant, bis die gesamte Menge verflüssigt ist. Dagegen steigt die Badtemperatur während des Schmelzvorganges, welcher eine gewisse Zeit dauert, gemäß der gewählten Aufheizgeschwindigkeit weiter an. Der nach dieser Methode ermittelte Schmelzpunkt entspricht also nicht genau der Temperatur der schmelzenden Substanz, sondern derjenigen des Heizbades bei dem als Schmelzpunkt definierten Zustand der Probe. Man erhält höhere Werte, wobei die Differenz zwischen dem gemessenen Schmelzpunkt und der wahren Schmelztemperatur um so größer ist, je schneller die Temperatur des Heizbades ansteigt. Mit fünf exakt linearen Temperaturanstiegsgeschwindigkeiten, welche bei der von *Jucker* u. Mitarb. <sup>20)</sup> beschriebenen Apparatur zur Verfügung stehen, konnte dieser Zusammenhang quantitativ untersucht werden. Die Resultate sind in der Tabelle 2 zusammengestellt. Die Messungen wurden mit reinen organischen Substanzen durchgeführt. Als Soll-Vergleichswerte zur Beurteilung der Genauigkeit sind die Schmelz- bzw. Erstarrungstemperaturen der Präparate angegeben. Diese wurden an einer größeren Substanzmenge nach der in der Praxis üblichen Haltepunktmethode unter Verwendung amtlich geeichter Glasthermometer ermittelt. Die durch das Verfahren, sowie die Temperaturmessung bedingte Unsicherheit ist als Plus-Minus-Abweichung angegeben.

Tabelle 2. *Abhängigkeit des Schmelzpunktes von der Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit (Schwellwertmethode)*

Substanz	Erstarrungs- temperatur [° C]	Fp [° C] *				
		0,2° C/ min	1° C/ min	2° C/ min	3° C/ min	10° C/ min
Naphthalin	80,1 ± 0,1	80,11	80,49	80,82	81,07	82,14
Benzoesäure	122,2 ± 0,1	122,23	122,85	123,12	123,62	125,08
Anthracen	216,3 ± 0,2	216,11	216,79	217,24	217,58	219,01

\* Mittelwerte aus 9 Bestimmungen, berechnet auf zwei Dezimalen bei einer Ablesegenauigkeit von einer Dezimale.

Die bei einer Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit von 0,2° C/min. gemessenen Schmelzpunkte entsprechen praktisch der Schmelz- bzw. Erstarrungstemperatur der Substanz. Abweichungen bewegen sich innerhalb der Meßgenauigkeit. Trägt man die Schmelzpunkte in Abhängigkeit der Wurzel aus der Anstiegsgeschwindigkeit auf, so erhält man eine Gerade. Dieser experimentelle Befund konnte auch durch theoretische Untersuchungen an Schmelzmodellen <sup>25)</sup> bestätigt werden.

Die *Reproduzierbarkeit* der Schmelzpunktbestimmungen ist ebenfalls abhängig von der Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit. Die Resultate sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. *Abhängigkeit der Standardabweichung vom Temperaturanstieg (Schwellwertmethode)*

Substanz	Standardabweichung S [° C] *				
	0,2° C/min	1° C/min	2° C/min	3° C/min	10° C/min
Naphthalin	0,03	0,08	0,08	0,14	0,33
Benzoesäure	0,05	0,07	0,15	0,31	0,43
Anthracen	0,06	0,15	0,15	0,28	0,44

\* Berechnet aus 9 Bestimmungen.

Die Registrierung des gesamten Schmelzverlaufes einer Substanz, wie es von *Suter* und *Jucker* <sup>26)</sup> beschrieben wurde, ist bei verunreinigten Proben, bei Gemischen mit großem Schmelzintervall und bei polymorphen Stoffen interessant. Dieses Verfahren eignet sich jedoch von allem zur Bestimmung des Klarschmelzpunktes, d. h., derjenigen Temperatur, bei welcher der letzte Kristall wegschmilzt. Die in den Abb. 14—17 darge-

stellten Kurven wurden mit der in Abschnitt 4.2. beschriebenen Apparatur in Verbindung mit einem Potentiometerschreiber unter Anwendung folgender Arbeitsmethodik aufgenommen:

„Der Meßbereich des Schreibers wird auf 100 mV eingestellt, Schreiberausschlag 0 bedeutet eine vollständig lichtundurchlässige Probe oder abgeschaltete Lichtquelle. Vollausschlag 100 mV entspricht der Lichtintensität bei leerem Probenhalter. Nachdem der Ofen die für die Untersuchung gewählte Starttemperatur erreicht hat, wird die Probe in den Meßkanal eingesetzt. Hierauf startet man die gewählte Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit und den konstanten Vorschub des Registrierpapiers gleichzeitig. Die Vorschubgeschwindigkeit soll in einer vernünftigen Relation zum gewählten Temperaturanstieg und zur Genauigkeit der Temperaturmessung stehen. Zur Eichung in Grad Celsius wird die Temperatur am Zählwerk abgelesen und von Hand oder mit einer Markiervorrichtung auf die Zeitachse des Registrierpapiers übertragen. Die Teilung ist linear, da sowohl der Vorschub des Registrierpapiers als auch der Temperaturanstieg mit konstanter Geschwindigkeit erfolgen.“

Abb. 14 zeigt die Schmelzkurve von reinem Naphthalin. Die Änderung des Aggregatzustandes ist gekennzeichnet durch eine markante Stufe in der Lichtdurchlässigkeitskurve. Das Empfindlichkeitsmaximum des Photowiderstandes liegt zwischen 600 und 650 nm. Bei farbigen, in diesem Wellenlängenbereich stark absorbierenden Substanzen ist daher die gemessene Lichtintensität geringer als bei farblosen Verbindungen. Trotzdem läßt sich der gesamte Schmelzvorgang von Azulen (Abb. 15) einwandfrei erfassen. Vergleichende Untersuchungen haben ergeben, daß gerade bei solchen Substanzen die photoelektrische Methode dem konventionellen visuellen Verfahren überlegen ist. Es ist beispielsweise für das menschliche Auge sehr schwierig, in einer dunklen Schmelze

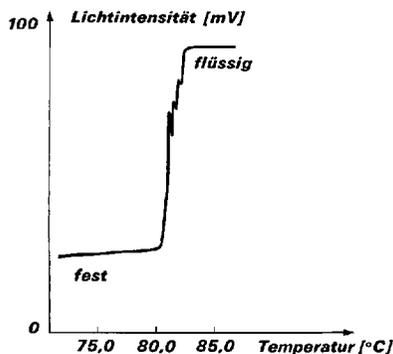


Abb. 14. Schmelzkurve von Naphthalin. Temperaturanstieg 2° C/min

feste, d.h. noch nicht geschmolzene Teilchen zu erkennen. In Abb. 16 sind die Schmelzkurven von reinem Phenacetin und einer mit 1% Acetanilid verunreinigten Probe dargestellt. Das unterschiedliche Schmelzverhalten der beiden Präparate ist aus den Diagrammen klar ersichtlich. Im besonderen können die Klarschmelzpunkte mit großer Genauigkeit bestimmt werden.

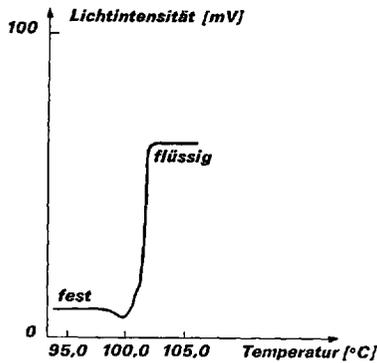


Abb. 15. Schmelzkurve von Azulen. Temperaturanstieg  $2^{\circ}$  C/min.

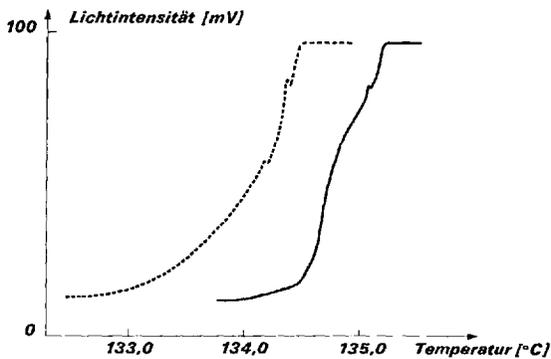


Abb. 16. Schmelzkurven von Phenacetin. Temperaturanstieg  $0,2^{\circ}$  C/min.  
 — Phenacetin rein. - - - - Phenacetin mit 1% Acetanilid

Glyzeride können bekanntlich in verschiedenen Modifikationen auftreten, was an den in Abb. 17 dargestellten Schmelzkurven von Tristearin sehr schön gezeigt werden kann. Der Schmelzverlauf der pulverisierten Probe eines Handelspräparates ist normal. Wird die Substanz dagegen

im Schmelzpunktröhrchen vorgeschmolzen und durch rasches Abkühlen zum Erstarren gebracht, erhält man eine Schmelzkurve, welche infolge Auftretens von Modifikationen mehrere Stufen aufweist. Die erste Modifikation schmilzt bei  $54^{\circ}\text{C}$ . Aus der Schmelze kristallisiert die zweite Modifikation aus, was an der Abnahme der Lichtintensität erkennbar ist. Die zweite Modifikation schmilzt bei  $64^{\circ}\text{C}$ , worauf sich die dritte Modifikation in allerdings nur geringen Mengen bildet.

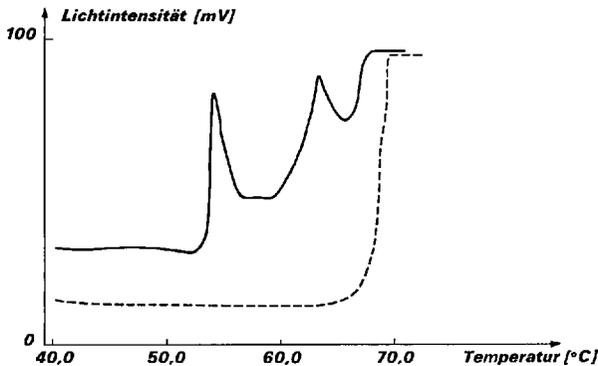


Abb. 17. Schmelzkurven von Tristearin. Temperaturanstieg  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .  
———— vorgeschmolzenes Präparat. - - - - - pulverisiertes Handelspräparat

## 5. Thermische Methoden

### 5.1. Erstarrungspunkt, Haltepunktmethode

Die Bestimmung der Schmelz- bzw. Erstarrungstemperatur nach dem Abkühlungsverfahren ist eine thermische Methode ohne direkte Beobachtung, wobei die Temperatur in der Substanz gemessen wird. Je nach Versuchsanordnung benötigt man dazu Substanzmengen von 1 bis 50 g. Die geschmolzene Substanz wird unter Rühren langsam abgekühlt, wobei die Temperatur als Funktion der Zeit gemessen wird. Die Zeit-Temperatur-Ablesungen erfolgen regelmäßig während des ganzen Abkühlungsvorganges und werden in ein Diagramm eingetragen. Die Abkühlungskurve eines reinen Stoffes zeigt die Abb. 18. Auf dem Teilstück A—B kühlt sich die Schmelze ab. Im Idealfall ist bei B der Erstarrungspunkt  $T_0$  erreicht, die Temperatur bleibt konstant, bis die ganze Schmelze bei C erstarrt ist. C—D entspricht der Abkühlung des festen Stoffes. Die reale Abkühlungskurve ist gekennzeichnet durch eine mehr oder weniger stark auftretende Unterkühlung. Dieser Effekt darf jedoch nicht

so groß sein, daß die freiwerdende Kristallisationswärme nicht mehr ausreicht, um die Temperatur vor dem völligen Erstarren der Probe auf den Schmelzpunkt zurückzuführen. Die Unterkühlung kann durch Impfen der Schmelze verringert werden.

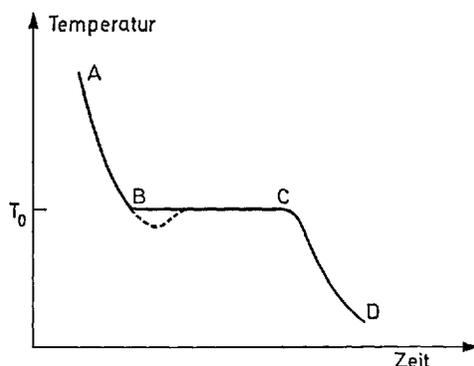


Abb. 18. Erstarrungskurve einer reinen Substanz. Gestrichelte Linie: Unterkühlung

Bei der klassischen Methode zur Bestimmung des Erstarrungspunktes wird die gerührte Substanzprobe durch ein Luftbad von einem äußeren Bad konstanter Temperatur getrennt. Das Prinzip einer solchen Apparatur ist zum Beispiel vom Prinzip der Molekulargewichtsbestimmungen durch Messung der Gefrierpunktserniedrigung bekannt. Das Gefrierrohr, ein dickwandiges Reagenzglas, befindet sich in einem als Luftmantel dienenden etwas weiteren Reagenzglas. Die zusammenhängenden Röhre sind in den Deckel des Glasgefäßes eingehängt, welches das Kältebad enthält. Das Gefrierrohr ist durch einen doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen. Durch die mittlere Bohrung wird das Thermometer eingeführt, die andere dient als Führung für den Rührer. Derartige Apparate mit einem äußeren Bad konstanter Temperatur haben den Nachteil, daß die Temperaturdifferenz zwischen Substanzprobe und Bad nicht konstant ist und deshalb die Wärmeabgabe ungleichmäßig erfolgt. *Rossini*<sup>27)</sup> reduzierte diesen Effekt durch eine große Temperaturdifferenz von 50–100° C zwischen Bad und Probe und durch Einführen des evakuierten Zwischenraumes. Durch Variierung des Vakuums gelingt es, die Abkühlungsgeschwindigkeit zu regulieren und eine praktisch lineare Abnahme der Temperatur zu erzielen. Das doppelwandige, zum Evakuieren des Mantels mit einem Absperrhahn versehene Probengefäß ist mit Hilfe eines Asbesttringes im Messingzylinder zentriert. Der Korkstopfen ist mit Bohrungen für das Widerstandsthermometer, den Rührer und ein Röhrchen zum Einleiten trockener Luft versehen. Die Flüssigkeit im Dewar-

gefäß dient als Kühl- oder Heizbad. Mit dieser Apparatur, welche ca. 50 ml Substanz benötigt, kann der Erstarrungspunkt auf  $0,005^{\circ}\text{C}$  genau ermittelt werden. Apparaturen mit automatischer Registrierung der Erstarrungskurve unter Einsatz von Widerstandsthermometern, Thermistoren oder Thermoelementen wurden von *Stull* <sup>28)</sup>, *Herington* und *Handley* <sup>29)</sup> und *Gunn* <sup>30)</sup> beschrieben.

Die Bestimmung des Schmelz- bzw. Erstarrungspunktes nach der Haltepunktmethode kann auch im Aufheizverfahren erfolgen. *Walisch* und *Eberle* <sup>31)</sup> beschreiben eine Meßanordnung, um Schmelzpunkte mit geringen Substanzmengen zu bestimmen. Hierzu wird die in einer Kapillare befindliche Probe, in die ein Mikrothermoelement eintaucht, mittels einer Regelanordnung mit zirka  $50^{\circ}\text{C}$  pro Minute aufgeheizt. Das von einem Schreiber registrierte Temperatur-Zeit-Diagramm besitzt eine ausgeprägte Umwandlungszone konstanter Temperatur, welche mit der Schmelz- bzw. Erstarrungstemperatur identisch ist. Aus dem Verlauf der Umwandlungszone kann auf die Reinheit der Probe geschlossen werden. Bei einem Substanzbedarf von wenigen Milligramm kann der Schmelzpunkt mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  bestimmt werden.

## 5.2. Differential-Thermoanalyse\*

Mit der Differential-Thermoanalyse (DTA) wird die Temperaturdifferenz zwischen einer Probe und einer thermochemisch inaktiven Referenz im Verlaufe eines zeitlich linearen Temperaturanstiegs verfolgt. Alle Umwandlungen, die mit einer Enthalpieänderung verbunden sind (z.B. Phasenumwandlungen, chemische Reaktionen), bewirken, daß während der Umwandlung entweder die Proben-temperatur hinter der Referenz-temperatur nachhinkt (= endotherme Reaktion) oder aber ihr vorausseilt (= exotherme Reaktion). Schmelzvorgänge können mit dieser Methode sehr gut verfolgt werden (Abb. 19).

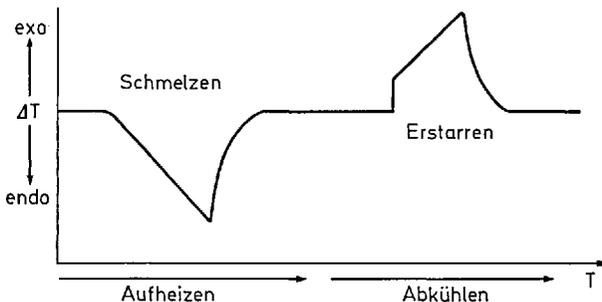


Abb. 19. Schmelz- und Erstarrungskurve

\* Dieses Kapitel verdanken wir Herrn Dr. *Sommerauer*.

Eine DTA-Anlage besteht aus drei Hauptteilen (Abb. 20).

*Ofensteuerung:* regelt den Ofen, der mit verschiedenen, wählbaren Geschwindigkeiten linear aufgeheizt oder abgekühlt wird.

*Meßkopf:* im homogenen Temperaturfeld des Ofens sind Probe und Referenz angeordnet. Ihre Temperaturdifferenz, sowie in einigen Fällen auch die Absoluttemperatur von Probe oder Referenz werden gemessen. Der Meßkopf wird weitgehend den speziellen Versuchsbedingungen angepaßt, was dazu führt, daß die Resultate verschiedener Autoren oft kaum miteinander verglichen werden können.

*Meßwertfassung:* die Messung der Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz kann entweder durch eine Spannungsmessung (Thermoelemente) oder durch eine Widerstandsmessung (Pt-Widerstände, Thermistoren) erfolgen. In beiden Fällen werden die Signale verstärkt und auf einen Schreiber gegeben.

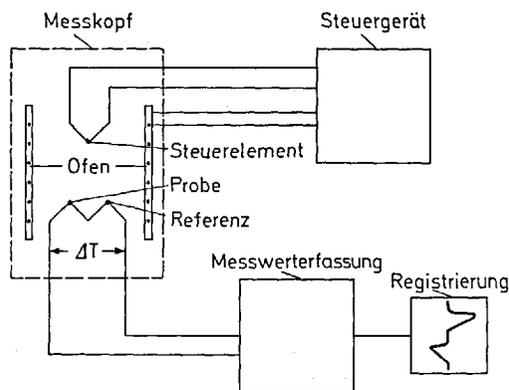


Abb. 20. Schema einer DTA-Anlage

Bei der Bestimmung des Schmelzpunktes mit Hilfe der DTA gilt es in erster Linie festzustellen, bei welcher Absoluttemperatur der Vorgang abläuft. Wie jede dynamische Schmelzpunktmethode zeigt auch die DTA immer ein zeitliches Schmelzintervall an, das durch die Wärmeleitfähigkeit und die räumliche Ausdehnung der Probe bestimmt wird. Verschiedene Faktoren <sup>32)</sup> wie die Geometrie des Probenhalters, das Probenhaltermaterial, der Ort der Temperaturmessung, die Aufheizgeschwindigkeit, die Korngröße der Probe usw. beeinflussen das Aussehen der DTA-Kurve stark und können dazu führen, daß dem zeitlichen Schmelzintervall noch ein thermisches überlagert wird.

Von *Wiedemann* und *van Tets* <sup>33)</sup> wurde der Kurvenverlauf der DTA bei Schmelz- und Erstarrungsvorgängen eingehend diskutiert. Die Autoren zeigen, wie mit Hilfe von Wärmewiderständen zwischen Ofen und Probe (=  $R_a$ ) und zwischen Probe und Meßstelle (=  $R_k$ ) sowie mit der Wärmekapazität (=  $C^*$ ) der Probe der Schmelzvorgang beschrieben werden kann. Wesentlich ist, daß der Kontaktwiderstand  $R_k$  und die Zeitkonstante  $R_a C^*$  möglichst klein und die Isolation von Probe und Referenz möglichst gut sind.

*Gäumann* und *Oswald* <sup>34)</sup> weisen auf die Problematik der DTA-Auswertung hin. Bei Innenmessung ( $\Delta T$ - und  $T$ -Messung in der Substanz) zeigt die DTA-Kurve ein wesentlich anderes Bild als bei Außenmessung (Messung an der Substanz). Bei Innenmessung entspricht die Peakspitze ungefähr der Schmelztemperatur, sofern das Meßelement genau zentriert ist. Bei Außenmessung zeigt die Peakspitze eher den Zeitpunkt des Reaktionsendes an und die extrapolierte Auslenkung von der Basislinie ergibt die Reaktionstemperatur.

Von *Vasallo* und *Harden* <sup>35)</sup> wurden an verschiedenen Substanzen der Einfluß der Thermoelementstellung bei Innenmessung und der Aufheizgeschwindigkeit auf den Schmelz- und Siedepunkt bestimmt. Die Übereinstimmung der Peakmaxima, die als Schmelzpunkte aufgeführt werden, mit den Literaturwerten ist sehr gut (vgl. Tabelle 4).

*Joncich* und *Bailey* <sup>36)</sup> bestimmten mit DTA das Phasendiagramm von Phenanthren und Anthracen. Verunreinigungen im Phenanthren bewirken, daß beim Beginn des Schmelzpeaks mit zunehmender Verunreinigung die Ablenkung aus der Basislinie immer flacher wird.

Tabelle 4. Schmelzpunkte verschiedener organischer Verbindungen nach *Vasallo* und *Harden* <sup>35)</sup>

Verbindung	Fp [° C] gefunden	Literatur
n-Butan	—135	—135,5
n-Pentan	—129,5	—129,7
n-Hexan	— 94,5	— 95,3
n-Heptan	— 90,3	— 90,6
n-Octan	— 57,0	— 56,8
Benzoessäure	121,8	121,8
Wasser	0,0	0,0
Benzol	5,2	5,5
Essigsäure	16,5	16,6
Alathon 10 (Polyäthylen)	110,5	110,5
Marlex 50 (Polyäthylen)	134,2	134,5
Teflon TFE	327,5	327,0
Delrin	170,5	171,0

*Brancone* und *Ferrari* <sup>37)</sup> zeigten, daß DTA-Untersuchungen wesentlich kritischere Aussagen über Reinheit und Zusammensetzung neuer *pharmazeutischer Produkte* zulassen als die konventionellen Schmelzpunktbestimmungen.

