

Quantitative Spurenanalyse und Chromatographie*

Von H. GUBSER

CIBA AG, Basel, Analytische Abteilung

Spurenanalyse

Bei den Spurenanalysen ist das Verhältnis der zu bestimmenden Substanz zu den Begleitsubstanzen außerordentlich ungünstig. Die Spurenbestimmung beginnt dort, wo die Empfindlichkeit der normalen Analysemethoden aufhört, und soll in der Regel noch Bruchteile von Promillen genau erfassen. Von den zwei Begriffen, die dabei von Bedeutung sind, gibt die Erfassungsgrenze¹ die kleinste Substanzmenge in γ ($1 \gamma = 0,001 \text{ mg}$) an, welche, unabhängig vom Volumen, noch eindeutig auffindbar ist. Ebenfalls von Bedeutung ist die Kenntnis des Flüssigkeitsvolumens, in welchem eine Bestimmung noch durchgeführt werden kann. Dafür hat F. L. HAHN² den Begriff der Grenzkonzentration eingeführt. Diese kann man entweder als tatsächliche Konzentration, z. B. in γ je ml, oder als das Verhältnis des Gewichts des erfaßten Stoffes zum Gewicht der Begleitsubstanzen angeben. Dafür hat sich allgemein die amerikanische Bezeichnung *parts per million* (p. p. m.) eingebürgert.

Sofern Spurenanalysen einen Aufschluß benötigen, so kommt diesem die größte Bedeutung zu. Einerseits soll zur Erhöhung der Genauigkeit in möglichst wenig Lösungsmittel gearbeitet werden, andererseits sollen nicht zusätzlich Fremdionen das Verhältnis zwischen den zu bestimmenden Ionen und den vorhandenen Fremdionen noch verschlechtern. Der ausgezeichnete Aufschluß nach WURZSCHMITT^{3,4} kommt daher nur selten in Frage, da das Natriumsuperoxyd und die anschließende Neutralisation zu viele Fremdionen in die Aufschlußlösung bringen. Als bester Aufschluß für die Spurenanalyse hat sich die Verbrennung der Substanz in dem mit Sauerstoff gefüllten, geschlossenen Kolben nach SCHÖNIGER^{4,5} bewährt. Dieser Aufschluß bringt die folgenden drei großen Vorteile:

1. Nebst den Verbrennungsprodukten der Substanz und der minimalen Asche des Filterpapiers kommen keine zusätzlichen Ionen in die Aufschlußlösung.

* Vortrag anlässlich der Winterversammlung des Schweizerischen Chemiker-Verbandes am 31. Januar 1959 in Freiburg.

¹ F. FEIGL, *Mikrochem.* 1 (1923) 4.

² F. L. HAHN, *Mikrochem.* 8 (1930) 75.

³ *Mikrochem.* 36/37 (1951) 769.

⁴ PREGL-ROTH, *Quantitative organische Mikroanalyse*, Wien 1958.

⁵ *Microchim. Acta* 1955, 123, 1956, 869.

2. Die Absorptionslösung kommt vor dem Aufschluß direkt in den Kolben und kann bereits alle nötigen Zusätze enthalten.

3. Die Verbrennung erfolgt im geschlossenen Kolben, Verluste sind nicht möglich, was z. B. bei der Spurenanalyse von Quecksilber einen außerordentlichen Fortschritt bedeutet.

Eine weitere Aufschlußmöglichkeit vor allem für größere Substanzmengen bis 1 g liegt in der Zerstörung der organischen Substanz mit Magnesiumnitrat.

Die Substanz wird mit der etwa vierfachen Menge Magnesiumnitrat ($\text{Mg}[\text{NO}_3]_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) gemischt und in einem Porzellantiegel vorsichtig erhitzt. Nach beendeter Reaktion läßt man abkühlen, gibt 3 ml konz. Salpetersäure zu und erhitzt nochmals. Ist die Verbrennung noch nicht vollständig, so wiederholt man die Oxydation mit Salpetersäure.

Für flüssige Substanzen mit Siedepunkten unter etwa 100°C erfolgt die Verbrennung am besten nach einer der bekannten Methoden im Sauerstoffstrom in einem Verbrennungsrohr.

Bei den Spurenanalysen soll bei jeder Bestimmung ein Nullwert und ein bis zwei Werte mit bekannten Gehalten, genau entsprechend behandelt, mitgenommen werden. Im Gegensatz zur Auswertung gegen Eich- oder Testkurven werden dabei die unvermeidlichen Fehlerquellen, wie Temperaturschwankungen, Reaktionszeiten, Reinheitsunterschiede von Wasser, Lösungsmittel und Reagenzien usw., automatisch auskorrigiert.

Bei allen Spurenanalysen ist die Spezifität der Reaktion von ausschlaggebender Bedeutung und muß in jedem Einzelfall genau untersucht werden.

Die Arbeitstechnik der quantitativen Spurenanalyse sollen die folgenden drei Beispiele zeigen.

1. Spurenbestimmung von Selen

Wie bei mehreren anderen Spurenbestimmungen konnte auch beim Selen eine Tüpfelreaktion nach FEIGL^{6,7} als quantitative Methode entwickelt werden. FEIGL gibt bei seinen Reaktionen immer die Erfassungsgrenze und die Grenzkonzentration an, wodurch zeitraubende Vorversuche wegfallen. Nach FEIGL entsteht bei der Einwirkung von seleniger Säure auf asymmetrisches Diphenylhydrazin ein violettes Chinonanil-Diphenylhydrazon. Es hat sich allerdings gezeigt, daß die

⁶ F. FEIGL und V. DEMANT, *Microchim. Acta* 1 (1937) 322.

⁷ *Qualitative Analysis by Spot Tests*, herausgegeben von F. FEIGL, New York/Amsterdam 1947.

Reaktion wahrscheinlich anders verläuft, denn bei hochgereinigtem asymmetrischem Diphenylhydrazin unterbleibt die Farbstoffbildung, sofern man das Diphenylhydrazin nicht vorher mit Wasserstoffsuperoxyd behandelt.

Zur Durchführung der Bestimmung werden etwa 50 mg Substanz in einem 500-ml-Schöniger-Kolben verbrannt und die Verbrennungsgase in 15 ml Wasser absorbiert. Zur Entfernung der störenden Verbrennungsprodukte, wahrscheinlich Peroxyde, wird mit Oxalsäure (5 ml, 10prozentig) versetzt und 10 min auf ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen filtriert man in einen 100-ml-Meßzylinder mit Schliffstopfen, gibt kurz vor der Zugabe des Reagens zur ganzen Versuchsreihe 10 ml 5-n Salzsäure und bringt alle Volumina auf 70 ml. Als Vergleichswerte werden ein Nullwert und ein Blindwert mit 50 γ Selen genau entsprechend behandelt.

Zur Bereitung des Reagens erhitzt man eine schwach saure (1 ml 0,1-n Salzsäure auf 100 ml Lösung) 1prozentige Lösung von asymmetrischem Diphenylhydrazin mit Wasserstoffsuperoxyd (5 ml 2prozentig auf 100 ml Lösung) 30 min auf 50°C.

Gibt man 5 ml dieser Reagenslösung zu den einzelnen Aufschlußlösungen, schüttelt durch und läßt 45 min stehen, so bildet sich, je nach der Menge des vorhandenen Selen, ein violetter Farbstoff. Dieser wird im Scheidetrichter mit 20 ml Chloroform extrahiert und nach einer Stunde im Spektrophotometer bei 550 