Von *Chiu* <sup>38)</sup> stammt der Vorschlag, die Bestimmung des Schmelzpunktes kristalliner Derivate zur Identifizierung organischer Verbindungen in einem Schritt auf der DTA zu machen. Abb. 21 zeigt die Identifikation von Triäthylamin mit Pikrinsäure. Triäthylamin mit einem Siedepack bei 92° C (*A*) und Pikrinsäure mit einem Schmelzpeak bei 122° C (*B*) reagieren exotherm zwischen 78 und 85° C miteinander (*C*) unter Bildung eines Derivates. Das überschüssige Triäthylamin verdampft bei 90–96° C und das Derivat schmilzt bei 170–176° C. Wird die gleiche Probe nochmals untersucht (*D*), so stellt man nur noch eine Phasenumwandlung bei 43° C und den Schmelzpeak des Derivates fest.

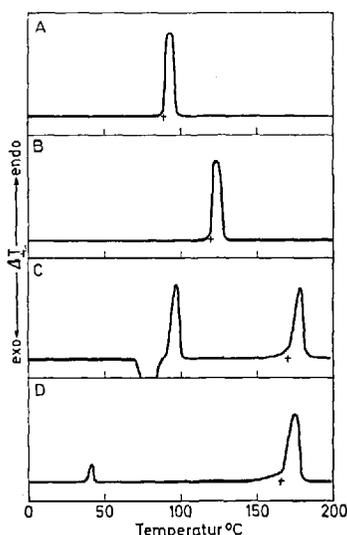


Abb. 21. DTA-Kurven zur Bildung von Triäthylaminpikrat. *A* Triäthylamin; *B* Pikrinsäure; *C* Triäthylamin + Pikrinsäure; *D* Wiederholung mit dem Reaktionsprodukt von *C*

Eine Theorie zur Ermittlung des exakten Schmelzpunktes und des kristallinen Anteils von Polymeren mit Hilfe von DTA-Schmelzkurven wurde von *Strella* <sup>39)</sup> veröffentlicht. An linearem Polyäthylen und kristallinem Polypropylen konnte die Richtigkeit der Theorie bewiesen werden.

DTA-Untersuchungen zum Schmelzbereich verschieden kristallisierter Polyäthylene wurden von *Wunderlich* und *Kashdan* <sup>40)</sup> durchgeführt. Der Schmelzbereich des aus Lösung kristallisierten Materials, das in Form von Einzelkristallen anfällt, wird gegenüber dem aus der Schmelze kristallisierten Polymeren um 3,7° C gegen tiefere Temperaturen verschoben. Die Peakmaxima liegen bei 129,0 und 132,7° C.

Die Bedeutung der Differentialthermoanalyse zur Untersuchung organischer Verbindungen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Wesentlich dazu beigetragen hat sicher der Umstand, daß die im Handel erhältlichen DTA-Apparaturen immer besser werden. Da mit der DTA neben der Bestimmung von genauen Reaktionstemperaturen auch die Berechnung der mit der Reaktion verknüpften Enthalpieänderung aus der Peakfläche möglich ist, dürfte diese Methode in Zukunft noch wesentlich mehr zur Reinheitsprüfung durch Schmelzpunktsbestimmung herangezogen werden.

## 6. Durch Konvention festgelegte Meßpunkte

### 6.1. Erweichungspunkt

Bei gewissen Materialien ist der Erweichungspunkt eine wichtige Kennzahl. Die Bestimmung des Erweichungspunktes „Ring und Kugel“ <sup>41)</sup> dient zur Qualitätskontrolle von Bitumen sowie auch zur vergleichsweisen Untersuchung anderer bituminösen Bindemittel. Man ermittelt diejenige Temperatur, bei welcher unter den festgelegten Versuchsbedingungen eine Bindemittelschicht durch das Gewicht einer Kugel eine bestimmte Verformung erfährt. Das Prüfgerät besteht aus einem Metallgestell, welches in ein mit destilliertem Wasser gefülltes Becherglas eingehängt wird. Das Gestell enthält drei Platten, die Gestelltragplatte, die Tragplatte für die Prüfkörper und die Auffangplatte. Die Tragplatte für die Prüfkörper ist mit zwei Löchern zur Aufnahme von Metallringen und einem Loch zur Einführung des Thermometers versehen. Die Auffangplatte ist mehrfach durchbohrt, damit die Flüssigkeit gut zirkulieren kann (Abb. 22). Zur Vorbereitung der Prüfkörper werden die auf einer Glasplatte liegenden Metallringe von 15,9 mm innerem Durchmesser und 6,4 mm Höhe mit verflüssigtem Bitumen gefüllt. Die gefüllten Ringe läßt man auf Raumtemperatur abkühlen und schneidet dann das überstehende Bindemittel planeben ab. Dann werden die Prüfkörper in die Tragplatte des Gestells eingesetzt und dieses in das Becherglas eingehängt. Das Thermometer wird derart eingeführt, daß der Boden des Quecksilbergefäßes in der Ebene der Prüfkörpertragplatte liegt. Nach einer bestimmten vorgeschriebenen Zeit legt man Stahlkugeln von 9,5 mm Durchmesser und

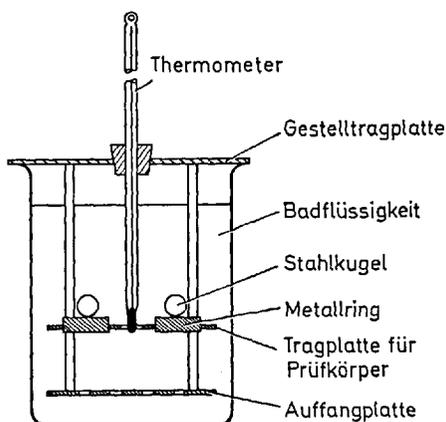


Abb. 22. Gerät nach *Ring und Kugel*

3,5 g Gewicht zentral auf die Oberfläche der Prüfkörper. Hierauf wird das Wasserbad erwärmt, so daß die Temperatur  $5^{\circ}\text{C}$  pro Minute ansteigt. Das Bindemittel wird unter dem Druck der Kugel mit zunehmender Temperatur allmählich nach unten durchgewölbt. In dem Augenblick, in welchem das Bindemittel die Auffangplatte berührt, wird die Temperatur abgelesen. Als Erweichungspunkt „Ring und Kugel“ gilt das Mittel aus den beiden Ablesungen.

Eine ähnliche Methode ist die Bestimmung des Erweichungspunktes nach *Kraemer-Sarnow* <sup>41)</sup>, welche zur Qualitätskontrolle der Teere sowie zur vergleichweisen Untersuchung von bituminösen Stoffen Anwendung findet. Man bestimmt diejenige Temperatur, bei welcher unter den festgelegten Versuchsbedingungen eine Bindemittelschicht von Quecksilber durchbrochen wird.

## 6.2. Fließschmelzpunkt, Steigschmelzpunkt

In der modernen Fettchemie und Fett-Technologie ist es notwendig, die Schmelzdaten der Fette den verarbeitungstechnischen Erfordernissen anzupassen. Die Ermittlung des Schmelzverhaltens solcher Stoffe wird nach besonderen, von der üblichen Schmelzpunktbestimmung abweichenden Methoden durchgeführt.

Das Office International du Cacao et du Chocolat <sup>42)</sup> hat das von *Fincke* <sup>43)</sup> ausgearbeitete Verfahren zur Bestimmung des Fließschmelzpunktes von Kakaobutter standardisiert. Als Probengefäß wird ein u-förmiges Röhrchen verwendet. Die nach einem speziellen Verfahren vorbehandelte und verfestigte Kakaobutter wird in den längeren Schen-

kel zu einer 10 mm langen Säule eingestochen und mit Hilfe eines Stahlstiftes bis 10 mm vor die Rundung eingeschoben. Zwei mit Fettproben beschichtete U-Röhrchen werden dann mit Hilfe eines Schlauchstückes an einem geeichten, in Zehntelgrade unterteilten Thermometer befestigt, wobei die Rundungen der Röhrchen mit der Ebene der Quecksilberkugel übereinstimmen müssen (Abb. 23). Das Thermometer mit den 2 daran befestigten Röhrchen wird bis zur Unterkante des Schlauchstückes in ein Wasserbad eingeführt. Dann heizt man das Bad unter Rühren langsam auf, so daß der Temperaturanstieg bis 4° C unterhalb des mutmaßlichen Fließschmelzpunktes der Probe nicht größer ist als 1° C/min. Dann ist die Wärmezufuhr so zu drosseln, daß die Temperatur pro Minute höchstens noch um 0,2° C ansteigt. Als Fließschmelzpunkt ist diejenige Temperatur zu notieren, bei welcher die Fettsäule deutlich sichtbar gegen die Rundung des U-Röhrchens abgleitet. Normalerweise wird im gleichen Arbeitsgang noch der Klarschmelzpunkt bestimmt. Dieser ist dann erreicht, wenn die Fettschmelze im u-förmigen Teil des Röhrchens keine Trübung mehr zeigt, d. h. für das mit einem Vergrößerungsglas bewaffnete Auge ganz klar erscheint.

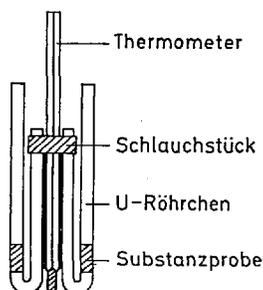


Abb. 23. U-förmige Schmelzpunktröhrchen nach *Fincke*

Eine ähnliche Methode ist die Bestimmung des sogenannten Steigschmelzpunktes, welche von einigen Pharmakopöen für Fette oder fettähnliche Stoffe vorgeschrieben wird. Nach dem Deutschen Arzneibuch <sup>44)</sup> wird die Substanz in eine beidseits offene Glaskapillare von 0,9 bis 1,1 mm innerem Durchmesser und 60 bis 80 mm Länge gebracht. Die, wenn nötig, vorher bei möglichst niedriger Temperatur geschmolzene Substanz soll in der Schmelzkapillare eine Schichthöhe von 10 mm aufweisen. Die mit geschmolzener Substanz gefüllte Kapillare wird vor der Bestimmung mindestens 24 Stunden bei einer Temperatur von 10° C aufbewahrt. Danach wird sie an einem geeigneten Thermometer derart befestigt, daß sich die Substanz in gleicher Höhe mit dem Quecksilbergefäß des Thermo-

mers befindet. Das Thermometer wird in ein mit Wasser gefülltes Becherglas eingehängt, wobei das obere Ende der Kapillare aus dem Wasser herausragen muß. Man erwärmt das Wasserbad unter Rühren derart, daß ab  $10^{\circ}$  unterhalb des zu erwartenden Schmelzpunktes die Temperatur nicht mehr als  $1^{\circ}$  C/min. ansteigt. Die Temperatur, bei der die teilweise geschmolzene Substanz in der Kapillare in die Höhe steigt, ist der Steigschmelzpunkt.

### 6.3. Tropfpunkt

Der Tropfpunkt ist diejenige Temperatur, bei welcher ein Stoff beim Erwärmen unter den angegebenen Bedingungen tropfbar flüssig wird, d.h. der erste Tropfen der Substanz von einem Nippel bestimmter Form abfällt. In der Praxis werden Tropfpunktbestimmungen hauptsächlich an Substanzen mit fett- oder wachsartiger Konsistenz, z.B. an Schmierfetten, Salben, Cremes, bituminösen Stoffen etc., vorgenommen.

Allgemein eingebürgert hat sich das Verfahren nach *Ubbelohde*, wie es in verschiedenen Pharmakopöen <sup>45, 46)</sup> und Normen <sup>47)</sup> beschrieben wird. Auf den unteren Teil eines Einschlußthermometers mit einem Meßbereich von 0 bis  $110^{\circ}$  C und einer Teilung in ganzen Celsiusgraden ist eine zylindrische Metallhülse gekittet, auf die eine zweite Metallhülse aufgeschraubt werden kann. Diese zweite Metallhülse hat seitlich eine kleine Öffnung zum Druckausgleich und im unteren Teil drei Sperrstifte. In diese Hülse paßt ein zylindrischer nach unten sich verjüngender Metallnippel (seltener Glasnippel), dessen Dimensionen genau vorgeschrieben sind. Die Sperrstifte gestatten, den Nippel so weit in die Metallhülse hineinzuschieben, daß seine Wandungen überall gleich vom Quecksilbergefäß des Thermometers entfernt sind (Abb. 24). Als Luftbad wird ein

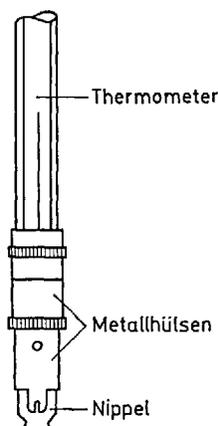


Abb. 24. Tropfpunktgerät nach *Ubbelohde*

Reagenzglas verwendet, in dem das Thermometer mit dem Nippel mittels eines durchbohrten Stopfens befestigt wird. Das Reagenzglas wird bis zu zwei Drittel seiner Länge senkrecht in ein mit Wasser gefülltes Becherglas gehängt. Zur Durchführung der Bestimmung wird die zu prüfende Substanz in den Nippel eingestrichen oder, falls erforderlich, geschmolzen und eingegossen, wobei der Einschluß von Luftblasen zu vermeiden ist. Der gefüllte Nippel wird an beiden Öffnungen glattgestrichen und hierauf bis zum Anschlag in die Thermometerhülse eingeschoben. Die aus der unteren Öffnung herausgepreßte Substanz wird wiederum abgestrichen. Hierauf führt man das Gerät derart in das Reagenzglas ein, daß der Abstand zwischen Unterkante des Nippels und Reagenzglasboden 25 mm beträgt. Das Wasserbad wird erwärmt, wobei von etwa 10° unterhalb dem vermuteten Tropfpunkt an die Temperatur um 1° C/min. ansteigen soll. Die Temperatur, bei der der erste Tropfen der zu prüfenden Substanz vom Nippel abfällt, wird abgelesen. In der Regel wird der auf ganze Grade auf- oder abgerundete Mittelwert aus zwei bis drei Bestimmungen als Tropfpunkt angegeben.

Für die Prüfung von *Schmierfetten* hat die ASTM <sup>48)</sup> eine Methode ausgearbeitet, welche von DIN <sup>49)</sup> übernommen wurde. Es handelt sich dabei um ein modifiziertes Ubbelohde-Verfahren. Die Anordnung besteht aus einem Prüfrohr aus Glas, welches im unteren Teil drei Einbuchtungen zur Halterung des Nippels hat. Die Maße des aus verchromten Messing gefertigten Nippels sind genau festgelegt, weichen aber zum Teil von den Dimensionen des Ubbelohde-Nippels ab. Für die einwandfreie Halterung des Thermometers, welches sich im Innern des Prüfrohres befindet, wird ein Verschlusskork sowie ein Korkring verwendet (Abb. 25). Bei der Probenvorbereitung wird mit Hilfe eines Metallstabes, ein konischer Anteil des Schmierfettes aus dem Nippel entfernt. An der Innenwandung bleibt eine gleichmäßig dicke Schicht der Probe zurück. Bei der Zusammensetzung des Prüfgerätes muß darauf geachtet werden, daß das in den Nippel hineinragende Thermometer die Probe an der Wandung sowie die Austrittsöffnung nicht berührt. Das Prüfrohr mit Thermometer und Nippel wird in ein Heizbad getaucht. Dieses besteht aus einem mit Öl beschickten Becherglas, welches mit einer elektrischen Heizspirale oder mit einem Gasbrenner erwärmt wird. Ein Rührwerk sorgt für eine gute Durchmischung der Flüssigkeit. Mit einem zweiten Thermometer wird die Temperatur des Ölbad, welches mit einer vorgeschriebenen Geschwindigkeit aufgeheizt wird, gemessen. Wenn das Fett vom Nippel abtropft, liest man die Temperatur an beiden Thermometern ab. Das arithmetische Mittel der beiden Ablesungen wird als Tropfpunkt angegeben, wobei auf ganze Grade auf- oder abgerundet wird.

Jucker u. Mitarb. <sup>50)</sup> haben von den bisherigen Methoden ausgehend einen *Tropfpunktautomaten* entwickelt. Ein mit Substanz gefüllter Metall-

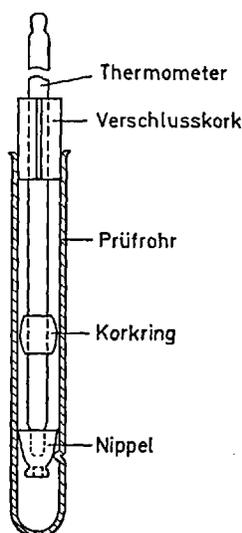


Abb. 25. Tropfpunktgerät  
nach ASTM

nippel, dessen Innenmaße von DIN bzw. ASTM übernommen wurden, befindet sich in einem elektrisch beheizten Metallblockofen, welcher eine Modifikation des in Abb. 9 gezeigten Ofens für Schmelzpunktbestimmungen darstellt. Die Temperatur wird mit einem Platin-Widerstandsthermometer gemessen und von einem Steuergerät aus elektronisch geregelt. Ausgehend von einer Starttemperatur sind verschiedene lineare, exakt reproduzierbare Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeiten wählbar. Das Fallen des ersten Tropfens wird photoelektrisch erfaßt, wobei die zugehörige Temperatur digital angezeigt wird. Die in Abb. 26 dargestellte Prinzipskizze zeigt einen Querschnitt durch den Ofen.

## 7. Normungsbestrebungen

### 7.1. Gesetzliche Vorschriften der Pharmakopöe

Die Pharmakopöen fast aller Länder enthalten Vorschriften über die Bestimmung des Schmelzpunktes bzw. des Schmelzintervalles. Die Methoden sind jedoch nicht einheitlich, sondern können sich von Land zu Land bezüglich Apparatur, Durchführung der Bestimmung und Beurteilung des Schmelzvorganges unterscheiden. Um Schwierigkeiten bei der Beurteilung pharmazeutischer Substanzen im zwischenstaatlichen Verkehr zu vermeiden, sind seit einiger Zeit Bestrebungen im Gange, einheitliche internationale Arbeitsvorschriften aufzustellen. Im Rahmen der

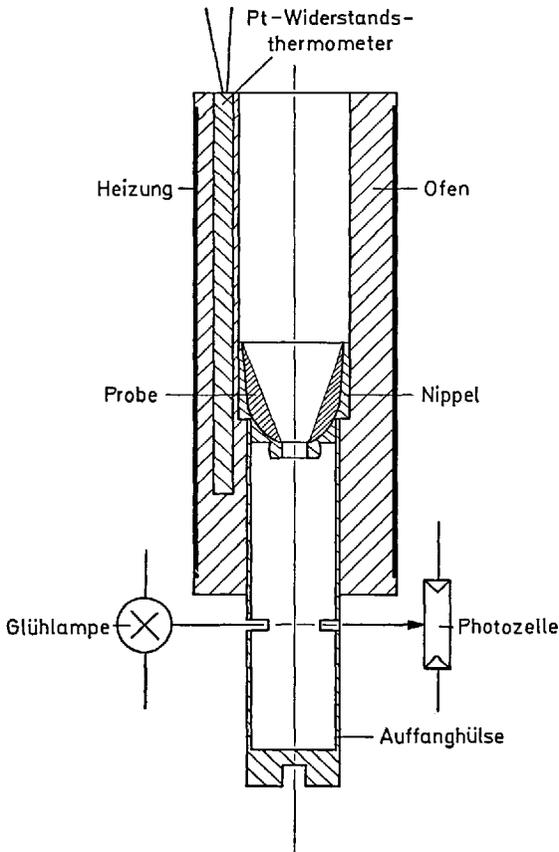


Abb. 26. Automatische Tropfpunktbestimmung

Weltgesundheitsorganisation ist die Internationale Pharmakopöe <sup>51)</sup> herausgegeben worden, welche empfehlenden Charakter hat. Die Europäische Pharmakopöe <sup>52)</sup> wird zur Zeit von acht Ländern ausgearbeitet. Diese wird für die unterzeichneten Staaten verbindlich.

Die meisten Pharmakopöe-Meßanordnungen zur Bestimmung des Schmelzpunktes oder des Schmelzintervalles bestehen im Prinzip aus einem heizbaren Flüssigkeitsbad, welches mit einer Rührvorrichtung versehen ist. Als Probengefäß werden normale Schmelzpunktröhrchen mit einer lichten Weite von ca. 1 mm und einer Wanddicke von 0,10–0,15 mm verwendet. Die Füllhöhe beträgt in der Regel 2–4 mm, vereinzelt bis 6 mm. Zur Temperaturmessung werden geeichte Glasthermometer vorgeschrieben. Das Schmelzpunktröhrchen wird derart am Thermometer

befestigt, daß das geschlossene Ende sich ungefähr in halber Höhe der Quecksilberkugel befindet. Thermometer und Röhrchen werden bei einer bestimmten Temperatur ins Heizbad eingeführt und mit der vorgeschriebenen Aufheizgeschwindigkeit erwärmt. Meistens wird der Schmelzbereich der Substanz, d. h. das Temperaturintervall vom Beginn des Zusammensinterns oder der Tröpfchenbildung bis zum Eintreten der klaren Schmelze, ermittelt. Im Entwurf zur Europäischen Pharmakopöe ist nur noch die Bestimmung des Klarschmelzpunktes, d. h. der Temperatur, bei welcher der letzte Kristall schmilzt, vorgesehen. Normalerweise werden die fadenkorrigierten Temperaturen angegeben.

Das Österreichische <sup>53)</sup> sowie das Deutsche Arzneibuch <sup>44)</sup> beschreiben eine Anordnung, bei welcher Thermometer und Probenröhrchen in ein Flüssigkeitsbad, welches von einem zweiten nicht gerührten Flüssigkeitsbad umgeben ist, eintauchen. Das Österreichische Arzneibuch gestattet zudem die Verwendung eines Heiztisches, wie er von *Kofler* <sup>8)</sup> zur Bestimmung von Mikroschmelzpunkten gebraucht wird.

Unterschiedlich von Land zu Land ist vor allem die Methodik der Durchführung. In der Tabelle 5 sind die von verschiedenen Pharmakopöen vorgeschriebenen Arbeitsbedingungen zusammengestellt. Als Starttemperatur wird diejenige Temperatur bezeichnet, bei welcher die Probe ins Heizbad eingeführt wird. Die vorgeschriebene Aufheizgeschwindigkeit muß in der Regel von der Starttemperatur an eingehalten werden. Dort, wo keine spezielle Starttemperatur vorgesehen ist, wird ein solcher Punkt bezeichnet.

Wie in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, wird das Resultat einer Schmelzpunktbestimmung in hohem Maße von der Geschwindigkeit, mit welcher das Bad aufgeheizt wird, beeinflußt. Bei zersetzlichen Substanzen ist das Ergebnis auch noch von der Starttemperatur abhängig. Man wird daher für ein und dieselbe Substanz voneinander abweichende Schmelzpunkte oder Schmelzintervalle finden, wenn die Bestimmung nach verschiedenen Methoden erfolgt.

Einige Pharmakopöen, so beispielsweise die USP <sup>54)</sup>, gestatten die Anwendung irgendeiner anderen Methode oder eines anderen Apparates, sofern damit die gleiche Genauigkeit erzielt wird wie mit der vorgesehenen Standardmethode. Die Genauigkeit muß mit Bezugs- oder Testsubstanzen (siehe nächster Abschnitt) überprüft werden.

## 7.2. Testsubstanzen

Zum Eichen oder Prüfen von Schmelzpunktapparaten werden sogenannte Eich-, Test- oder Bezugssubstanzen verwendet. Dabei handelt es sich um reine Substanzen mit bekanntem Schmelzpunkt. Bereits *Kofler* <sup>8)</sup> hat zur Eichung der Temperaturskala der Heizbank einen Satz von 7

Tabelle 5

	Starttemperatur ° C unterhalb Fp	Aufheizgeschwindigkeit ° C/min
Internationale Pharmakopöe		
1. Ausgabe <sup>51)</sup>	keine Angabe	1—2
Entwurf zur 2. Ausgabe	5	1
United States Pharmacopeia <sup>54)</sup>	30	1—2 (Klasse I)
	10	3 ± 0,5 (Klasse Ia)
Europäische Pharmacopöe <sup>52)</sup>	5	1
Deutsches Arzneibuch <sup>44)</sup>	10	2
Oesterreichisches Arzneibuch <sup>53)</sup>	10	1—2
Pharmacopoea Helvetica <sup>55)</sup>	keine Angabe	2
British Pharmacopeia <sup>56)</sup>	10	3

Substanzen vorgeschlagen. Die Methode der Eichung mit Bezugssubstanzen ist auch von den nationalen und internationalen Pharmakopöen übernommen worden. Die WHO <sup>57)</sup> hat für die zweite Ausgabe der Internationalen Pharmakopöe einen Satz von 13 reinen Substanzen aufgestellt. Die Schmelzpunkte wurden in einem Gemeinschaftsversuch, an welchem sich 15 Laboratorien aus 13 Ländern beteiligten, ermittelt. Die verteilten Substanzen stammten aus der gleichen, gut homogenisierten Charge. Die maximale Differenz der von den beteiligten Laboratorien gefundenen, fadenkorrigierten Klarschmelzpunkte betrug je nach Substanz 1,5—4,6°C. Die ausgemittelten und auf ganze Grade auf- oder abgerundeten Werte sind in der Tabelle 6 angegeben. Einige der von der WHO empfohlenen Bezugssubstanzen werden auch von *Kofler* <sup>8)</sup> und von der USP <sup>54)</sup> verwendet. Die USP gibt das Schmelzintervall an, wobei der Klarschmelzpunkt mit dem von der WHO angegebenen Wert übereinstimmt.

In der 4. Kolonne sind die Klarschmelzpunkte, welche aus Schmelzkurven (vergl. Abschnitt 4.3.) ermittelt wurden, angegeben. Es handelt sich um Mittelwerte aus drei Bestimmungen. Rundet man diese Werte auf ganze Grade auf oder ab, so stimmen sie mehrheitlich mit den WHO-Schmelzpunkten überein. Die von *Kofler* <sup>8)</sup> angegebenen Temperaturen liegen 1—2° C tiefer.

Die Schmelzpunkte bzw. Schmelzbereiche der in der Tabelle 6 zusammengestellten Bezugssubstanzen sind alle mit einem systematischen, mit der Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit zusammenhängenden Fehler behaftet (siehe Abschnitt 4.3.). Dieser wird natürlich auf die Meßanordnung, welche mit diesen Bezugssubstanzen geeicht wird, übertragen. Für eine exakte Eichung einer Apparatur wären demnach Bezugssub-

Tabelle 6. *Schmelzpunkt-Bezugssubstanzen*

Substanz	Fp oder Schmelzbereich [° C]			
	WHO*	USP	Kofler	Mettler FP 1*
Azobenzol	69	—	68	69,3
Vanillin	83	81–83	—	82,8
Benzil	96	—	95	95,9
Acetanilid	116	114–116	115	115,6
Phenacetin	136	134–136	135	136,0
Benzanilid	165	—	163	164,3
Sulfanilamid	166	164,5–166,5	—	165,7
Salophen	192	—	190	192,4
Sulphapyridin	193	191–193	—	192,2
Dicyanamid	210	—	—	210,0
Saccharin	229	—	228	229,4
Coffein	237	235–237,5	—	236,9
Phenolphthalein	263	—	—	263,2

\* Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeit 1° C/min

stanzen, deren wahre Schmelztemperaturen so genau wie möglich bekannt sein sollten, erforderlich. *Colarusso* und *Semon* <sup>58)</sup> empfehlen einen Satz von acht reinen, stabilen Substanzen mit exakt, gemessenen Tripelpunkten. Der Unterschied zwischen Tripelpunkt und der Schmelz- bzw. Erstarrungstemperatur bei Normaldruck beträgt 0,01–0,05° C. Die Messung des Tripelpunktes erfolgt in einer speziellen thermometrischen Zelle mit 350 g Substanz, wobei die Gleichgewichtstemperatur mit einem Standard-Platinwiderstandsthermometer gemessen wird. Die Genauigkeit der Tripelpunktbestimmung beträgt  $\pm 0,05^\circ \text{C}$ , die Reproduzierbarkeit  $\pm 0,025^\circ \text{C}$ . Die zu Eichzwecken vorgeschlagenen Substanzen sind in der Tabelle 7 zusammengestellt. Bei der Eichung eines Schmelzpunktapparates mit diesen Substanzen vergleicht man die gefundenen Werte mit den angegebenen Tripelpunkten, wobei die Differenzen tabellarisch oder graphisch dargestellt werden können. Die für eine bestimmte

Tabelle 7. *Tripelpunkte von Eichstandards nach Colarusso und Semon* <sup>58)</sup>

Substanz	Tripelpunkt [° C]	Substanz	Tripelpunkt [° C]
p-Nitrotoluol	51,54	p-Methoxy-benzoesäure	182,97
Naphthalin	80,27	2-Chlor-anthrachinon	209,03
Benzoessäure	122,35	Carbazol	245,34
Adipinsäure	151,42	Anthrachinon	284,59

Temperatur ermittelte Differenz ist gleich der Summe der Korrekturen für den herausragenden Faden (Glas-Flüssigkeitsthermometer), für die Thermometereichung und für den durch die Aufheizgeschwindigkeit bedingten Fehler. Der Unterschied zwischen Tripelpunkt- und Schmelztemperatur ist bei Meßgenauigkeiten von  $\pm 0,05^\circ \text{C}$  nicht von Bedeutung.

## 8. Literatur

- 1) *Thiele, J.*: Ein neuer Apparat zur Schmelzpunktbestimmung. Chem. Ber. 40, 996 (1907)
- 2) *Roth, C. F.*: Ein neuer Apparat zur Bestimmung von Schmelzpunkten. Chem. Ber. 19, 970 (1886).
- 3) *Tottoli, M.*: Laboratoriumsgerät zur Untersuchung des Verhaltens einer Stoffprobe. Schweiz. Pat. Nr. 320388.
- 4) *Ebert, A.*: Ein neues Schmelzpunktbestimmungsgerät. Chem. Rundschau (Solothurn) 10, 254 (1957).
- 5) *Berl, E.*, u. *A. Kuhlmann*: Über Schmelzpunktsbestimmungen. Chem. Ber. 60, 811 (1927).
- 6) *Matthäus, G.*, u. *A. Sauthoff*: Bemerkungen zu den Mitteilungen über Schmelzpunktsblöcke von *E. Berl* u. *A. Kuhlmann* und von *C. F. Linström*. Chem. Fabrik 8, 92 (1935).
- 7) *Lehmann, O.*: Molekularphysik. Leipzig: Engelmann 1888; Das Kristallisationsmikroskop. Braunschweig: Vieweg 1910.
- 8) *Kofler, L.*, u. *A. Kofler*: Thermo-Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische, 3. Aufl. Weinheim: Verlag Chemie 1954.
- 9) *McCrone Jr., W. C.*: Fusion Methods in Chemical Microscopy. New York-London: Interscience Publ. 1957.
- 10) *Kofler, L.*, u. *H. Hilbck*: Über einen neuen Mikroschmelzpunktapparat. Mikrochemie 9, 38 (1931).
- 11) *Suter, H.*, u. *R. Scheidegger*: Ein neues Instrument für thermo-mikroskopische Untersuchungen. Chem. Rundschau (Solothurn) 20, 909 (1967).
- 12) *Grabar, D. G.*, and *W. C. McCrone*: Application of Microscopic Fusion Methods to Inorganic Compounds. J. Chem. Educ. 27, 649 (1950).
- 13) *Hilbck, H.*: Ein neuer Mikroschmelzpunktapparat. Mikrochemie 36/37, 307 (1951).
- 14) Pharmacopée Française: Méthode du point de fusion instantanée. S. 1503.8, Ausgabe 1965.
- 15) *Jucker, H.*: Neue Methoden zur automatischen Erfassung von Schmelz- und Siedepunkt. Dechema-Monographien Bd. 62 „Schnellmethoden und Automatisierung in der Analyse“.
- 16) *Uttinger, D.*: Unveröffentlichte Resultate.
- 17) *Kardos, F.*: Objective Method for Determining Melting Point. Anal. Chem. 22, 1569 (1950).
- 18) *Kolb, A. K.*, *C. L. Lee*, and *R. M. Trail*: Automatic Microscopic Method for Determination of Melting Point. Anal. Chem. 39, 1206 (1967).
- 19) *Überreiter, K.*, u. *H. J. Orthmann*: Verfahren zur Bestimmung des Schmelzpunktes von hochpolymeren Substanzen. Deut. Pat. Nr. 933788.
- 20) *Jucker, H.*, *R. Scheidegger*, *M. Baumgartner*, *J. Hager*, *D. Boser* u. *H. Suter*: Ein automatisches Gerät zur Schmelz- und Siedepunktbestimmung. Neue Zürcher Zeitung, Beilage Technik, 16.11.1966.

- 21) *Witschonke, C. R.*: Freezing Point and Purity Data for Some Organic Compounds Anal. Chem. 26, 562 (1954).
- 22) *Kofler, L.*: Mikromethoden zur quantitativen Analyse von organischen Arzneigemischen. Arch. Pharm. 282, 20 (1944).
- 23) *Schudel, H.*: Beiträge zur Bestimmung des Schmelzpunktes. Zürich: Dissert. ETH 1947.
- 24) *Doerffel, K.*: Beurteilung von Analysenverfahren und -ergebnissen. Z. Anal. Chem. 185, 1 (1962).
- 25) *van Tets, A.*: Private Mitteilung.
- 26) *Suter, H., u. H. Jucker*: Photoelektrische Erfassung von temperaturabhängigen Vorgängen. Glas- und Instrumententechnik 11, 1161 (1967).
- 27) *Rossini, F. D., B. J. Mair, and A. R. Glasgow*: Determination of Freezing Points and Amounts of Impurity in Hydrocarbons from Freezing and Melting Curves. I. Res. Natl. Bur. Standards 26, 591 (1941).
- 28) *Stull, D. R.*: Application of Platinum Resistance Thermometry to some Industrial Physicochemical Problems. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. 18, 234 (1946).
- 29) *Herington, E. F. G., and R. Handley*: The Use of Thermistors for the Automatic Recording of Small Temperature Differences. J. Sci. Instr. 25, 434 (1948).
- 30) *Gunn, St. R.*: Simple Melting Curve Method for Quantitative Purity Determination. Anal. Chem. 34, 1292 (1962).
- 31) *Walisch, W., u. H. G. Eberle*: Anordnung zur automatischen Bestimmung von Schmelz- und Siedepunkten. Mikrochim. Acta 1967, 1031.
- 32) *Wendllandl, W. W.*: Thermal Methods of Analysis. New York: Interscience Publ. 1964.
- 33) *Wiedemann, H. G., u. A. van Tets*: Kurvenverlauf der DTA-Messung bei Schmelz- und Erstarrungsvorgängen. Z. Anal. Chem. 233, 161 (1968).
- 34) *Gäumann, A., u. J. Oswald*: Differential-Thermoanalyse, Auswertung und Problematik. Chimia 21, 421 (1967).
- 35) *Vasallo, D. A., and J. C. Harden*: Precise Phase Transition Measurements of Organic Materials by DTA. Anal. Chem. 34, 132 (1962).
- 36) *Joncich, M. J., and D. R. Bailey*: Zone Melting and Differential Thermal Analysis of Some Organic Compounds. Anal. Chem. 32, 1578 (1960).
- 37) *Brancone, L. M., and H. J. Ferrari*: Applications of DTA in the Examination of Synthetic Organic Compounds. Microchem. J. 10, 370 (1966).
- 38) *Chiu, J.*: Identification of Organic Compounds by Differential Thermal Analysis. Anal. Chem. 34, 1841 (1962).
- 39) *Strella, S.*: Differential Thermal Analysis of Polymers. II. Melting. J. Appl. Polymer Sci. 7, 1281 (1963).
- 40) *Wunderlich, B., and W. H. Kashdan*: Thermodynamics of Linear High Polymers. I. Comparison of the Melting Transitions of Solution and Melt-Crystallized Polyethylene. J. Polymer Sci. 50, 71 (1961).
- 41) Deutsche Normen: Bituminöse Bindemittel für den Straßenbau, Probenahme und Beschaffenheit, Prüfung. DIN 1995 (1960).
- 42) Office International du Cacao et du Chocolat: Bestimmung der Schmelzdaten an Kakaobutter. Analytische Methoden Blatt 8b-D/1961.
- 43) *Fincke, H.*: Handbuch der Kakaoerzeugnisse, S. 480. Berlin: Springer 1936.
- 44) Deutsches Arzneibuch: Bestimmung des Schmelzbereiches. 7. Ausg., Blatt 8.0.01. Berlin: Akademie-Verlag 1964.
- 45) Oesterreichisches Arzneibuch: Bestimmung des Tropfpunktes. 9. Ausg., Bd. I, S. 41. Wien: Staatsdruckerei 1960.
- 46) Deutsches Arzneibuch: Bestimmung des Tropfpunktes. 7. Ausg., Blatt 10.0.01. Berlin: Akademie-Verlag 1964.

- 47) Deutsche Normen: Bestimmung des Tropfpunktes, Ubbelohde — Verfahren für Bitumen. DIN 51801, Blatt 2 (1965).
- 48) American Society for Testing Materials: Standard Method of Test for Dropping Point of Lubricating Greases. ASTM. Designation D 566—42 (1942).
- 49) Deutsche Normen: Bestimmung des Tropfpunktes, ASTM-Verfahren für Schmierfette. DIN 51801, Blatt 1 (1965).
- 50) *Jucker, H., H. Suter, u. R. Scheidegger*: Unveröffentlichte Resultate.
- 51) Internationale Pharmakopöe: Bestimmung des Schmelzbereiches und der Schmelztemperatur. 1. Ausg., Bd. I, S. 311. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 1955.
- 52) Europäische Pharmakopöe: In Vorbereitung
- 53) Oesterreichisches Arzneibuch: Bestimmung des Schmelzpunktes bzw. des Schmelzintervalles. 9. Ausg., Bd. I, S. 38. Wien: Staatsdruckerei 1960.
- 54) The United States Pharmacopeia: Melting Range or Temperature. 17. Ausg., S. 909. Easton, P. A.: Mack Publishing Company 1965.
- 55) Pharmacopoea Helvetica: Bestimmung des Schmelzpunktes. 5. Ausg., S. 20. Bern: Stämpfli 1933.
- 56) British Pharmacopeia 1963: Melting Point of Readily-powdered Substances, S. 1002. London: The Pharmaceutical Press 1963.
- 57) *Bervenmark, H., N. A. Diding, and B. Oehrner*: Bull. World Health Organ. 28, 175 (1963).
- 58) *Colarusso, V. G., and M. A. Semon*: Measurement of Calibration Standards for Thermometry. Anal. Chem. 40, 1521 (1968).

Eingegangen am 7. November 1968

# Grundlagen und Arbeitstechnik der Mikrophotometrie

Prof. Dr. K. Beyermann

Institut für Anorganische Chemie und Kernchemie der Universität Mainz

## Inhalt

1. Mikrophotometrische Verfahren .....	475
1.1. Bestimmung von Massen .....	476
1.2. Bestimmung des Gehaltes einzelner Elemente .....	477
2. Mikrophotometrische Messungen im ultravioletten und sichtbaren Licht	477
2.1. Mikrophotometer .....	477
2.2. Cytophotometrische Messungen in situ .....	478
2.3. Messung in Mikroküvetten nach Abtrennung .....	479
2.4. Aufarbeitung zur mikrophotometrischen Bestimmung .....	481
2.5. Andere Arbeitstechniken zur Spektrophotometrie kleiner Probemengen	482
2.6. Densitometrie .....	483
3. Mikrophotometrische Messungen im infraroten Spektralbereich .....	484
3.1. Infrarotmikrospektrographen .....	485
3.2. Untersuchung von Proben in Mikropreßlingen .....	487
3.3. Untersuchungen mit Hilfe einer Mikro-Mull-Technik .....	489
3.4. Untersuchungen unter Verwendung von Mikroflüssigkeitsküvetten ....	489
3.5. Untersuchungen mit Hilfe der ATR-Methodik .....	490
3.6. Untersuchungen mit Hilfe des Verfahrens der Spiegel-Reflexion (Specular reflectance) .....	491
3.7. Kombinationen mit Trennverfahren .....	498
4. Literatur .....	501

Unter Mikrophotometrie soll im Folgenden ein Verfahren verstanden werden, bei dem kleine Stoffmengen dadurch untersucht oder bestimmt werden, daß man die Intensitätsschwächung von Licht beim Durchgang durch die Probe mißt. Die Probenmenge soll, um die Benutzung eines mikrophotometrischen Verfahrens zu rechtfertigen, so klein sein, daß mit den üblichen Verfahren kein ausreichender Meßeffect mehr erzielt wird. Das zur Durchstrahlung benutzte Licht kann von der Röntgenstrahlung über Ultraviolettlicht und sichtbares Licht bis zur Infrarotstrahlung reichen. Die Probe kann fest, flüssig, gelöst oder gasförmig vorliegen. Die Untersuchung kann mit Licht einer Wellenlänge erfolgen („Photometrie“) oder unter Veränderung der Wellenlänge („Spektrophotometrie“).

Die obige Definition schließt die Mikroverfahren aus, bei denen Sekundärstrahlung erzeugt und gemessen wird (Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Ramanverfahren). Sie schließt ferner die Methoden aus, bei denen andere Energieflüsse (etwa von Schall oder von Elementarteilchen, wie Neutronen u. a.) gemessen werden. Optische Verfahren, bei denen die Probe nicht durchstrahlt wird (etwa Reflexion) oder bei denen andere Effekte als die Schwächung des einfallenden Lichts gemessen werden (etwa Drehung der Polarisationssebene, Änderung des Brechungsindex u. ä.) sind ebenfalls von der Besprechung ausgeschlossen.

Mikrospektrophotometrische Untersuchungen wurden schon kurz nach der Entwicklung des Spektroskops durchgeführt <sup>1)</sup>. Das Gebiet hat sich — vor allen Dingen auf der apparativen Seite — stark entwickelt. Es gibt eine Reihe von Übersichtsarbeiten, die Mikrophotometrie im Röntgenbereich <sup>2-5)</sup>, im Bereich des UV <sup>5-8)</sup> und des sichtbaren Lichts <sup>5-11)</sup>, sowie des Infrarotlichts <sup>7, 8)</sup> erwähnen.

Mikrophotometrische Untersuchungen werden besonders für histochemische Untersuchungen <sup>5, 6, 12)</sup> schon seit langem <sup>13)</sup> benutzt. Für die klinisch-chemische Routineanalyse bürgern sich photometrische Mikroverfahren immer stärker ein <sup>14, 15)</sup>. Kritische Diskussionen — besonders der Geräte — und Hinweise auf Fehlermöglichkeiten fehlen nicht <sup>16-20)</sup>.

Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Nachweisgrenzen mikrophotometrischer Methoden. Diese Grenzen sind bei Verfahren, die ultraviolette, sichtbares oder infrarotes Licht benutzen, aus Gründen gesetzt, welche die Beugungstheorie beschreibt. Nach dieser ist der minimalste Durchmesser  $d_{\min}$  eines bei gegebener Wellenlänge  $\lambda$  gerade noch optisch auflösbaren Gegenstandes

$$d_{\min} = 2,2 \lambda / N.A. ,$$

wobei N.A. die numerische Apertur ist. Bei den röntgenoptischen Verfahren ist der limitierende Faktor im Auflösungsvermögen der Strahlungsempfänger zu sehen <sup>4)</sup>. Meist verwendet man hier feinstkörnige Photoschichten und dann bedingt die Größe des nach der Entwicklung erhaltenen Silberkorns die Grenze der Darstellbarkeit.

Tabelle 1. *Nachweisgrenzen mikrophotometrischer Verfahren bei Benutzung von Licht verschiedener Wellenlängen*

Wellenlänge des Untersuchungslichtes	Durchmesser des kleinsten meßbaren Objektes ( $\mu$ )	Größenordnung der benötigten Schichtdicke ( $\mu$ )	Theoretisch erreichbare kleinste Absolutmenge	Lit.
10 Å	0,5	1	0,001—0,1 pg	3, 5)
350 nm	0,2	0,5	0,1—1 pg	7)
15 $\mu$	10	10	100 ng	7)

Bei mikrophotometrischen Untersuchungen sind zwei Arbeitsrichtungen zu unterscheiden:

Bei der einen werden die Messungen in situ — etwa an Schnitten biologischen Materials — vorgenommen.

Bei der zweiten werden interessierende Komponenten aus dem Probenmaterial abgetrennt, nach der Trennung in ein Mikrophotometer überführt und dort gemessen.

Die zweite Arbeitsrichtung kann sich dabei unter Umständen mit Vorteil der optischen Geräte der ersten Arbeitsrichtung bedienen. Oft verlangt auch die cytochemische Methodik eine Bestätigung ihrer Ergebnisse auf einem zweiten unabhängigen Weg, der für die Untersuchung einzelner Zellen den Umgang mit Submikrogramm-Mengen nötig macht. Mikrophotometrische Messungen des zweiten Typs nach Aufarbeitung ergänzen also Untersuchungen des ersten Typs. Aus diesem Grund sollen die beiden Arbeitsrichtungen gemeinsam betrachtet werden.

Die in Tabelle 1 angegebenen kleinsten Absolutmengen sind im allgemeinen bei der Messung in situ bestimmt oder untersucht worden. Bei der Anwendung zur Lösung von Fragestellungen des zweiten Typs sind diese Nachweisempfindlichkeiten jedoch in praktisch keinem Fall erreicht worden.

Hier gilt vielmehr, daß „mit der Bereitstellung der Gerätschaften zur Spektrophotometrie kleinster Stoffmengen das Problem nur zum kleineren Teil gelöst ist, denn vom praktischen Standpunkt stellt die Mikrospektrophotometrie nur einen einzelnen Aspekt des komplexen Problems „Mikroanalyse“ dar. Zwei andere gleich wichtige Punkte sind die Isolierung des gewünschten Materials und zweitens die Umwandlung des isolierten Stoffes in eine Form, die geeignet ist, in das Mikrospektrophotometer eingeführt zu werden. Diese beiden Operationen müssen quantitativ sein“ <sup>21)</sup>. In der folgenden Übersicht soll die optisch-apparative Seite nur kurz erwähnt werden und der Aufarbeitungstechnik größerer Raum eingeräumt werden.

## 1. Mikrophotometrische Verfahren unter Verwendung von Röntgenlicht

Für Röntgenstrahlung gilt ein dem Beer-Lambert-Gesetz analoges Exponentialgesetz

$$I = I_0 \cdot \exp(-\mu/\rho m), \quad \text{wobei}$$

- $I$  = Intensität des Lichts nach Durchstrahlung,
- $I_0$  = Intensität des eingestrahnten Lichts,
- $\mu/\rho$  = Massenabsorptionskoeffizient,
- $m$  = Masse/Einheitsfläche des absorbierenden Materials ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Man kann nach dieser Gleichung Massenbestimmungen durchführen oder man kann auch den Gehalt einzelner Elemente bestimmen, wenn man die Absorption bei Wellenlängen mißt, die etwas kürzer und etwas länger sind als die Absorptionskanten des zu bestimmenden Elementes <sup>4, 22)</sup>. Massenabsorptionskoeffizienten wurden bestimmt (z.B. <sup>23)</sup>) und zur Mikroröntgenabsorptionsanalyse geeignete Apparaturen beschrieben <sup>24–26)</sup>.

### 1.1. Bestimmung von Massen

Das Untersuchungsmaterial (getrocknete Gewebeschnitte oder einzelne isolierte Zellen) wird dicht auf eine Photoemulsion von feinstem Korn aufgelegt („Kontaktradiographie“) und dann von Röntgenlicht durchstrahlt. Man wählt ein Kontinuum weicher Röntgenstrahlung, erhalten durch Anregung mit 3 kV. Zusammen mit der Probe wird ein Referenzsystem mitbestrahlt, das aus einem Stufenkeil aus Nitrocellulose besteht. Von dem Keil kennt man die Masse und den Massenschwächungskoeffizient. Durch Vergleich der Schwärzungsintensitäten kann man dann die unbekannte Masse ermitteln, wenn man für das Untersuchungsgut den Massenschwächungskoeffizient von Protein als gültig annimmt und einsetzt.

Benutzt man Röntgenstrahlung von etwa 5 bis 23 Å Wellenlänge, dann ist der Einfluß der anorganischen Bestandteile biologischen Materials vernachlässigbar, wenn sie in den in Gewebe üblichen geringen Konzentrationen vorkommen. Stärker Calciumhaltige Objekte sind so jedoch nicht analysierbar.

Vorbehandlungen (z.B. Fixierungen) müssen unterbleiben, um jeden Fehler durch Materialverluste zu vermeiden. Die gesamte Analyse, bei der die Schwächungsmessung mit Hilfe besonderer Mikrodensitometer <sup>27, 28)</sup> durchgeführt werden muß, ist mit einem Fehler von etwa 5% behaftet. Dieser ist durch unterschiedliche Granulation der Photoemulsion (etwa 2%), durch Inhomogenität des Bezugssystems (1 bis 2%) und unterschiedliche Dicke der Aluminiumträgerfolie, auf der das Untersuchungsgut aufgezogen ist, bedingt (etwa 1%). Bei einer Anordnung, bei der die Intensität statt mit Hilfe des Photofilms mit einem Proportionalzähler direkt gemessen wird <sup>29)</sup>, wird ein Fehler von 6% angegeben. Die kleinste bestimmbare Menge ist etwa 1 pg.

Es konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse röntgenphotometrischer Bestimmungen der Massen einzelner Zellen im Rahmen eines Fehlers von  $\pm 10\%$  mit Ergebnissen aus interferenzmikroskopischen Massenbestimmungen übereinstimmen <sup>30, 31)</sup>. Das Röntgenverfahren wurde zur Bestimmung der Trockenmasse einzelner Zellen benutzt <sup>32–35)</sup>. Man fand so zum Beispiel die mittlere Masse von Zellen aus dem *Deitersschen*

Kern von Ratten mit  $20,8 \pm 0,58 \text{ ng}$  <sup>29)</sup>. Lipidbestimmungen in einzelnen Zonen von Rattennebenieren wurden so durchgeführt <sup>35)</sup>, daß die Massen der Zellen vor und nach der Behandlung mit Petroläther bestimmt wurden. Röntgenphotometrische Bestimmungen ergaben dabei das gleiche Ergebnis wie Mikrowägungen des gesamten Schnittes auf einer Quarzwaage vor und nach der Extraktion <sup>35)</sup>. Dieser aussichtsreiche Untersuchungsweg — nämlich Gewebe mit Enzymen oder Reagentien zu behandeln, die einzelne Komponenten spezifisch herauslösen und dann nach der Behandlung erneute Massenbestimmungen anzustellen — ist bis jetzt noch sehr wenig bearbeitet <sup>3)</sup>.

### 1.2. Bestimmung des Gehaltes einzelner Elemente

Mißt man die Absorption an Absorptionskanten, so kann man auch spezifische Bestimmungen einzelner Elemente durchführen <sup>36)</sup>. Hierzu ist monochromatische Primärstrahlung nötig, die durch Beugung an Kristallen erzeugt wird. Für die Mikroanalyse verwendet man am besten fokussierende Kristalle, um höhere Intensitäten zu erzielen. Man stellt die Wellenlänge vor und hinter der Absorptionskante ein und macht jedesmal Röntgenaufnahmen der Probe, wieder in engem Kontakt mit einer photographischen Emulsion. Die Empfindlichkeit des Verfahrens hängt von der Atomnummer des zu bestimmenden Elements ab, ferner von der Genauigkeit, mit der die Schwächung der Primärstrahlung bestimmt wird <sup>33)</sup>. Fehler durch Eigenfluoreszenz der Probe können auftreten.

An 20  $\mu$  dicken Schnitten konnte der Schwefelgehalt (1%) vom *stratum corneum* menschlicher Haut bestimmt werden <sup>4)</sup>. In Gewebeproben ähnlicher Dicke lassen sich Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff bestimmen <sup>3)</sup>. Gelegentlich kann man auch noch Calcium und Phosphor erfassen, wenn deren Gehalt im Gewebe hoch ist. Nicht bestimmbar ist dagegen der Gehalt biologischen Materials an Kalium, Natrium, Chlorid oder Eisen. Erst wesentlich dickere Schichten, in denen dann kein strukturelles Feindetail mehr erkennbar ist, ermöglichen die Analyse dieser Elemente mit Hilfe der Röntgenabsorption.

## 2. Mikrophotometrische Messungen im ultravioletten und sichtbaren Licht

### 2.1. Mikrophotometer

Seit Casperson 1936 <sup>13)</sup> die grundlegenden Vorstellungen zum Bau eines Mikrospektrophotometers publizierte, wurden viele Geräte gebaut <sup>37-53)</sup>, bei denen meist Mikroskope mit Monochromatoren kombiniert wurden.

Dabei wurde entweder das Mikroskop benutzt, um den Spalt des Monochromators auszuleuchten, wobei die volle Intensität des spektral nicht zerlegten Primärstrahls das Untersuchungsobjekt traf, oder das Objekt wurde im Mikroskop mit bereits monochromatisierter Strahlung durchleuchtet und die Absorption dann dadurch gemessen, daß ein Photoelement an die Stelle des Mikroskopokulars gesetzt wurde. Einige Geräte arbeiten nach dem Zweistrahlprinzip <sup>38, 41, 42, 53</sup>). Käufliche Mikroskopphotometer stellen die Firmen Leitz, Zeiss und Beckman her. Mit Hilfe dieser Geräte kann man photometrische Messungen an Objekten kleiner Schichtdicke (von der Größenordnung einiger  $\mu$ ) durchführen. Die Genauigkeit dieser Messungen kann dabei besser als 1% sein <sup>41, 52</sup>). Die Hauptanwendung finden Mikroskop-Photometer in der Histologie. Zusammenfassungen dieser Benutzungsarten finden sich z. B. bei <sup>5</sup>) und <sup>54</sup>).

## 2.2. Cytophotometrische Messungen in situ

Bei cytophotometrischen Messungen werden Schnitte biologischen Gewebes fixiert und gefärbt, um einzelne Komponenten oder Strukturen in der Zelle sichtbar zu machen. Die Intensität der Anfärbung wird als Maß für die Konzentration oder die Menge des nachgewiesenen Stoffes genommen. Diese Betrachtungsweise ist jedoch nur bedingt gültig.

Das Beersche Gesetz gilt nur selten für gefärbte Schnitte <sup>54</sup>). Unterschiede im Brechungsindex der Zellkomponenten können zu Intensitätsverlusten führen, die nicht durch Absorption bedingt sind. Streuung vermag zu Fehlern zu führen, die dann besonders groß werden, wenn man einen größeren Bereich des Gewebsschnittes beleuchtet und die Messung jedoch — wie üblich — in einem kleinen ausgeblendeten Teilbereich vornimmt (sogenannter Schwarzschild-Villiger-Effekt). Manche Mikrophotometer sind so konstruiert, daß sie von diesem Effekt frei sind <sup>39, 40</sup>). Der größte Fehler entsteht bei der Cytophotometrie dadurch, daß das Produkt der Färbungsreaktion in der Zelle nie homogen verteilt ist. Das Ergebnis der photometrischen Messung wird daher stark vom Meßort in der Zelle abhängig sein. Diese Abhängigkeit kann man eliminieren, indem man an vielen Stellen mißt (scanning-Technik) und über die Meßwerte mittelt. Eine solche Mittelwertbildung kann auch über den Umweg über die photographische Platte und densitometrische Auswertung erfolgen. Eine zweite Methode mißt die Farbverteilung bei zwei Wellenlängen. Die durch das gefärbte Produkt bedingte Absorption muß bei beiden Meßwellenlängen in einem bestimmten Verhältnis stehen. Jede Änderung dieses Verhältnisses deutet auf Fehler, wie zum Beispiel inhomogene Verteilung, hin.

Bei cytophotometrischen Messungen wurden Nukleinsäuren mit Hilfe der Feulgen-Reaktion (Fuchsin-schweflige Säure) oder der Chrom-Gallo-

cyanin-Anfärbung bestimmt, ferner einige Proteine und einige Enzyme. Am meisten wurde die Feulgen-Färbung benutzt, für deren Messung viele Mikrospektrophotometer speziell eingerichtet sind. In der Cytophotometrie sind noch viele Fragen offen und ein erfahrener Histochemiker <sup>54)</sup> empfiehlt deswegen: „Wer sich nicht mit der Messung von Desoxynukleinsäuren beschäftigen will, sollte sich im Augenblick besser von der Cytophotometrie fernhalten.“ An dieser Situation dürfte sich bis heute auch nichts Grundsätzliches geändert haben.

Einen Teil der Problematiken histochemischer Färbereaktionen umgehen Methoden, bei denen bereits gefärbte Stoffe gemessen werden, wie zum Beispiel die Cytochrome. Deren Gehalt wurde in einzelnen Nieren- oder Leberzellen <sup>55)</sup> oder Mitochondrien <sup>56)</sup> in Mengen von  $10^{-20}$  Mol unter aeroben und anaeroben Bedingungen bestimmt.

Die Massen, die bei cytophotometrischen Messungen bestimmt werden, liegen im allgemeinen in der Größenordnung von 0,1 bis 100 pg <sup>5)</sup>. Sie sind damit um etwa 5 Zehnerpotenzen kleiner als die, welche man mit Hilfe hochempfindlicher analytischer Verfahren in homogener Lösung messen kann. Dennoch wurden Versuche unternommen, cytophotometrisch gefundene Werte dadurch zu bestätigen, daß der Farbstoff nach der Anfärbung aus dem Gewebsschnitt extrahiert und gemessen wurde <sup>57, 58)</sup>. Zur Ermittlung dieser kleinen Farbstoffmengen bot sich die Untersuchung in entsprechend kleinen Küvetten an.

### 2.3. Messung in Mikroküvetten nach Abtrennung

#### *Mikroküvetten*

Für die Untersuchung kleiner Lösungsmengen kommen Mikroküvetten in Frage <sup>59-74)</sup>, die in Kombination mit handelsüblichen Spektrophotometern benutzt werden, welche eine Durchstrahlung der Probe mit parallelem Licht ermöglichen. Heute wird man deswegen kaum noch gezwungen sein, sich ganze Küvetten-Mikrophotometer im Eigenbau durch Kombination mit Mikroskopen <sup>64, 67)</sup> selbst herzustellen. Mikroküvetten werden käuflich geliefert (z.B. von Hellma, Unicam, Zeiss u.a.). Die Durchflußküvette von Zeiss gestattet dabei in Verbindung mit einer besonderen Illuminationsanordnung die Untersuchung von 20  $\mu$ l Lösung, auch im UV, in Schichtdicken von 1 cm auch im stationären Betrieb. Wünscht man noch geringere Volumina zu untersuchen, so muß man Kapillaren mit noch geringerem inneren Durchmesser verwenden <sup>11)</sup>. Bei 1 cm Schichtdicke benötigt man 7,9  $\mu$ l, um Kapillaren von 1,0 mm lichter Weite zu füllen und 1,8  $\mu$ l für solche von 0,5 mm lichter Weite. Das Arbeiten mit derartig engen Kapillaren ist jedoch schon schwierig. Es erfordert vor allen Dingen eine sehr exakte Fixierung der Küvetten auf dem Probenwechsler und dessen genaue Führung im Strahlengang beim

Küvettenwechsel. Präzise Probenwechsler (z.B. für das Beckman DU 75, 76) sind beschrieben.

Das Problem der reproduzierbaren Verschiebung der Küvetten im Strahlengang begrenzt auch praktisch die an sich interessanten Möglichkeiten von Küvetten mit spiegelnden Wänden<sup>74)</sup>, bei denen das Licht zick-zack-förmig die Probelösung mehrfach durchläuft. Die optische Weglänge ist dann um ein Mehrfaches (hier<sup>74)</sup> ein Dreifaches) größer als die geometrische.

Mikroküvetten sind entweder rohrförmig oder trogförmig ausgebildet. Hansen<sup>77)</sup> weist darauf hin, daß Küvetten mit kreisförmigem Durchmesser besser vom Licht durchstrahlt werden als trogförmige. Bei diesen muß eine zusätzliche rechteckige Blende angebracht werden, um die Fortpflanzung des Lichts in der Wand der Küvette zu verhindern. Durch diese Begrenzung ergibt sich ein Energieverlust und als Folge eine Verschlechterung der effektiven Bandbreite. Trogküvetten haben jedoch den großen Vorteil, leicht gefüllt werden zu können.

Um die optischen Vorteile der Rohrküvetten beibehalten zu können, versucht man bei fester Stellung einer Küvette im Strahlengang mit Mikrodurchflußzellen<sup>78-80)</sup> zu arbeiten. Man mißt Probelösung und Leerlösung in der gleichen Küvette zeitlich kurz nacheinander und vermeidet so auch die Schwierigkeiten, die durch den mechanischen Küvettenwechsel und Küvettenungleichheit bedingt sind. Mikrodurchflußzellen werden meist direkt in Kombination mit Chromatographiesäulen benutzt. Bei einem solchen kontinuierlichen Durchflußbetrieb entfällt dann auch noch das Füllproblem. Empfindliche Messungen sind möglich. Kirkland<sup>80)</sup> bestimmt so z.B. 10 ng verschiedener Herbicide (Phenylharnstoffderivate) in 7 µl Lösung in 1 cm Schichtdicke nach chromatographischer Trennung. Ebenso wie Lang<sup>79)</sup>, der noch weniger als 1 ng Chromat in Durchflußküvetten von 10 cm Länge und 1 mm Innendurchmesser mißt, berichtet er nur über geringfügige wechselseitige Beeinflussung der getrennten Substanzen durch unvollständiges Auswaschen aus der Küvette.

Versuche<sup>78)</sup> mit Küvetten vom Trogtyp (48 mm Schichtdicke, 0,15 ml Füllvolumen), die Blenden mit 1,6 mm Durchmesser an beiden Stirnseiten trugen, ergaben die Notwendigkeit, beim Zeiss PMQ 2 die Spaltweiten zu vergrößern. Im Bereich des sichtbaren Lichts verschlechterte sich die effektive Bandbreite hierdurch von 0,1 auf 0,2 nm, was aber in Anbetracht der vielen anderen Unzulänglichkeiten ultramikrochemischer Messungen belanglos war. Maß man die gleichen Lösungen wiederholt in Makroküvetten (50 mm Schichtdicke) und in der Mikroküvette, so waren die Messungen in der letzteren mit einer etwa 4mal größeren Standardabweichung behaftet. Da das Füllvolumen der Mikroküvetten nur 1/40 des der Makroküvetten betrug, war eine echte Empfindlichkeitssteigerung

um den Faktor 10 erreicht. Dieses Beispiel zeigt, daß dem Versuch, durch Verringerung des Volumens der zu messenden Lösung größere Empfindlichkeiten zu erzielen, wegen der steigenden Fehler bald Grenzen gesetzt sind. Nur in seltenen Fällen kann man mikrophotometrische Analysen in Volumina durchführen, die kleiner als etwa ein Mikroliter sind.

Dennoch lassen sich mit dieser Methode sehr empfindliche Bestimmungen anstellen. *Malmström* und *Glick* <sup>64)</sup> analysierten z.B. Gehalte von 1 bis 10 ng Zink nach Ausschütteln des Dithizonates mit Chloroform auf  $\pm 0,7$  ng genau. Chromat konnte mit der Diphenylcarbaid-Reaktion im Bereich von 5 bis 100 ng mit einer Standardabweichung von etwa 5% bestimmt werden.

#### 2.4. Aufarbeitung zur mikrophotometrischen Bestimmung

Die mikrophotometrische Bestimmung setzt eine sorgfältige Aufarbeitung des Probegutes vor der eigentlichen Messung voraus.

Trübungen müssen entfernt werden, wozu sich bei wässrigen Lösungen die Filtration durch ein Membranfilterscheibchen am besten eignet. Dieses liegt auf einer abgeschnittenen Kapillare als Trichter <sup>81)</sup> auf.

Vor der Messung muß die zu photometrierende Lösung ferner zu einem definierten Volumen aufgefüllt werden. Hier können im Bereich unter 1 ml Volumen die Meßkölbchen dienen, die *Kirk* <sup>10</sup> beschreibt. Sie haben jedoch den Nachteil, einen sehr engen Hals zu haben. Man kann deswegen in diesen Kölbchen kaum eindampfen, was aber meist beim quantitativen Überführen der Lösung in das Meßgefäß nötig ist. Schliffmeßkölbchen <sup>82)</sup> ermöglichen das dahingegen. Mit ihrer Hilfe kann ein Volumen von 0,35 ml mit einer Standardabweichung von 0,5%, eines von 0,1 ml Fassungsvermögen mit 2% relativer Standardabweichung aufgefüllt werden. Noch geringere Volumina kann man dosieren, indem man die Probe ganz zur Trockne bringt und sie dann mit einem bekannten Volumen eines Lösungsmittels aufnimmt. Häufig verbietet sich dieses Vorgehen jedoch aus chemischen Gründen. Weiterhin kann man eine zweite Substanz als inneren Standard zusetzen und alle Messungen auf diesen beziehen. Die Bestimmung der Konzentration des Standards muß dann einfach und genau möglich sein. Durch seinen Zusatz darf die Analyse des eigentlich zu bestimmenden Stoffes nicht gestört werden.

Schließlich kann man eine zu photometrierende Verbindung durch Ausschütteln in ein definiertes Volumen überführen. Dabei lassen sich oft noch Anreicherungen erzielen, wenn man das Volumen des organischen Lösungsmittels geringer wählt als das der wässrigen Schicht. Das verwandte Lösungsmittel darf nicht sehr flüchtig sein, um die nachfolgende photometrische Bestimmung nicht zu verfälschen. Es sollte ferner in Wasser nicht zu gut löslich sein, um die Volumenvorgabe nicht zu sehr

zu beeinflussen. Für derartige Mikroextraktionen bewährt sich z. B. Amylacetat. — Ausgeschüttelt wird in einem kleinen Zentrifugenglas. Die organische Phase wird mit Hilfe eines spitz ausgezogenen Glasrohrs abgezogen, das durch eine Gummikappe verschlossen ist. Die organische Schicht wird zur Trocknung und Klärung durch ein Papierfilterchen (5 mm Durchmesser) filtriert. 10 bis 200 ng Kupfer können so als Diäthyl-dithiocarbamidat aus 1 ml Lösung mit 0,2 ml Amylacetat ausgeschüttelt <sup>83)</sup> und mit 5 ng Standardabweichung bestimmt werden.

## 2.5. Andere Arbeitstechniken zur Spektrophotometrie kleiner Probenmengen

Das etwas umständliche Arbeiten mit Mikroküvetten versucht man gelegentlich zu umgehen. Zur Spektrophotometrie im Submikrogrammbereich wird z. B. vorgeschlagen, die verdünnte Probelösung in Form eines kleinen Tropfens in eine Ölschicht zu geben <sup>84)</sup>. Man engt nun diese Lösung durch Verdunsten bis maximal auf das 300fache ein. Das Volumen des dann resultierenden Tröpfchens wird aus dem mikroskopisch gemessenen Durchmesser bestimmt und die Farbintensität wird mit Hilfe eines Mikroskopphotometers gemessen. Versuche unter Verwendung von Gelschichten <sup>85)</sup> oder von Ölfilmen <sup>86)</sup> wurden schon früher durchgeführt. Man konnte mit ihnen etwa  $10^{-14}$  g Barium-Ionen oder Eisen-Ion in Tröpfchen von  $10^{-9}$  bis  $10^{-11}$  ml Volumen identifizieren <sup>86)</sup>.

Submikrogramm-Mengen von Kobalt wurden in einer kleinen Boraxperle an Hand der Blaufärbung analysiert. Die Perle wurde im geschmolzenen Zustand in eine aus Gold bestehende Form gegossen und so in dickere Schicht gebracht <sup>87)</sup>.

Mikrophotometrische Messungen sind nicht auf das Vorliegen der zu messenden Substanz in fester oder gelöster Form beschränkt. Derartige Bestimmungen können auch an Stoffen in der Gasphase erfolgen. Zum Beispiel läßt sich Quecksilber bestimmen, wenn man eine Quecksilberlampe als Lichtquelle verwendet. Das von ihr ausgesandte Licht wird durch eine Küvette geschickt, die die zu messende Quecksilbermenge in Dampfform enthält. Man mißt die Absorption an einer Resonanzlinie. Diese Anordnung wird wegen des relativ hohen Dampfdrucks des Quecksilbers, auch in seinen Verbindungen, bei Zimmertemperatur betrieben <sup>100)</sup>. Wenn es sich auch nicht um ein typisches Mikroverfahren handelt (Küvette mit 35 cm Schichtdicke und 1 cm Durchmesser), so soll das Verfahren wegen seiner großen Empfindlichkeit hier doch erwähnt werden. Es können noch 0,3 ng Quecksilber bestimmt werden.

Nach dem gleichen Prinzip, jedoch in der höheren Temperatur einer Flamme, arbeitet das Verfahren der Atomabsorption. Die Empfindlichkeit dieser Methode zur Bestimmung anorganischer Bestandteile ist

meistens noch größer als die photometrischer Verfahren unter Verwendung von Lösungen. Dazu gibt es eine Reihe von Vergleichen, unter anderem von neuesten Messungen <sup>101)</sup>. Konventionelle Geräte benötigen eine Lösungsmenge von mindestens 0,1 ml, um ein auswertbares Ergebnis zu erhalten. Mikroverfahren sind jedoch für die Atomabsorptionsspektroskopie ebenfalls angegeben <sup>102)</sup>. Sie ermöglichen durch Benutzung sehr schnell registrierender Schreiber und durch elektronische Differentiation des Signals die Analyse einzelner Tropfen von Lösungen, in denen dann z.B. 10 pg Kupfer noch nachgewiesen werden <sup>103)</sup>.

## 2.6. Densitometrie

Nach Trennungen durch Elektrophorese, Dünnschichtchromatographie oder Papierchromatographie werden die abgetrennten Produkte mitunter direkt auf dem Trägermaterial durch Absorptionsspektrometrie bestimmt. Bei dieser „Densitometrie“, die wegen ihrer Einfachheit besonders gern bei klinisch-chemischen Untersuchungen angewandt wird, bestehen jedoch gewisse Schwierigkeiten <sup>88)</sup>. Die Stöchiometrie vieler Reaktionen, mit deren Hilfe ein isoliertes Produkt auf dem Träger in eine gefärbte Komponente umgewandelt werden soll, ist häufig unsicher. Das gilt besonders für die Bestimmung von Proteinen. Durch die Streuung der zur Chromatographie benutzten Trägermaterialien (Papier, Kieselgel) werden zusätzliche Fehler verursacht. Manchmal gelingt es, diesen Effekt durch Zusatz von Flüssigkeiten mit gleichem Brechungsindex wie das Trägermaterial zu verringern. Manche Trennungen können auch auf transparenten Folien, wie Celluloseacetat, durchgeführt werden.

Die Probleme der Densitometrie wurden oft diskutiert <sup>90, 91)</sup>. Semiempirische Gleichungen über Zusammenhang zwischen Transmission und Masse des Materials wurden aufgestellt <sup>92)</sup>. Zur Densitometrie benutzt man besondere Geräte <sup>90, 93)</sup> oder zieht das Chromatogramm vor den Spalt eines Photomultipliers eines herkömmlichen Spektrophotometers vorbei <sup>94, 95)</sup>. Nach diesem Prinzip arbeiten auch die käuflichen Zusätze zu Spektralphotometern.

Materialmengen, die kleiner sind als 1 Mikrogramm, lassen sich von Aminosäuren <sup>92)</sup> oder anorganischen Spurenbestandteilen <sup>96)</sup> mit Standardabweichungen von etwa 5% <sup>92)</sup>, ja sogar unter 1% <sup>96)</sup>, bestimmen. Densitometrie ist auch im UV-Bereich möglich. So können z.B. Nucleosidbasen auf Papier erfaßt werden <sup>89)</sup>.

*Edström* <sup>97)</sup> bestimmte 0,1 bis 1 ng Ribonucleinsäure in Nervenzellen mit einem Fehler von 0,01 ng. Er isolierte die Zellen und behandelte sie mit Ribonuclease. Die Ribonucleinsäuren wurden dadurch in lösliche Bruchstücke zerlegt, die extrahiert wurden. Die Extrakte wurden auf Cellophanstreifen von 25 × 150  $\mu$  Größe aufgesaugt und diese dann im

UV-Licht bei 257 nm photographiert. Die Photographien wurden densitometrisch ausgewertet. In einer späteren Arbeit <sup>98)</sup> wurden die einzelnen Basen der Ribonucleinsäuren sogar durch Elektrophorese auf Cellulosefäden von 15  $\mu$  Durchmesser getrennt. Die einzelnen getrennten Zonen wurden dann wieder durch Densitometrie bestimmt. Eine Genauigkeit von 7% wurde bei der Bestimmung der einzelnen Basenbestandteile des RNS-Gehalts einzelner motorischer Vorderhorn-Zellen erreicht. Nach ähnlichen Prinzipien wurde auch der Proteingehalt einzelner Zellen bestimmt <sup>99)</sup>.

### 3. Mikrophotometrische Messungen im infraroten Spektralbereich

Während die Bedeutung mikrophotometrischer Verfahren im Gebiet des sichtbaren Lichts nicht sehr groß ist, weil viele organische Stoffe in diesem Bereich nicht absorbieren und weil kleine Mengen anorganischer Stoffe heute mit anderen Verfahren (Aktivierungsanalyse, Röntgenfluoreszenz, elektrochemische Methoden usw.) besser bestimmt werden können, darf man der Mikrospektrophotometrie im infraroten Spektralbereich für die Zukunft steigende Bedeutung vorhersagen.

Die Infrarotspektrographie ist eines der zuverlässigsten Verfahren zur Identifizierung organischer Stoffe. Nachteilig bei ihrer Anwendung ist, daß nur weitgehend reine Substanzen einfach untersucht werden können. Wegen dieser Einschränkungen hat sich die Infrarotanalyse noch nicht recht in die organische Ultramikroanalyse einbürgern können, weil bis vor nicht allzu langer Zeit kaum Verfahren zur Verfügung standen, mit deren Hilfe organische Stoffe im Mikrogramm- und Submikrogramm-Bereich rein dargestellt werden konnten. Durch Entwicklung der Dünnschichtchromatographie und vor allen Dingen der Gaschromatographie hat sich in den letzten 10 Jahren die Situation jedoch stark verändert. Gerade das letztere Verfahren gestattet Trennung und einen — allerdings ziemlich unspezifischen — Nachweis von Stoffen in Mengen von wenigen Nanogrammen.

Eine Kombination der beiden chromatographischen Verfahren, die gerade im Mikrogramm-Bereich ihre größte Wirksamkeit erzielen, mit der Infrarotanalyse bedeutet eine erhebliche Erweiterung der organischen Mikroanalyse, die auch hier wieder vor allen Dingen der biochemischen Analyse zu Gute kommt, die sich mit Metabolitenforschung, Aufklärung immer komplexerer Gemische von Naturstoffen und der Notwendigkeit der Steigerung der Spezifität der klinisch-chemischen Analyse auseinander zu setzen hat. Eine solche Kombination macht jedoch die Ausnützung von Infrarotmethoden notwendig, die die höchste Empfindlichkeit erreichen.

Die Nachweisgrenze der IR-Verfahren liegt bei ungefähr 0,1 Mikrogramm. Im Vergleich zu den Röntgen- und UV-optischen Methoden läßt die Infrarotanalyse daher nicht so spektakuläre Ergebnisse erwarten und als Infrarot-Mikro-Verfahren werden in der Literatur im Allgemeinen Methoden zur Untersuchung von Mengen verstanden, die kleiner sind als ein Milligramm. Anders als bei den UV- und Röntgen-Methoden spielt auch die Untersuchung in situ mit Hilfe der IR-Spektroskopie keine Rolle. Zellen haben Größen von einzelnen  $\mu$ , während subzelluläre Organellen, deren chemische Untersuchung an sich von größter Bedeutung ist, wenige Zehntel  $\mu$  nur groß sind und zum Teil noch kleiner sind. Wie sich aus der Beugungstheorie ergibt, ist bei Verwendung von IR-Licht grundsätzlich eine direkte Untersuchung derartig kleiner Objekte nicht möglich. Dennoch können Infrarotmikroskope und Mikroilluminatoren mit schwächerer Vergrößerung bei der Untersuchung kleinster Substanzmengen mit Nutzen verwandt werden.

### 3.1. Infrarotmikrospektrographen

Schon vor etwa 20 Jahren wurden von *Burch* <sup>103)</sup> und *Wood* <sup>104)</sup> im Infrarotgebiet brauchbare asphärische Spiegelsysteme mit relativ hoher numerischer Apertur und guter Bildqualität angegeben, die mit einem Infrarot-Monochromator (Perkin-Elmer) zu Infrarot-Reflexionsmikroskopen kombiniert wurden <sup>104, 105)</sup>. Sphärische Optik, die einfacher herstellbar ist, ohne allerdings ganz so hohe numerische Apertur zu haben, wurde von *Gore* <sup>106)</sup> und von *Blout* <sup>107-109)</sup> beschrieben. Mikroskop-Monochromator-Kombinationen sind auch mit dieser sphärischen Optik erstellbar <sup>106-108, 110, 111)</sup>. Weiter wurden Systeme unter Verwendung von Linsenoptik (aus AgCl <sup>112, 113)</sup> oder KBr) vorgeschlagen.

Sehr leistungsfähige Strahlenkondensoren sind heute zu den meisten Infrarotgeräten käuflich erhältlich (Leitz, Perkin-Elmer, Beckman, Unicam, RIIC, Barnes Engineering u.a.) Als repräsentativ für die ganze Gruppe können etwa die folgenden Daten angesehen werden. Mit Hilfe von Reflexionsoptik (nach <sup>110)</sup> ist die Bündelung des Infrarotstrahls auf eine Fläche mit 1,5 mm Durchmesser möglich, wobei etwa 35% der Primärenergie erhalten bleiben (Perkin-Elmer). Mit Hilfe eines auf Linsenoptik beruhenden Kondensors (nach <sup>112)</sup> können 70% der Strahlenergie auf eine Fläche von  $1 \times 4$  mm Größe konzentriert werden (Beckman).

Beim Zusammenbau eines Infrarot-Mikrospektrographs wird das Mikroskop, bzw. der Strahlenkondensator stets vor den Monochromator gesetzt <sup>104, 107, 108)</sup>, auch bei den käuflichen Geräten. Das hat den Vorteil, daß man das Infrarotgerät leicht wieder für den üblichen Verwendungszweck umbauen kann. Diese Anordnung hat auf der anderen Seite den Nachteil, daß die Probe von der gesamten Intensität des Primärlichts

getroffen wird. Störungen dürften sich aber nur bei sehr empfindlichen Substanzen ergeben und es gibt an dieser Aufstellung nur gelegentlich Kritik <sup>114</sup>.

Man verwendet zur Kompensation im Vergleichsstrahl eine Gasküvette <sup>115</sup>) oder optische Abschwächer, wie Blenden und rotierende Sektoren. Durch völlig symmetrischen Aufbau des Strahlenganges, also Einbau eines Strahlenkondensors auch im Vergleichsstrahlengang, lassen sich wohl die besten Ergebnisse erzielen. Mit einer solchen Kombination wurden die bis heute kleinsten Stoffmengen (50 ng) infrarotspektrographisch untersucht <sup>116</sup>).

Hohe Symmetrie des Strahlengangs haben auch spezielle Infrarot-Mikroskop-Photometer, bei denen mit Hilfe eines kleinen Spiegels der Strahl erst durch die zu untersuchende Stelle und dann eine Vergleichsstelle im Präparat gelenkt wird <sup>117</sup>). Bei einer ähnlichen Anordnung <sup>42</sup>) werden Probe und Leerprobe auf einem Schlitten ständig im feststehenden Untersuchungsstrahl hin- und hergeschoben.

Zusatzeinrichtungen ermöglichen auch unter Verwendung kleinster Probemengen Mikrountersuchungen bei tiefen Temperaturen <sup>118</sup>), im polarisierten Licht <sup>119</sup>) oder in Reflexion in einer Fläche von 0,2 mm<sup>2</sup> <sup>120</sup>).

Die kleinsten durch Infrarotspektrographie noch nachweisbaren Konzentrationen wurden in Abhängigkeit von der Untersuchungswellenlänge und von apparativen Daten berechnet <sup>121</sup>). In der Praxis wurden mit Hilfe der Mikroilluminatoren Untersuchungen an Probemengen von 0,1 bis 1 µg organischer Substanzen durchgeführt <sup>105, 106, 110</sup>), wobei aber schon immer darauf hingewiesen wurde <sup>111</sup>), wie schwierig es praktisch sei, diese kleinen Materialmengen zu isolieren und zu handhaben.

Mit Hilfe elektronischer Hilfsmittel, wie der Ordinatenvergrößerung <sup>122</sup>), läßt sich das Signal-Rausch-Verhältnis so weit verbessern, daß die Nachweisgrenzen eventuell um eine Zehnerpotenz verbessert werden können <sup>116, 122-125</sup>). Die Anwendung dieses Verfahrens setzt jedoch voraus, daß die Null-Linie des Spektrums konstant ist, bzw. daß das Rauschen gering gegenüber den zu verstärkenden Banden ist. Diese Forderung findet sich in der Praxis nur dann erfüllt, wenn die Energie im Meßstrahl nicht unter einem gewissen Mindestmaß liegt. Es gelingt, mit der Ordinatenvergrößerung, Banden stärker sichtbar zu machen und somit schwache Banden, die in einem Normalspektrum nur unsicher zuzuordnen sind, zu verdeutlichen. Es gelingt in keinem Fall, Banden zum Erscheinen zu bringen, die ohne die Ordinatenvergrößerung nicht wenigstens im Spektrum angedeutet wären. Für die Praxis stellt dieses Hilfsmittel für den Mikroanalytiker daher wohl mehr eine Möglichkeit dar, um etwas größere Mengen (größer als einige Mikrogramme) zu untersuchen und eventuell mit kleineren Fehlern zu vermessen.

Erfolgversprechender, wenn auch aufwendiger, erscheint die Anwendung eines in der Kernresonanzspektroskopie benutzten Prinzips <sup>126)</sup>, durch wiederholtes Abfahren des Spektrums, Sammeln der Daten in einem elektronischen Speicher und anschließende Datenverarbeitung mit Hilfe eines Computers die Auswertung zu verbessern. In der Infrarotanalyse wurde diese Methode auch bereits nutzbringend verwandt <sup>127-129)</sup> So gelang es z. B. mit Hilfe eines CAT 400 A (computer of average transients) eine  $5,6 \times 10^{-4}$  molare Lösung von Methylaethylketon in Tetrachlorkohlenstoff in einer Lösungsküvette mit 0,1 ml Schichtdicke zu untersuchen <sup>127)</sup>. Eine Vergleichsküvette, nur mit dem Lösungsmittel gefüllt, befand sich im Vergleichsstrahl. Nach einmaliger Registrierung war keine Carbonylbande erkennbar. Nach 256fachem Abtasten des Spektralbereichs um diese Bande und Datenverarbeitung, wozu pro Durchgang 32 Sekunden benötigt wurden, war die Carbonylbande eindeutig nachweisbar und das erhaltene Spektrum glich dem einer 0,56 molaren Lösung des Ketons in Tetrachlorkohlenstoff. Auch dieses Verfahren setzt hohe Stabilität und Leistungsstärke des optischen Systems voraus.

### 3.2. Untersuchung von Proben in Mikropreßlingen

Zur Herstellung von kleinen Preßlingen wird meistens KBr in Spezialmikropreßwerkzeugen verarbeitet <sup>130-132)</sup>, die oft käuflich erhältlich sind. Preßlinge mit einem Durchmesser bis zu 0,5 mm und einer Schichtdicke von etwa 1 bis 2 mm können hergestellt werden. Die benötigte KBr-Menge beträgt dann größenordnungsmäßig etwa 1 mg, in der die üblichen Konzentrationen an Material, also etwa 0,1 bis 1%, untersucht werden können. Spektren von 1 Mikrogramm Substanz <sup>132, 125, 133)</sup> und weniger <sup>116)</sup> sind beschrieben worden.

Es ist bei der Handhabung dieser kleinen Substanzmengen schwierig, Feuchtigkeit zu vermeiden und die gesamte zu analysierende Substanz quantitativ in das KBr zu überführen, mit dem sie dann noch homogen verrieben werden muß. In der Literatur finden sich daher auch viele Varianten, um die Preßlingsmethodik zu verbessern.

Um den Umgang mit dem Mikropreßwerkzeug mit Stempeln von 0,5 mm Durchmesser zu umgehen, wurde z. B. vorgeschlagen <sup>134, 135)</sup>, in die Mitte eines größeren KBr-Scheibchens von etwa 12 mm Durchmesser eine Vertiefung zu bohren, in die dann Probe und KBr-Gemisch gegeben werden. Darauf wird mit einem Preßwerkzeug mit größerem Stempel zu einem homogenen Preßling gepreßt, dessen nicht interessierender, leerer äußerer Teil durch eine Blende bei der Untersuchung abgedeckt wird. Ähnlich kann man durch Benutzung von Reduzierringen aus Blei <sup>136)</sup> und der Makropreßform kleinere KBr-Preßlinge herstellen, in denen etwa 50 µg Material untersucht werden können. Aluminiumfolie, in die

ein Loch geschlagen wird, das das KBr-Probe-Gemisch aufnimmt, wird ebenfalls als Träger empfohlen <sup>124, 137</sup>). Der Vorteil der Folie liegt darin, daß man das Probegut in sie einschlagen und das gesamte Folienpaket im Preßgerät gut zum Mikropreßling verarbeiten kann. Günstig wirkt hier, daß zur Herstellung der kleinen Preßlinge kein hoher Preßdruck notwendig ist und daß ein Schraubstock schon zur Druckerzeugung genügt <sup>133</sup>).

Zur Vermeidung von Beugungseffekten muß bei infrarotspektrographischen Untersuchungen das Material in so fein verteilter Form vorliegen, daß die Korngröße etwa von der Größenordnung der Wellenlänge des Untersuchungslichtes ist. Diesen feinen Körnungsgrad versucht man durch Verreiben der Probesubstanz mit KBr zu erzielen. — Den gleichen Effekt erreicht man in recht reproduzierbarer, aber langwierigerer Weise durch Lyophylylation <sup>138, 140, 141</sup>). Probleme treten dabei auf, wenn das Probematerial wasserunlöslich ist. Für diesen Fall wird Lyophylylation unter Verwendung organischer Lösungsmittel vorgeschlagen <sup>8</sup>). Häufig hat man den zu untersuchenden Stoff in Lösung vorliegen. In diesem Fall kann man das Lösungsmittel abdampfen und den Trockenrückstand untersuchen, solange das Untersuchungsgut bei diesem Vorgehen nicht verflüchtigt oder chemisch umgewandelt wird. Das Lösungsmittel wird direkt auf dem zum Verpressen vorgesehenem KBr-Pulver oder in kleinen Schälchen aus KBr <sup>139</sup>) abgedunstet, die dann nach dem Eintrocknen in einem kleinen Achatmörser fein zerrieben und dann gepreßt werden. Mit einer speziellen Schleiftechnik lassen sich auch kleine NaCl-Scheiben von etwa  $2 \times 5$  mm Größe herstellen, auf denen die zu untersuchende Lösung eingedunstet wird, die dabei aber nicht die Oberfläche des Scheibchens korrodieren darf.

Die Inhaltsstoffe wäßriger Lösungen können nach sorgfältiger Trocknung auch untersucht werden. Hierbei kann eventuell AgCl als Trägermaterial vorteilhaft sein, das unter Verwendung von Stempeln mit Teflonüberzügen leicht verpreßt werden kann. Im Prinzip können wäßrige Lösungen auch auf kleinen Diamant-Scheibchen eingedunstet und der Trockenrückstand auf diesen untersucht werden. Mikro-Diamantzellen sind beschrieben, die an sich zur Untersuchung von Mikrogramm-Mengen organischer Stoffe bei hohem Druck entwickelt wurden <sup>144</sup>).

Die meisten infrarotspektrographischen Mikrountersuchungen dienen bislang wegen der Schwierigkeiten der Probenpräparation nur dem qualitativen Nachweis. Grundsätzlich kann das Verfahren aber zu quantitativen Aussagen herangezogen werden. So wurden z. B. Kohlehydrate in Mengen von  $40 \mu\text{g}$  unter Benutzung von Bleirhodanid als innerem Standard bestimmt <sup>138</sup>). *Corneteau* analysiert nichtflüchtige, toxische Stoffe, die er aus biologischem Material isoliert, in Mengen von 10 bis  $50 \mu\text{g}$  mit Gesamtfehlern von 5 bis 20%.

Vorzüge und Grenzen der Preßlingsmethode werden — auch für den Mikrobereich — in einer Übersichtsarbeit diskutiert <sup>143)</sup>. Erwähnt sei auch noch, daß Herstellerfirmen von Infrarotgeräten durch werkseigene Schriften (Leitz-Berichte für das IR-Labor, Perkin-Elmer-UR-Tips, Unicam Bulletins usw.) oft wertvolle Hinweise für Probenpräparationen geben.

### 3.3. Untersuchungen mit Hilfe einer Mikro-Mull-Technik

Bei Vorliegen größerer Substanzmengen wird gern die Mull-Technik verwandt, bei der man das Untersuchungsgut mit Paraffinöl verreibt und die Suspension dann auf eine NaCl-Scheibe überführt, die als Träger in den Strahlengang eingesetzt wird. Es erscheint verständlich, daß diese Technik sich kaum für den Umgang mit Mikrogramm-Mengen eignet. Ein „Mikro-Mull-Verfahren“ <sup>145)</sup> benötigt in Wirklichkeit 2 mg Probestanz, und beim Untersuchen von etwa 10 µg Material <sup>146)</sup> mit der Mull-Technik wird keine Angabe über die Ausbeute bei der Überführung gemacht. Über ein praktikables Mikro-Mull-Verfahren soll weiter unten im Zusammenhang mit der Mikro-Spiegelreflexions-Methodik berichtet werden.

### 3.4. Untersuchungen unter Verwendung von Mikroflüssigkeitsküvetten

Für die direkte Untersuchung von Lösungen oder flüssigen Stoffen stehen auch im Mikrobereich entsprechende Flüssigkeitsküvetten zur Verfügung. Mit diesen ist z. B. die Analyse von 0,8 µg Benzil in Tetrachlorkohlenstoff möglich <sup>148)</sup>. Auch hier findet man jedoch wieder die Angabe, daß die Untersuchungstechnik zwar die Analyse von 1 Mikrogramm Material ermöglicht, daß aber wegen der Verluste bei der Überführung des Materials in die kleinen Küvetten tatsächlich ein Mehrfaches dieser Menge benötigt wird. Andere Autoren geben daher als Mengen, die in Mikroflüssigkeitsküvetten untersucht werden können, etwa 5 µg <sup>149, 150)</sup> bis 10 µg <sup>151)</sup> an. Da man im IR-Bereich bei Verwendung von Schichtdicken von 1 mm meist mit etwa 1%igen Lösungen der Substanz als Standardkonzentration arbeitet <sup>8)</sup>, ergibt sich für die Spektroskopie in Ultramikroküvetten, deren Volumen 1 µl und zum Teil unter 0,1 µl beträgt, ein Arbeitsbereich mit einer unteren Grenze von einigen Mikrogrammen.

Als Material für die Küvetten werden meist KBr oder NaCl verwandt <sup>149–154)</sup>, die mit schnelllaufenden (400 U/min.) Bohrern oder Fräsern gut bearbeitet werden können. Bei Schmierung mit Bohrlöl oder Methanol wird ein Nachpolieren sogar unnötig <sup>151)</sup>. Man verwendet Blöcke <sup>151)</sup> oder Scheiben <sup>152, 154)</sup>, in die man das Küvettenvolumen einätzt <sup>152)</sup> oder einfräst <sup>154)</sup>. Man kann auch ein KBr-Scheibchen pressen, auf das dann ein Platindraht zusammen mit weiterem KBr aufgelegt wird. Nach erneutem Verpressen ist der Draht dann zwischen KBr ein-

geschlossen. Er wird herausgezogen und man erhält so das gewünschte Lumen für die Mikroflüssigkeitsküvette <sup>150, 153</sup>). Gelegentlich <sup>148</sup>) wird auch AgCl als Küvettenmaterial verwandt, das mit einer besonderen Preßvorrichtung als Rohr mit einem inneren Durchmesser von 0,07 mm ausgepreßt wird. Ultramikroküvetten werden heute von den meisten Firmen, die Infrarotspektrographen herstellen, und auch von anderen Firmen geliefert. Typische Daten sind zum Beispiel: 0,07  $\mu\text{l}$  Füllvolumen bei 0,025 mm Schichtdicke (Beckman) oder 0,4  $\mu\text{l}$  Volumen bei 0,1 mm Schichtdicke (Unicam). Thermostatisierbare Mikrozellen <sup>155</sup>) sind ebenfalls beschrieben, genau wie Vorschriften zur Füllung der vorgeschlagenen Küvetten <sup>148, 149, 151</sup>). Für empfindliche Messungen muß selbstverständlich eine Vergleichsküvette mit Lösungsmittel allein im Vergleichsstrahl angebracht werden.

### 3.5. Untersuchungen mit Hilfe der ATR-Methodik

Die Ergebnisse der ATR-Methodik sollen hier nur kurz erwähnt werden, denn ihre Spektren werden — wenn sie auch Absorptionsspektren ähnlich sehen — nicht in Durchstrahlung erhalten. ATR-Verfahren werden jedoch gelegentlich auch als Mikromethoden vorgeschlagen und es stehen zu diesem Zweck auch Mikro-ATR-Einrichtungen zur Verfügung <sup>156</sup>). Durch mehrfache Reflexion kann ferner die Intensität schwacher Banden verstärkt werden <sup>156–158</sup>). Allerdings ist bei mehrfach reflektierenden Kristallen auch die zu bedeckende Fläche größer, so daß die zum Nachweis nötigen Probenmengen erhöht werden müssen. Das *Beersche* Gesetz gilt, besonders für Lösungen <sup>158</sup>), bei denen nicht das Problem besteht, daß das Probematerial in schlechtem Kontakt mit der ATR-Kristallfläche stehen könnte, wie das etwa bei Papier der Fall sein kann <sup>159</sup>). Für die Praxis verwertbare Angaben über eine untere Nachweisgrenze der ATR-Methode finden sich kaum. Sie sind wegen des starken Einflusses des Probencharakters auf das Ergebnis auch wohl nicht allgemein gültig zu erwarten. Flüssigkeiten können bei Anwendung der Ordinaten-*dehnung* noch in Mengen von 0,08  $\mu\text{l}$  untersucht werden <sup>160</sup>). Ohne Ordinaten-*dehnung* sind etwa 0,4  $\mu\text{l}$  Probegut notwendig.

Diese Angaben stimmen größenordnungsmäßig mit Ergebnissen eigener Versuche überein, bei denen unter Verwendung einer Mikro-ATR-Einheit (6  $\times$  1 mm Fläche, KSR-5-Kristall, einfache Reflexion) eine Menge von 200  $\mu\text{g}$  Nujol an der intensivsten Bande bei 2930  $\text{cm}^{-1}$  eine Extinktion von 0,15 ergab. Das Paraffinöl bedeckte dabei den Kristall in dünner, homogener Schicht. Kristalline Stoffe ergaben wesentlich ungünstigere Nachweisempfindlichkeiten, so daß man als Ergebnis wohl sagen kann, daß die ATR-Methode für eine Anwendung in der Ultramikroanalyse wenig Aussicht bietet.

Möglicherweise ist jedoch ein Verfahren noch ausbaubar <sup>161)</sup>, bei dem mit Hilfe von Millipore-Filtern Partikel, wie kolloidale Trübstoffe, Pigmente oder Bakterien aus größeren Mengen Flüssigkeit abfiltriert und so erheblich angereichert werden. Das Filter wird dann an einen ATR-Kristall angepreßt und untersucht. Bei Benutzung einer gleichen ATR-Einheit mit „Leer-Millipore-Filter“ Vergleichsstrahlengang werden von 5 µg Substanz Spektren erhalten und Nachweisgrenzen von 1 µg angegeben.

### 3.6. Untersuchungen mit Hilfe des Verfahrens der Spiegel-Reflexion (Specular reflectance)

Bei der Spiegelreflexionsmethode werden — obwohl der unglücklich gewählte Name etwas anderes vermuten läßt — Absorptionsuntersuchungen durchgeführt. Dabei wird die zu untersuchende Substanz in dünner Schicht auf einen Spiegel aufgetragen. Dieser wird dann im Strahlengang so angeordnet, daß der Infrarotstrahl durch das Probegut hindurchfällt und an der reflektierenden Oberfläche des Spiegelmaterials zurückgeworfen wird. Er geht dann ein zweites Mal durch die Substanzschicht, um schließlich wieder in den Strahlengang zurückgeführt und spektroskopisch untersucht zu werden. Das Verfahren bietet den Vorteil, daß die Analysesubstanz zweimal durchstrahlt wird und bei schrägem Einfallswinkel eine fast dreifache Intensität gegenüber Spektren von Material gleicher Dicke in Durchstrahlung erhalten wird. Die Spiegelreflexionsmethode ist vor etwa 10 Jahren zur Untersuchung von Folien entwickelt worden. Mikroverfahren unter Ausnutzung von Spiegeln von etwa 10 mm Durchmesser wurden beschrieben <sup>162-164)</sup>. Beleuchtungseinheiten zur Ausleuchtung von etwa  $2 \times 5$  mm großen Spiegelflächen werden von fast allen Herstellern von Infrarotspektrographen und (recht preiswert) von Barnes Engineering angeboten.

Für eine empfindliche Anwendung der Methode ist es notwendig, das Untersuchungsgut auf jene Fläche zu konzentrieren, die im Strahlengang des Spektrometers ausgeleuchtet ist. Das gelingt mit den bislang benutzten größeren Spiegeln nur schwierig, weil die einzudunstende Lösung sich auf der Gesamtfläche verteilt. Außerdem scheidet sich auf größeren Flächen das Material nicht in einheitlich dicker Schicht ab.

Es wurden deshalb Spiegel aus V<sub>4</sub>A-Material mit 3 mm, 2 mm und 1 mm Durchmesser hergestellt <sup>165)</sup>, bei denen durch geeignete Formgebung erreicht wurde, daß die aufgesetzten Probetropfen nicht über den Rand des Mikrospiegelchens kriechen.

Zum Eindunsten wird ein warmer Luftstrom auf das Tröpfchen gerichtet. Der Trockenrückstand nichtflüchtiger Substanzen kann untersucht werden. Die Nachweisgrenze hängt von der Größe des Spiegels ab.

Mit einem Reflektor mit 2 mm Durchmesser lassen sich im allgemeinen Substanzen untersuchen, deren Menge mehr als 5 Mikrogramm beträgt. Unter Verwendung eines 1 mm großen Spiegels lassen sich Spektren von 1 bis 2  $\mu\text{g}$  Material erzeugen. Die Grenze ist zur Zeit nicht durch die Präparationstechnik gegeben, die sehr einfach ist und bei Verwendung primitiver Mikromanipulatoren und 0,5 mm großer Spiegeln auch noch gelingt. Diese kleinen Probeflächen werden jedoch mit den käuflichen Illuminatoren so ungünstig ausgeleuchtet, daß nur noch etwa 5% der Energie des Primärstrahls schließlich den Monochromatorspalt erreichen.

Da das Lösungsmittel vollständig entfernt wird, lassen sich auch wäßrige Lösungen sehr leicht untersuchen. Damit eröffnen sich viele Anwendungsmöglichkeiten der Infrarotmikroanalyse für die Untersuchung biologischen Materials, dessen Substanzen meist am besten in Wasser löslich sind. Die bisherigen Versuche zur Lösung des Problems der Analyse wäßriger Lösungen — etwa durch Verwendung von  $\text{D}_2\text{O}$  als Lösungsmittel und von kleinsten Schichtdicken — sind an verschiedenem Ort diskutiert worden <sup>167, 168</sup>).

Als Anwendungsbeispiel für die Analyse wäßriger Lösungen mit Hilfe des Mikrospiegelverfahrens wurde die Bestimmung von Proteinen gezeigt <sup>166</sup>). Eiweißmengen, die größer als 5 Mikrogramm sind, können auf einem 2-mm-Spiegel unter Verwendung von Ammoniumrhodanid als innerem Standard mit Standardabweichungen bestimmt werden, die kleiner als 15% sind.

Als Reinigungsverfahren diene bei der Proteinanalyse die Dialyse. Die Vorteile einer Kombination der Mikrospiegelmethode mit Trennverfahren, wie Ionenaustauschchromatographie oder Elektrophorese, die in ihrer Anwendung im wesentlichen auf wäßrige Lösungen beschränkt sind, liegt auf der Hand.

Auch das Spiegelverfahren setzt bei der Anwendung voraus, daß die Kristallgröße der abgetrennten Analysesubstanz einen Maximalwert nicht überschreitet, um Schwierigkeiten durch Beugung und Streuung zu vermeiden. Man muß also das Probematerial in homogener, amorpher oder mikrokristalliner Schicht abscheiden. Hierin besteht die Hauptschwierigkeit der Mikrospiegelmethode. Zur Lösung des Problems gibt es jedoch einige Wege.

Durch Auswahl des geeigneten Lösungsmittels gelingt es häufig, die günstigste Abscheidungsform zu finden. Das „geeignete“ Lösungsmittel soll die zu untersuchende Substanz möglichst gut lösen und bis ganz zum Schluß des Eindunstprozesses in Lösung halten. Zu diesem Zeitpunkt soll dann ein möglichst dünner Film der gesättigten Lösung den Spiegel völlig bedecken. Aus der dünnen Schicht dunstet dann der Rest des Lösungsmittels schnell ab, wobei die gelöste Substanz in Form kleiner Kristalle oder eines zusammenhängenden Films anfällt. Das Lösungs-

mittel soll eine gewisse Viskosität haben, um den Kristallisationsvorgang dadurch möglichst bis zum Schluß zu verzögern. Wegen dieser Forderung eignen sich polare, assoziierte Lösungsmittel besser als etwa Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Kohlenwasserstoffe oder Benzol. Das Lösungsmittel muß weiterhin den Spiegel gut benetzen. Schließlich beeinflusst auch der Siedepunkt des Lösungsmittels das Ergebnis. Solventien mit sehr hohem Siedepunkt können beim Abdunsten eine teilweise Verflüchtigung der zu untersuchenden Substanz verursachen. Lösungsmittel mit sehr niedrigem Siedepunkt, wie etwa Schwefelkohlenstoff, Aether oder Aceton, sind ebenfalls ungünstig. Sie verdunsten bereits bei Zimmertemperatur merklich und die Verdunstungswärme muß dabei von der Umgebung aufgebracht werden. Dabei kühlt sich das Spiegelchen ab und es kann sich Wasser auf ihm kondensieren, das zur Emulsionsbildung und anderen Störungen Anlaß gibt. Lösungsmittel mit einem Siedepunkt in der Nähe von 100 Grad Celsius bewähren sich am besten. — Letztlich darf das Lösungsmittel mit der zu präparierenden Substanz nicht reagieren. Die erfahrungsgemäß am besten verwendbaren Solventien — wie Ameisensäure, Acetylaceton und Diäthylamin — sind in dieser Hinsicht nicht vollständig ideal.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über verschiedene Lösungsmittel, die sich zur Präparation unterschiedlicher Stoffklassen am besten bewährten. Es stellt natürlich eine gewisse Einschränkung der Methode dar, daß für bestimmte Stoffgruppen besondere Lösungsmittel empfehlenswert sind. Man weiß ja bei der Analyse unbekannter Stoffe nicht, mit welcher Stoffart man es zu tun hat. Folglich läßt sich auch vielfach das geeignete Lösungsmittel nicht aussuchen. Hier macht es sich aber als Vorteil der Spiegelmethode bemerkbar, daß das Probegut nach dem Abdampfen des

Tabelle 2. Übersicht über zum Mikrospiegelverfahren empfehlenswerte Lösungsmittel

Zu präparierende Stoffe	Lösungsmittel
Zucker, anorganische Stoffe	Wasser
Nucleoside, Nucleotide, Basen von Nucleinsäuren	Ameisensäure
Organische Säuren	Ameisensäure oder Acetylaceton
Biogene Amine, Aminosäuren	Diäthylamin oder Pyridin
Alkaloide	Pyridin oder Diäthylamin oder Methanol-Benzol-Gemisch
Steroide	Pyridin-Aceton-Gemisch
Proteine	wäßriges 10%iges Ammoniak

Lösungsmittels noch für weitere Präparationsversuche zur Verfügung steht, falls vorherige Versuche nicht zu einem auswertbaren Spektrum geführt haben.

Als Beispiel der Ergebnisse der Präparationsmethodik zeigt Abb. 1 das Spektrum von 10 Mikrogramm Antipyrin, auf einem 2 mm Spiegel aus Ameisensäure abgeschieden. Zum Vergleich ist ein Spektrum sehr viel größerer Mengen von Antipyrin, als Nujol-Mull präpariert und untersucht mit üblicher Durchstrahlung unter optimalen Bedingungen, gegenübergestellt. Antipyrin wurde gewählt, um den Vergleich zu anderen Versuchen zu ermöglichen, bei denen diese Substanz zum Studium der Möglichkeiten der Mikropräparationsmethode verwandt wurde <sup>125)</sup>.

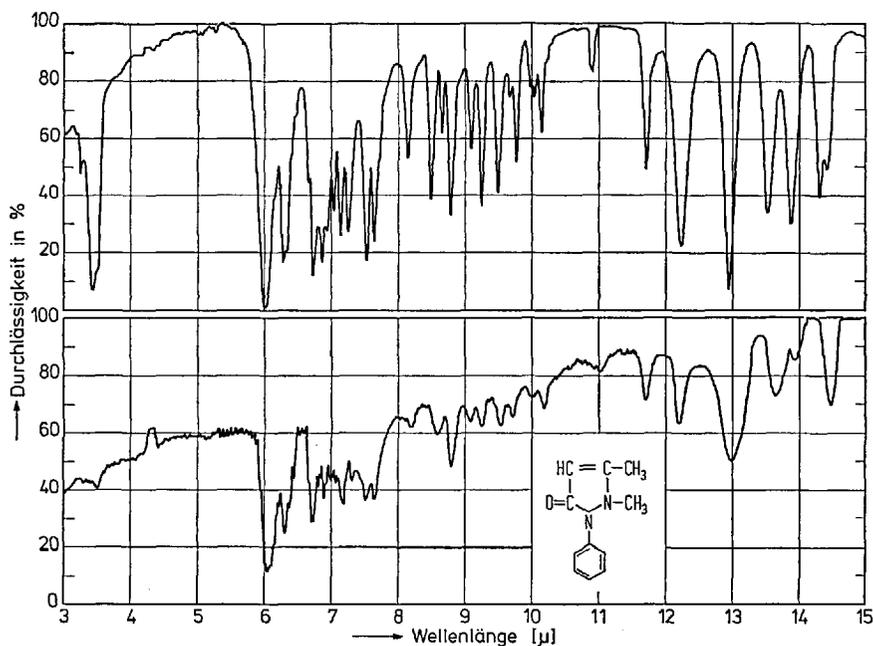


Abb. 1. Spektrum von Antipyrin, erhalten nach dem Mikrospiegelverfahren (unterer Kurvenzug, 10 µg Probe) gegenüber einem Spektrum nach der üblichen Mull-Methodik (Oberer Kurvenzug, einige mg Probe)

Lipide pflegen nach dem Abdunsten von Lösungsmitteln meist in Form kleiner Tröpfchen anzufallen. Diese laufen zusammen, so daß man schlechte Empfindlichkeiten erhält. Derartige Stoffe präpariert man am besten bei Gegenwart von etwa 50 Mikrogramm Nujol (2 mm Spiegel),

das hier als Lösungsmittel dient. Über den Einfluß der verwandten Nujolmenge auf Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit in Abhängigkeit von der Spiegelgröße liegen Untersuchungen vor <sup>169)</sup>.

Einige Festsubstanzen, wie z.B. manche Basen von Nukleinsäuren, fallen recht hartnäckig in gröber kristallisierter Form an. In diesem Fall kann man sich mit einer Mikro-Mull-Technik weiterhelfen (s. dazu Abb. 2) Man gibt zu der abgeschiedenen Substanz, die sich auf dem Spiegel (Teil 1 der Abb. 2) befindet, etwa 50 Mikrogramm Nujol, das in 20  $\mu$ l Petroläther gelöst wird. Der Petroläther wird nach der Aufgabe abgedunstet. Dann drückt man den Spiegel gegen ein kleines Kaliumbromidscheibchen (Nr. 4 in Abb. 2) und dreht ihn, in der Kunststoff-Fassung (Nr. 2 in Abb. 2) geführt, gegen das KBr-Fenster, das mit Hilfe von Pizein oder Uhu-Plus (Nr. 3 in Abb. 2) auf dem Kunststoffhalter fixiert ist. Das Fenster spaltet man sich mit einem Messer aus Resten von Küvettenfenstern oder anderen klaren Kaliumbromid-Kristall-Abfällen.

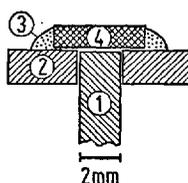


Abb. 2. Skizze eines 2 mm-Mikrospiegels mit Kaliumbromid-Fenster

- 1 Spiegel
- 2 Kunststoff-Führung
- 3 Pizein oder Uhu-Plus-Verklebung
- 4 Fenster aus KBr-Spaltstück

Abb. 3 zeigt das Ergebnis einer solchen Präparation, nämlich das Spektrum von 2 Mikrogramm Phenacetin, präpariert auf einem 1 mm Spiegel. Dieses Verfahren gestattet es, auch Substanzen zu untersuchen, die nach der Lösungsmitteltechnik nicht präparierbar sind oder wegen Auswahl eines ungeeigneten Lösungsmittels <sup>174)</sup> ungünstige Ergebnisse geben. Die Abdeckung mit Kaliumbromid hat weiterhin den Nutzen, die präparierte Substanz gegen Einflüsse der Luft zu schützen und Verflüchtigungen zu vermeiden.

Wünscht man das Probematerial zurückzugewinnen, so empfiehlt sich die Benutzung eines Diamantfensters von etwa 0,2 mm Stärke an Stelle des Kaliumbromidfensters. Der Diamant ist auf einen metallischen Halter aufgelötet. Diamant ist gelegentlich als Fenstermaterial vorge-

schlagen worden <sup>144, 170</sup>, besonders nachdem die infrarotoptischen Eigenschaften der verschiedenen Diamanttypen — zum größten Teil übrigens mit Hilfe mikrospektrophotometrischer Untersuchungen — bekannt geworden waren <sup>171-173</sup>.

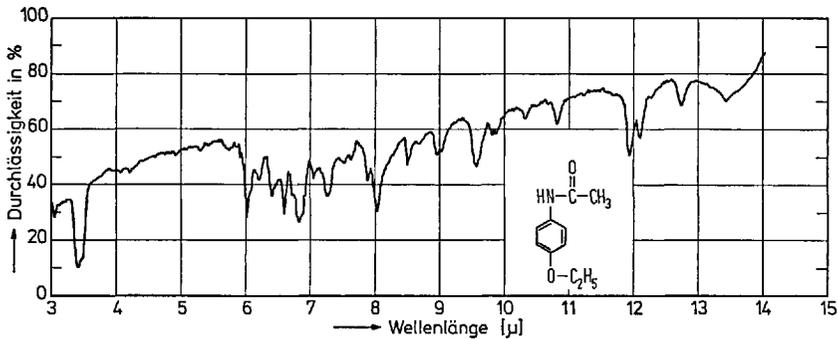


Abb. 3. Spektrum von 2 Mikrogramm Phenacetin, erhalten nach Mikro-Mull-Methode auf einem Spiegel mit 1 mm Durchmesser

Im Vergleich zu Spektren, die mit Hilfe der Preßlingsmethode unter Verwendung größerer Mengen erhalten werden, weisen Spektren nach der Mikrospiegelmethode einige — zum Teil unerhebliche — Unterschiede auf.

1. Wasserbanden und die CO<sub>2</sub>-Bande treten wegen der Asymmetrie des starken Strahlengangs stärker hervor.

2. Die Grundlinie ist wegen der Notwendigkeit, mit geringerer Dämpfung zu schreiben, unruhiger, und sie zeigt aus gerätebedingten Gründen und wegen der Abhängigkeit des Reflexionsvermögens des V<sub>4</sub>A von der Wellenlänge mit zunehmender Wellenlänge einen ansteigenden Verlauf.

3. Wegen der Beugungseffekte an den Kristallkanten des Untersuchungsgutes werden die Banden verbreitert und in ihrer Intensität verringert. Deswegen kann es auch zu Überstrahlungen kommen, so daß Nebenbanden — wie etwa bei 8,7 μ und bei 14,4 μ in Abb. 1 — nicht mehr aufgelöst werden. Diese Effekte treten aber bei Anwendung der Mikro-Mull-Technik nicht so stark auf.

4. In einigen Fällen stimmen Spektren von Materialien, die in Preßlingen untersucht wurden, nicht mit denen überein, die aus Mull- oder Film-Präparationen stammen. Die Ursachen sind z. B. Assoziationser-

scheinungen, speziell an OH-Gruppen von Alkoholen oder Säuren, ferner die Polymorphie mancher Verbindungen, die je nach Präparationsart zu unterschiedlichen Spektren führt. Diese Nichtübereinstimmungen finden sich aber auch bei der Präparation großer Mengen. Sie sind daher keine spezifischen Nachteile des Mikrospiegelverfahrens.

Den Nachteilen dieses Verfahrens stehen jedoch ganz erhebliche Vorteile gegenüber. Auch bei anderen Substanzen, wie Aminosäuren und Alkaloiden <sup>165)</sup>, sowie bei Steroiden <sup>169)</sup> wurde immer qualitative Übereinstimmung zwischen Mikrospektren und einwandfreien Makrovergleichsspektren bezüglich Bandenlage und relativer Bandenintensität nachgewiesen. Wenn auch die demonstrierbaren Spektren beim Vorliegen von 5 Mikrogramm Substanz nicht so „schön“ sind, wie sie ein Spektroskopiker vielleicht aus seinem Umgang mit größeren Mengen gewohnt ist, so sind sie doch in jedem Fall geeignet, funktionelle Gruppen erkennen zu lassen oder das Auffinden der unbekanntesten Substanz nach dem Sadtler-Code zu ermöglichen. Letztlich sind das ja die Wünsche des Analytikers, der mit Mikrogramm-Mengen schon ziemlich an der Grenze der Infrarotmethodik arbeitet.

Ein weiterer Vorteil der Mikrospiegelmethodik ist die Einfachheit. Eine quantitative Überführung von Lösungen des Untersuchungsguts gelingt sehr einfach. Man zieht dessen Lösung in einer Injektionsspritze (etwa die in der Gaschromatographie bewährten „Hamilton“-Spritzen) auf und gibt sukzessiv kleine Lösungsanteile (etwa 2 bis 5  $\mu\text{l}$  beim 2 mm Spiegel) auf und dunstet das Lösungsmittel ab.

Nach dem Abdunsten, was bei 50  $\mu\text{l}$  Wasser etwa 10 Minuten dauert und bei Vorliegen organischer Lösungsmittel wesentlich schneller vonstatten geht, kann sofort spektroskopiert werden. Nach der Infrarotuntersuchung steht das Material für weitere andere Versuche unverändert zur Verfügung.

Letztlich sei als Vorteil noch erwähnt, daß sich die Probe auf einem Metallspiegel befindet, der in einem Metallblock als Halter steckt. Wärme kann somit von der Probe leicht abgeführt werden und die eventuellen Schwierigkeiten somit verringert werden, die man bei der Untersuchung sehr empfindlicher Substanzen in der vollen Intensität des Primärlichts befürchten muß.

Mit Hilfe der Spiegelreflexionsmethodik sind halbquantitative Bestimmungen von Mikrogramm-Mengen mit Standardabweichungen von 10 bis 20% möglich. Diese Abschätzungen fallen als „Nebenprodukt“ der qualitativen Identifizierung mit an, wenn man Vergleichssubstanz bereit hat, die man analog präparieren kann. Die Eichkurven sind allerdings gekrümmt und gestatten die Bestimmung nur in engeren Bereichen, also etwa von 5 bis 40  $\mu\text{g}$  bei Benutzung der 2 mm-Spiegel. Weist man infrarotspektroskopisch die Abwesenheit anderer Stoffe bei der auf dem

Reflektor präparierten Substanz nach, so kann man für eine genauere Bestimmung auch unspezifische Verfahren heranziehen, wie etwa Mikrowägungen des Spiegels mit dem Material oder die Ultramikroelementaranalyse.

### 3.7. Kombinationen mit Trennverfahren

Kombinationen der Infrarotanalyse mit Dünnschicht- oder Papierchromatographie wurden in letzter Zeit öfter vorgeschlagen, wobei immer die getrennten Substanzen vom Trägermaterial eluiert wurden <sup>123, 139, 169, 175–181</sup>. Quantitative Bestimmungen dünn-schichtchromatographisch getrennter Alkaloide <sup>139</sup> oder Antikonzipientien <sup>169</sup> wurden durch Mikroinfrarotspektrographie durchgeführt.

Bei der Kombination mit der Gaschromatographie sind zwei Arbeitsmöglichkeiten gegeben, die beide angewandt werden. Einmal kann man die eluierte Fraktion in Gasküvetten auffangen und sie hierin in gasförmigen Zustand untersuchen. Andererseits kann man versuchen, die gaschromatographisch getrennten Stoffe zu kondensieren und sie so untersuchen.

Bei der Untersuchung im Gaszustand werden heizbare Gasküvetten <sup>129, 182–187</sup> benötigt, um auch höher siedende Anteile gasförmig zu halten. Zur Erzielung hoher Empfindlichkeiten wird der IR-Strahl durch Spiegel oder durch die spiegelnd polierte Wand der Gaszelle so umgelenkt, daß er vielfach durch die Probenschicht geschickt wird <sup>182, 184–187</sup>. Die zur Füllung nötigen Gasvolumina betragen  $130 \text{ cm}^3$  <sup>183</sup>, etwa  $20 \text{ cm}^3$  <sup>182, 184, 185</sup> oder im geringsten Fall etwa  $0,045 \text{ cm}^3$  <sup>186</sup>. Die analysierten Gewichtsmengen liegen zwischen  $0,3 \text{ mg}$  <sup>184, 187, 188</sup> und einigen Mikrogrammen <sup>186</sup>. Wird der Strahl nur einmal durch die Gasprobe geschickt, dann sinken die Empfindlichkeiten und es sind Mengen von einigen Zehntel Milligrammen zur Analyse erforderlich <sup>8, 188–191</sup>.

Die Benutzung von Gasküvetten erlaubt somit offensichtlich nicht, die nach gaschromatographischen Trennungen anfallenden Mengen von wenigen Nanogrammen oder Zehntel Mikrogrammen zu identifizieren, selbst wenn man die die Empfindlichkeit steigernde Methode des wiederholten Aufnehmens des Spektrums und einer Computer-Datenverarbeitung anwendet, denn auch mit diesem Verfahren wurden — an allerdings nicht reflektierenden Zellen von  $5 \text{ cm}$  Länge und  $4 \text{ mm}$  Durchmesser — Nachweisgrenzen von nur etwa  $5 \text{ Mikrogramm}$  gefunden.

Das Verfahren, die getrennte Fraktion in der Küvette aufzufangen und im stationären Zustand die Messung durchzuführen, hat noch einen anderen Nachteil. Für Stoffe mit größeren Elutionsvolumina beobachtet man am Ende gaschromatographischer Trennungen Verbreiterungen der

Elutionsbanden. Die die Säule verlassende Substanz ist in diesem Fall in größeren Mengen von Trägergas vorhanden, so daß u. U. die Konzentration zum Nachweis nicht mehr ausreicht.

Diese Schwierigkeit tritt auch bei der Messung im Durchflußverfahren auf. Hier ergibt sich aber noch die weitere Komplikation, daß sich die Menge der Fraktion, in dem Moment wo sie durch die Zelle strömt, ständig mit der Elutionszeit ändert. Man muß also sehr schnell registrierende Spektrophotometer benutzen<sup>129, 184, 185, 190</sup> und eventuell elektronisch über die Zeit mitteln<sup>129</sup>.

Der Vorteil der Messung in der Gasphase besteht darin, daß eine einfache und schnelle Überführung des Meßgutes in die Infrarotküvette möglich ist<sup>192</sup>. Für leichtflüchtige Stoffe wird die Messung in der Gasphase die Methode der Wahl sein.

Wegen der Schwierigkeiten der Messung in der Gasphase wird meistens der zweite Weg beschritten, nämlich die eluierten Fraktionen durch Kondensation zu sammeln. Hierzu ist grundsätzlich zu sagen, daß man nie quantitative Ausbeuten hierbei erhält.

Bei dieser Untersuchungstechnik wird der Trägergasstrom direkt in eine Ultramikroflüssigkeitszelle, die in einem Kältebad steht, eingeleitet<sup>193, 194</sup> oder man kondensiert in Glasrohren, in Spitzen von Injektionsnadeln, in dünnen Kunststoffschläuchen oder U-förmigen Röhren unter Tiefkühlung<sup>195-203</sup>. Zum Teil werden in das Kondensationsgefäß noch zusätzliche Sorptionsmittel, wie Molekularsiebe<sup>194</sup>, Chromosorb W<sup>204</sup> oder andere Füllstoffe gegeben<sup>205, 206</sup>. Bei einigen der Apparaturen ist die Konstruktion bewußt darauf angelegt, die gesammelte Fraktion einfach in die Meßküvette überführen zu können<sup>195, 199, 201, 202</sup>. Ferner wird versucht, die Substanz direkt auf Kaliumbromid in Pulverform<sup>207, 208</sup> oder in Form eines Scheibchens<sup>200, 209</sup> aufzukondensieren. Kondensation auf ein Membranfilterscheibchen wurde ebenfalls vorgeschlagen<sup>210</sup>. Ein weiteres Gerät sammelt die den Gaschromatograph verlassende Fraktion auf einer gekühlten Platte und untersucht dann hier mit Hilfe der ATR-Technik<sup>160</sup> wobei mit Mengen von einigen Zehntel Milligrammen gearbeitet werden muß. Ähnlich große Substanzmengen werden auch bei den anderen Verfahren benötigt<sup>193, 194, 197, 203-206, 209, 210</sup>. Andererseits werden Anordnungen beschrieben<sup>196, 198, 199, 202, 208</sup>, bei denen Mikrogramm-Mengen mit Ausbeuten von 90%<sup>198, 202</sup> und 50 bis 70%<sup>208</sup> gesammelt werden sollen.

Allerdings wird von anderen Autoren schon beim Umgang mit wesentlich größeren Mengen<sup>193, 197, 206, 210</sup> eine Ausbeute von nur 60% beim Sammeln erreicht. Sogar beim präparativ-gaschromatographischen Arbeiten<sup>211, 212</sup> werden beim Vorliegen von Mengen von Zehntel Gramm nur Ausbeuten der Kondensation in Höhe von 90% gefunden, da beim schnellen Abkühlen des Trägergasstroms die getrennte Sub-

stanz — besonders beim Vorliegen als Spurenbestandteil-Nebel und Aerosole bildet, die teilweise so schlecht aufgefangen werden können, daß man das Zentrifugieren <sup>213)</sup> oder das Anlegen eines elektrischen Feldes <sup>214)</sup> zum Niederschlagen empfiehlt.

Scheinbar werden aber Aerosole beim Einleiten des Trägergasstroms in eine eventuell gekühlte Flüssigkeitsvorlage besser aufgefangen <sup>215–217)</sup>, denn es wird sogar über das Sammeln von Nanogramm-Mengen berichtet <sup>218)</sup>. Hohe Ausbeuten werden weiterhin dann gefunden, wenn nicht nur der Spurenbestandteil, sondern auch das gesamte Trägergas in der Vorlage mit auskondensiert wird <sup>219, 220)</sup>. Die in großer Menge entstehenden Tropfen des Trägergasmaterials reißen die Aerosolpartikelchen des Spurenbestandteils mit.

Auf diesem Prinzip beruht ein schon lange bekanntes Sammlungsverfahren <sup>221)</sup>, bei dem das Trägergas nach Verlassen des Gaschromatographs mit Wasserdampf gemischt und dann durch einen Kühler geleitet wird. Wassertröpfchen fallen aus und wirken als Kollektor. 80 Mikrogramm Material können mit 95% Ausbeute gesammelt werden.

Dieses Verfahren wurde auf seine Verwendbarkeit in der Mikrogramm- und Submikrogramm-Analyse geprüft <sup>222)</sup>, da offensichtlich nur die Methoden unter Verwendung von Hilfssammlern <sup>218–221)</sup> eine erfolgversprechende Lösung des Problems der Kopplung von Gaschromatographie und Ultramikroinfrarotanalyse erwarten lassen. Unter Verwendung radioaktiv markierter Substanzen konnte gezeigt werden <sup>222)</sup>, daß selbst Mengen von 20 ng noch mit Ausbeuten von 92% aus dem Trägergasstrom gesammelt werden. Als Kollektor kann fast jedes Lösungsmittel dienen. Man ist also nicht auf Wasser beschränkt, das eventuell auch zu Hydrolysereaktionen mit dem Spurenbestandteil Anlaß geben könnte.

Für die Kombination mit der IR-Analyse erweist sich die leichte Aufarbeitbarkeit der anfallenden Lösungen mit Hilfe des Mikrospiegelverfahrens als großer Vorteil. Grundsätzlich tritt hierbei das Problem auf, daß man für die Gaschromatographie leichtflüchtige Stoffe verwenden muß. Beim Eindampfen und der nachfolgenden IR-Analyse darf die Substanz jedoch nicht flüchtig sein. Durch chemische Reaktionen gelingt es jedoch meist, diese Schwierigkeit zu umgehen. So können z. B. Amine und Säuren nach gaschromatographischer Trennung durch Behandlung mit Salzsäure oder Ammoniak in nichtflüchtige Salze überführt werden.

Das Mikrospiegelverfahren kann somit — in Ergänzung zu anderen Mikroverfahren der Infrarotanalyse — zur Untersuchung gaschromatographisch getrennter Fraktionen im Bereich von einzelnen Mikrogrammen dienen. Derartige Bestimmungen werden in immer stärkeren Maße notwendig werden, je mehr es gelingt, nichtflüchtige Stoffe durch Derivat-

bildung in flüchtige, gaschromatographisch trennbare umzuwandeln. Es konnte inzwischen an Steroiden <sup>223, 224</sup>, ferner an Aminosäuren <sup>225</sup> und Guanidinen <sup>226</sup>) nachgewiesen werden, daß derartige Synthesen auch mit Submikrogramm-Mengen durchführbar sind.

In der vorliegenden Übersicht wurden wiederholt Firmennamen genannt. Die Auswahl sollte jedoch nur Beispiele anführen, die keinerlei Wertung zum Positiven oder Negativen darstellen.

#### 4. Literatur

- 1) *Sorby, H. C.*: Quart. J. Sci. 2, 198 (1865).
- 2) *Engström, A.*: X-Ray Microanalysis in Biology and Medicine. Amsterdam: Elsevier 1962.
- 3) — In: X-Ray Optics and X-Ray Microanalysis, p. 23; *H. H. Pattee, V. E. Cosslett, and A. Engström*, editors. New York: Academic Press 1963.
- 4) *Lindström, B.*: In: X-Ray Optics and Microanalysis, p. 13; *H. H. Pattee, V. E. Cosslett, and A. Engström*, editors. New York: Academic Press 1963.
- 5) *Walker, P. M. B., and B. M. Richards*: In: The Cell, Vol. I, p. 91; *J. Brachet and A. E. Mirsky*, editors. New York: Academic Press 1959.
- 6) *Caspersson, T., and G. Lomakka*: In: Instrumentation in Biochemistry; *T. M. Goodwin*, editor. New York: Academic Press 1967.
- 7) *Blout, E. R.*: In: Physical Methods of Organic Chemistry, Vol. I, part 2, p. 1475; *A. Weissberger*, editor. New York: Interscience 1959.
- 8) *Derkosch, J.*: Absorptionsspektralanalyse im UV, sichtbaren und IR-Gebiet. Frankfurt a.M.: Akadem. Verlagsgesellsch. 1967.
- 9) *Glick, D.*: Techniques of Histo- and Cytochemistry. New York: Interscience 1949.
- 10) *Kirk, P. L.*: Ultramicroanalysis. New York: Wiley & Sons 1950.
- 11) *Korenman, I. M.*: Quantitative Ultramicroanalysis. New York: Academic Press 1965.
- 12) *Leuchtenberger, C., u. R. Leuchtenberger*: Schweiz. Med. Wochschr. 87, 1549 (1957).
- 13) *Caspersson, T.*: Skand. Arch. Physiol. 73, Suppl. 8,1 (1936).
- 14) *Mattenheimer, H.*: Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium. Berlin: W. de Gruyter 1961.
- 15) *Sanz, M.*: Chimia (Aarau) 13, 192 (1959).
- 16) *Keohane, K. W., and W. K. Metcalf*: Phys. Med. Biol. 4, 43 (1959).
- 17) *Weber, K.*: Leitz-Mitt. Wiss. Techn. 3, 103 (1965).
- 18) *West, W.*: In: Physical Methods of Organic Chemistry, Vol. I, part 3, p. 1898; *A. Weissberger*, editor. New York: Interscience 1960.
- 19) *Zieler, H. W.*: Microscope 13, 363 (1963).
- 20) *Anderson, D. H., N. B. Woodall, and W. West*: In: Physical Methods of Organic Chemistry, vol. I, part 3, p. 1959; *A. Weissberger*, editor. New York: Interscience 1960.
- 21) *Mason, W. B.*: Paper at the Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, March 1958.
- 22) *Cosslett, V. E., and W. C. Nixon*: X-Ray Microscopy, Cambridge. London-New York: University Press 1960.
- 23) *Henke, B. L.*: Advan. X-Ray Anal. 4, 244 (1961).

- 24) *Brattgard, S. O., and H. Hydén: Acta Radiol., Suppl. 94, 7 (1952).*
- 25) *Henke, B. L.: In: X-Ray Microscopy and Microradiography, p. 72; V. E. Cosslett, A. Engström, and H. H. Pattee, editors. New York: Academic Press 1957.*
- 26) *Fitzgerald, P. J.: In: X-Ray Microscopy and Microradiography, p. 49; V. E. Cosslett, A. Engström, and H. H. Pattee, editors. New York: Academic Press 1957.*
- 27) *Hydén, H., and S. Larsen: In: X-Ray Microscopy and X-Ray Microanalysis, p. 51; A. Engström, V. E. Cosslett, and H. H. Pattee, editors. Amsterdam: Elsevier 1960.*
- 28) *Hallén, O., and H. Hydén: In: X-Ray Microscopy and Microradiography, p. 249; V. E. Cosslett, A. Engström, and H. H. Pattee, editors. New York: Academic Press 1957.*
- 29) *Rosengren, B.: X-Ray Optics and X-Ray Microanalysis, p. 99; H. H. Pattee, V. E. Cosslett, and A. Engström, editors. New York: Academic Press 1963.*
- 30) *Davies, H. G., A. Engström, and B. Lindström: Nature 172, 1041 (1953).*
- 31) — — *Exptl. Cell Res. 11, 169 (1954).*
- 32) *Lindström, B., and G. Swanbeck: In: X-Ray Optics and Microanalysis, p. 95; H. H. Pattee, V. E. Cosslett, and A. Engström, editors. New York: Academic Press 1963.*
- 33) — *Acta Radiol., Suppl. 125 (1955).*
- 34) *Engström, A., and B. Lindström: Biochim. Biophys. Acta 4, 351 (1950).*
- 35) *Hiraoka, T., and D. Glich: In: X-Ray Optics and X-Ray Microanalysis, p. 107; New York: Academic Press 1963.*
- 36) *Liebhafsky, H. A., H. G. Pfeiffer, E. H. Winslow, and P. D. Zeman: X-Ray Absorption and Emission. In: Analytical Chemistry. New York: Wiley & Son 1960.*
- 37) *Loofbourow, J. R.: J. Opt. Soc. Am. 40, 317 (1950).*
- 38) *Walker, P. M. B., and E. M. Deeley: Photoelec. Spectrometry Group Bull. 8, 192 (1955); C. A. 51, 862f.*
- 39) *Naora, H.: Exptl. Cell Res. 8, 259 (1955).*
- 40) — *Proc. Intern. Genet. Symp., Tokyo 1956, 147; C. A. 53, 9413e.*
- 41) *Thornburg, W.: Rev. Sci. Instr. 27, 99 (1956).*
- 42) *Haggis, G. H.: J. Sci. Instr. 33, 491 (1956).*
- 43) *Tarrant, A. W. S., and S. F. Niven: J. Pathol. Microbiol. 73, 572 (1957).*
- 44) *Khan-Magometova, I. D.: Biofizika 3, 558 (1958).*
- 45) *Strother, G. K., and J. J. Wolken: Science 130, 1084 (1959).*
- 46) *Catino, A., A. Ceruti e J. Colombino: Attual. Lab. 5, 73 (1959); (A. A. 60, 830).*
- 47) *Brown, P. K.: J. Opt. Soc. Am. 51, 1000 (1961).*
- 48) *Duecher, H. C., and E. R. Lippincott: Rev. Sci. Instr. 35, 1108 (1964).*
- 49) *Einarson, L., A. E. Hansen u. H. G. Krüglér: Leitz-Mitt. Wiss. Techn. 3, 129 (1965).*
- 50) *Weber, K.: Leitz-Mitt. Wiss. Techn. 3, 103 (1965).*
- 51) *Muehlig, P.: Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med. 4, 55 (1966).*
- 52) *Alpen, E. L.: J. Sci. Instr. 43, 443 (1966).*
- 53) *Engle, J. L., and J. J. Freed: Rev. Sci. Instr. 39, 307 (1968).*
- 54) *Pearse, A. G. E.: Histochemistry. London: Churchill 1961.*
- 55) *Thorell, B., and B. Chance: Nature 184, 934 (1959).*
- 56) *Berry, R. P., B. Thorell, L. Akerman, and B. Chance: Nature 184, 929 (1959).*
- 57) *Hiraoka, T.: Biophys. J. Biochem. Cytol. 3, 525 (1957).*
- 58) *Glich, D., and S. N. Nagyar: J. Histochem. Cytochem. 4, 389 (1956).*
- 59) *Somogyi, J. Ch.: Nature 138, 763 (1936).*
- 60) *Lowry, O. H., and O. A. Bessey: J. Biol. Chem. 163, 633 (1946).*

- 61) Kirk, P. L., R. S. Rosenfels, and D. J. Hanahan: *Anal. Chem.* **19**, 355 (1947).
- 62) Ellis, G. H., and S. Brandt: *Anal. Chem.* **21**, 1546 (1949).
- 63) Cunningham, B. B.: *Nucleonics* **5**, 62 (1949).
- 64) Malmström, B. G., and D. Glick: *Anal. Chem.* **23**, 1699 (1951).
- 65) Schaffer, F. L., J. Fong, and P. L. Kirk: *Anal. Chem.* **25**, 343 (1953).
- 66) Craig, R., A. Bartel, and P. L. Kirk: *Rev. Sci. Instr.* **24**, 49 (1953).
- 67) Pohl, F. A., and H. Demmel: *Anal. Chim. Acta* **10**, 554 (1954).
- 68) Gorbach, G.: *Mikrochim. Acta* **1955**, 879.
- 69) Glick, D., and B. W. Grunbaum: *Anal. Chem.* **29**, 1243 (1957).
- 70) Ullrich, K. J., u. A. Hampel: *Arch. Ges. Physiol.* **268**, 177 (1958).
- 71) Wallach, D. F. H., and D. M. Surgenor: *Anal. Chem.* **30**, 1879 (1958).
- 72) Koch, O. G.: *Mikrochim. Acta* **1957**, 30.
- 73) Beyermann, K.: *Z. Anal. Chem.* **191**, 346 (1962).
- 74) van Haga, P. R.: *Clin. Chim. Acta* **9**, 97 (1964).
- 75) Glick, D., and L. J. Greenberg: *Anal. Chem.* **32**, 736 (1960).
- 76) Greenberg, L. J., and J. A. Rodder: *Anal. Biochem.* **8**, 137 (1964).
- 77) Hansen, G.: *Mikrochim. Acta* **1956**, 406.
- 78) Shapira, R., and A. M. Wilson: *Anal. Chem.* **38**, 1803 (1966).
- 79) Lang, W.: *Mikrochemie* **1967**, 52.
- 80) Kirkland, J. J.: *Anal. Chem.* **40**, 391 (1968).
- 81) Hecht, F.: *Anorg. Mikrogewichtsanalyse*, p. 119. Wien: Springer 1940.
- 82) Beyermann, K.: *Z. Anal. Chem.* **190**, 4 (1962).
- 83) —, K. Crelius: *Clin. Chim. Acta* **6**, 113 (1961).
- 84) Hellmann, B., H. R. Ulfendahl, and B. G. Wallin: *Anal. Biochem.* **18**, 434 (1967).
- 85) Ornstein, L., and G. M. Leher: *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 322 (1960).
- 86) Benedetti-Pichler, A. A., and J. H. Rachele: *Anal. Chem.* **12**, 233 (1940).
- 87) Ackermann, G., and C. Alferi: *Mikrochim. Acta* **1961**, 390.
- 88) Henry, R. J.: *Clinical Chemistry*, p. 214. New York: Harper & Row 1964.
- 89) Hashimoto, Y., and I. Mori: *Nature* **170**, 1024 (1952).
- 90) Lugg, J. W. H.: *J. Chromatog.* **10**, 272 (1963).
- 91) Goldman, J., and R. R. Goodall: *J. Chromatog.* **32**, 24 (1968).
- 92) Lugg, J. W. H., and E. McEvoy-Bowe: *Anal. Chem.* **33**, 535 (1961).
- 93) McEvoy-Bowe, E., and J. W. H. Lugg: *Biochem. J.* **80**, 616 (1961).
- 94) Parke, T. V., and W. W. Davis: *Anal. Chem.* **24**, 2019 (1952).
- 95) Campbell, H., and J. A. Simpson: *Chem. Ind. (London)* **1953**, 342.
- 96) Heyndryckx, P.: *Chim. Anal. (Paris)* **43**, 127 (1961).
- 97) Edström, J. E.: *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 361 (1953).
- 98) —, and H. Hydén: *Nature* **174**, 128 (1954).
- 99) Hydén, H., K. Bjurström, and B. McEven: *Anal. Biochem.* **17**, 1 (1966).
- 100) Ling, C.: *Anal. Chem.* **39**, 798 (1967).
- 101) Lewis, L. L.: *Anal. Chem.* **40**, 30A, Oct. 1968.
- 102) Herrmann, R.: *Z. Anal. Chem.* **212**, 1 (1965).
- 103) Burch, C. R.: *Proc. Phys. Soc. (London)* **59**, 41 (1947).
- 104) Wood, D. L.: *Rev. Sci. Instr.* **21**, 764 (1950).
- 105) Barer, R., H. A. R. Cole, and H. W. Thompson: *Nature* **163**, 198 (1949).
- 106) Gore, R. C.: *Science* **110**, 710 (1949).
- 107) Blout, E. R., G. R. Bird, and D. S. Grey: *J. Opt. Soc. Am.* **40**, 304 (1950).
- 108) — — — *J. Opt. Soc. Am.* **41**, 547 (1951).
- 109) — — — *J. Opt. Soc. Am.* **42**, 966 (1952).
- 110) Coates, V. J., A. Offner, and E. H. Siegler: *J. Opt. Soc. Am.* **43**, 984 (1953).
- 111) Cole, A. R. H., and R. N. Jones: *J. Opt. Soc. Am.* **42**, 348 (1952).

K. Beyermann

- 112) *Anderson, D. H., and O. E. Miller*: J. Opt. Soc. Am. *43*, 777 (1953).
- 113) *White, J. U., S. Weiner, N. C. Alpert, and W. M. Ward*: Anal. Chem. *30*, 1694 (1958).
- 114) *Möhl, F.*: Acta Chem. Scand. *12*, 1356 (1958).
- 115) *Blout, E. R., and M. J. Abbate*: J. Opt. Soc. Am. *45*, 1028 (1955).
- 116) *Sparagana, M. S., and W. B. Mason*: Anal. Chem. *34*, 242 (1962).
- 117) *Ford, M. A., W. C. Price, W. E. Seeds, and G. R. Wolkinson*: J. Opt. Soc. Am. *48*, 249 (1959).
- 118) *Badger, R. M.*: Rev. Sci. Instr. *22*, 935 (1951).
- 119) *Elliott, A., E. J. Ambrose, and R. B. Temple*: J. Sci. Instr. *27*, 21 (1950).
- 120) *Collins, A. T.*: J. Sci. Instr. *44*, 65 (1967).
- 121) *Winefordner, J. D., J. J. Cetorelli, and W. J. McCarthy*: Talanta *15*, 207 (1968).
- 122) *Volkmann, H.*: Leitz-Mitt. Wiss. Techn. *2*, 37 (1962).
- 123) *Murray, M., and G. F. Smith*: Anal. Chem. *40*, 440 (1968).
- 124) *Chen, J. T.*: J. Ass. Off. Agr. Chem. *48*, 380 (1965).
- 125) *Wolff, J. H.*: Tip UR 10, Fa. Perkin-Elmer, Bodenseewerk Überlingen.
- 126) *Allen, L. C., and L. F. Johnson*: J. Am. Chem. Soc. *85*, 2668 (1963).
- 127) *Bluhm, A. L., J. A. Sousa, and J. Weinstein*: Appl. Spectry. *18*, 188 (1964).
- 128) *Cuthrell, R. E., and C. F. Schroeder*: Rev. Sci. Instr. *36*, 1249 (1965).
- 129) *Low, M. J. D., and S. K. Freeman*: Anal. Chem. *39*, 194 (1967).
- 130) *Pickering, R. A.*: Anal. Chem. *28*, 280 (1956).
- 131) *Kirkland, J. J.*: Anal. Chem. *29*, 1127 (1957).
- 132) *Bisset, F., A. L. Bluhm, and L. Long jun.*: Anal. Chem. *31*, 1927 (1959).
- 133) *Dinsmore, H. L., and P. R. Edmondson*: Spectrochim. Acta *15*, 1032 (1959).
- 134) *Sterling, K. J.*: Anal. Chem. *38*, 1804 (1966).
- 135) *Fabri, G.*: Ann. Chim. (Paris) *47*, 394 (1957).
- 136) *Patt, P., u. P. Kuhn*: Tip UR 9 der Fa. Perkin-Elmer, Bodenseewerk Überlingen.
- 137) *Clark, D. A., and A. P. Boer*: Spectrochim. Acta *12*, 276 (1958).
- 138) *Resnik, F. E., M. E. Bill, F. L. Greene, L. S. Harrow, and J. C. Holmes*: Anal. Chem. *29*, 1874 (1957).
- 139) *Corneleau, H.*: Thesis. Université de Nantes (1968).
- 140) *Schiedt, U., u. H. Reinwein*: Naturforsch. *7b*, 270 (1952).
- 141) *Neumann, K., u. G. Matz*: Chem.-Ing.-Tech. *27*, 5 (1955).
- 142) *Pytlewski, L. L., and V. Marchesani*: Anal. Chem. *37*, 618 (1965).
- 143) *Röpke, H., u. W. Neudert*: Z. Anal. Chem. *170*, 78 (1959).
- 144) *Lippincott, E. R., F. E. Welsh, and C. E. Weir*: Anal. Chem. *33*, 138 (1961).
- 145) *Lohr, L. J., and R. J. Kaiser*: Anal. Chem. *32*, 301 (1960).
- 146) *Anderson, D. H., and N. B. Woodall*: Anal. Chem. *25*, 1906 (1953).
- 147) *Nicholls, S. F.*: Analyst *86*, 664 (1961).
- 148) *Blout, E. R., M. Parrish, G. R. Bird, and J. M. Abbate*: J. Opt. Soc. Am. *42*, 966 (1952).
- 149) *Price, G. D., E. C. Sunas, and E. C. Williams*: Anal. Chem. *39*, 138 (1967).
- 150) *Black, E. D.*: Anal. Chem. *32*, 735 (1960).
- 151) *Jones, R. N., and A. Nadeau*: Spectrochim. Acta *12*, 183 (1958).
- 152) *Hunter, G. L. K.*: Appl. Spectry. *18*, 159 (1964).
- 153) *Black, E. D., J. D. Margerum, and G. M. Wyman*: Anal. Chem. *29*, 169 (1957).
- 154) *Davison, W. H. T.*: J. Opt. Soc. Am. *45*, 227 (1955).
- 155) *Zenchelsky, S. T., J. S. Showell, and R. G. Wright*: Anal. Chem. *29*, 167 (1957).
- 156) *Volkmann, H.*: Leitz-Mitt. Techn. Wiss. *4*, 28 (1967).
- 157) *Hansen, W. N., and J. A. Horton*: Anal. Chem. *36*, 783 (1964).
- 158) — Spectrochim. Acta *21*, 815 (1965).

- 159) *Baxter, B. H., and N. A. Puttnam*: *Nature* 207, 288 (1965).
- 160) *Wilks Scientific Co.*, Bull. 7F.
- 161) *Hannah, R. W., and J. L. Dwyer*: *Anal. Chem.* 36, 2341 (1964).
- 162) *Hornung, W. K.*: *Teknillisen Aikakikausilehti* 27, 438 (1964); *C. A.* 62, 3388f.
- 163) *Sloane, H. J., T. Johns, W. F. Ulrich, and W. J. Cadman*: *Appl. Spectry.* 19, 130 (1965).
- 164) *Fontanges, R., P. Heritier, et P. Coeur*: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46, 1223 (1964).
- 165) *Beyermann, K.*: *Z. Anal. Chem.* 226, 15 (1967).
- 166) — *Clin. Chim. Acta* 18, 143 (1967).
- 167) *Goulden, J. D. S.*: In: *Laboratory Methods in IR-spectroscopy*, p. 106; *R. G. J. Miller*, editor. London: Heyden & Son 1965.
- 168) — *Spectrochim. Acta* 15, 657 (1959).
- 169) *Beyermann, K., and E. Röder*: *Z. Anal. Chem.* 230, 347 (1967).
- 170) *Tadayon, J.*: In: *Laboratory Methods in IR-spectroscopy*, p. 73; *R. G. J. Miller*, editor. London: Heyden & Son. 1965.
- 171) *Sutherland, G. B. M., E. D. Blackwell, and W. G. Simeral*: *Nature* 174, 901 (1954).
- 172) *Charette, J. J.*: *J. Chem. Phys.* 37, 3014 (1962).
- 173) — *Ind. Diamond Rev.* 26, 144 (1966).
- 174) *Krohmer, P., u. R. Duelli*: *Tip UR 39*, Nov. 1968, Fa. Perkin-Elmer, Bodensee-werk Überlingen.
- 175) *Toribara, T. Y., and di Stefano, V.*: *Anal. Chem.* 26, 1519 (1954).
- 176) *Spencer, R. D., and B. H. Beggs*: *Pittsburgh Conference on Analytical chemistry and appl. chemistry*, 1963.
- 177) *Snavely, M. K., and J. G. Grasselli*: *Develop. Appl. Spectry.* 3, 119 (1963).
- 178) *McCoy, R. N., and E. C. Fiebig*: *Anal. Chem.* 37, 593 (1965).
- 179) *Nash, N., P. Allen, A. Bevenue, and H. Beckman*: *J. Chromatog.* 12, 421 (1963).
- 180) *Fontanges, R.*: *Thesis. Universität Lyon* 1965.
- 181) *Beyermann, K., u. A. Kessler*: *Beiträge zur gerichtl. Medizin, im Druck.*
- 182) *White, J. U., N. L. Alpert, W. M. Ward, and W. S. Gallaway*: *Anal. Chem.* 31, 1267 (1959).
- 183) *Flett, M. St. C., and J. Hughes*: *J. Chromatog.* 11, 434 (1963).
- 184) *Wilks, P. A., and R. A. Brown*: *Anal. Chem.* 36, 1896 (1964).
- 185) *Bariz, A. M., and H. D. Ruhl*: *Anal. Chem.* 36, 1892 (1965).
- 186) *Stine, K. E., D. E. McCarthy, and H. J. Sloane*: *Develop. Appl. Spectry.* 4, 121 (1965).
- 187) *Stewart, J. E., R. O. Brace, T. Johns, and W. F. Ulrich*: *Nature* 186, 628 (1960).
- 188) *Senn jr., W. L., and H. V. Drushel*: *Anal. Chim. Acta* 25, 328 (1961).
- 189) *Chang, S. S., C. E. Ireland, and H. Tai*: *Anal. Chem.* 33, 479 (1961).
- 190) *Schmeltz, J., C. D. Stills, W. J. Chamberlain, and R. L. Stedman*: *Anal. Chem.* 37, 1614 (1965).
- 191) *McNiven, N. L.*: In: *Laboratory Methods in IR-spectroscopy*, p. 91; *R. G. J. Miller*, editor. London: Heyden & Son 1965.
- 192) *Hofmann, M., u. H. Rotzsche*: In: *Handbuch der Gaschromatographie*, S. 433; *E. Leibniz u. H. G. Struppe*, Herausgeber. Weinheim: Verlag Chemie 1967.
- 193) *Daniels, N. W. R., and W. G. Pye*: *Gas Chromatog. Bull.*, Summer 1967, vol. 2, no. 1.
- 194) *Szymanski, H., R. Povinelli, D. Stamires, and G. Lynch*: *Anal. Chem.* 37, 2110 (1959).
- 195) *Grasselli, J. G., and M. K. Snavely*: *Appl. Spectry.* 16, 190 (1962).
- 196) *Blake, B. H., D. S. Erley, and F. C. Beman*: *Appl. Spectry.* 18, 114 (1964).
- 197) *Bellis, H. E., and E. J. Slowinsky*: *J. Chem. Phys.* 25, 794 (1956).

K. Beyermann

- 196) *Brownlee, R. G., and R. M. Silverstein*: *Anal. Chem.* **40**, 2077 (1968).
- 199) *Edwards, R. A., and J. S. Fagerson*: *Anal. Chem.* **37**, 1630 (1965).
- 200) *Nigam, J. C., M. Sahasrabudhe, T. W. McDavis, J. C. Bartlet, and L. Levi*: *Perfumery Essent. Oil Record* **53**, 614 (1962).
- 201) *Molnar, W. S., and V. A. Yarborough*: *Appl. Spectry.* **12**, 143 (1958).
- 202) *Chang, S. S., K. M. Brobst, C. E. Ireland, and H. Tai*: *Appl. Spectry.* **16**, 106 (1962).
- 203) *Gold, H. J.*: *Chemist-Analyst* **49**, 112 (1960).
- 204) *Widmark, K., and G. Widmark*: *Acta Chem. Scand.* **16**, 575 (1962).
- 205) *Haslam, J., A. R. Jeffs, and H. A. Wills*: *Analyst* **86**, 44 (1961).
- 206) *Shearer, D. A., B. C. Stone, and W. A. McGugan*: *Analyst* **88**, 147 (1963).
- 207) *Leggon, H. W.*: *Anal. Chem.* **33**, 1295 (1961).
- 208) *Giuffrida, L.*: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* **48**, 355 (1965).
- 209) *Kubeczka, K. H.*: *Naturwissenschaften* **52**, 429 (1965).
- 210) *Thomas, P. J., and J. L. Dwyer*: *J. Chromatog.* **13**, 366 (1964).
- 211) *Verzele, M.*: *J. Chromatog.* **13**, 377 (1964).
- 212) *Schlenk, H., and D. M. Sand*: *Anal. Chem.* **34**, 1676 (1962).
- 213) *Wehrli, A., and E. Kovats*: *J. Chromatog.* **3**, 313 (1960).
- 214) *Thompson, A. E.*: *J. Chromatog.* **6**, 454 (1961).
- 215) *Dupire, F.*: *Anal. Chem.* **170**, 317 (1959).
- 216) *Kyryacos, G., H. R. Menapace, C. E. Board*: *Anal. Chem.* **31**, 222 (1959).
- 217) *Haahiti, E. H., and H. M. Fales*: *Chem. Ind. (London)* **1961**, 507.
- 218) *Bowman, M. C., and M. Beroza*: *Anal. Chem.* **40**, 535 (1968).
- 219) *Fales, H. M., E. O. E. Haahiti, T. Lukkainen, W. J. A. Vandenhuevel, and E. C. Horning*: *Anal. Biochem.* **4**, 296 (1962).
- 220) *Witte, K., u. O. Dissinger*: *Z. Anal. Chem.* **236**, 119 (1968).
- 221) *Jones, J. H., and C. D. Ritchie*: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* **41**, 753 (1958).
- 222) *Beyermann, K.*: *Z. Anal. Chem.* **230**, 414 (1967).
- 223) *Polwani, F., M. Surace, and M. Luisi*, editors: *Gas Chromatographic. Determination of Hormonal Steroids*. New York: Academic Press 1967.
- 224) *Sparagana, M.*: *Stroeroids* **8**, 219 (1966).
- 225) *Beyermann, K., u. E. Knoll*: *Z. Anal. Chem.*, im Druck.
- 226) —, *H. Wisser*: *Z. Anal. Chem.*, im Druck.

Eingegangen am 9. Januar 1969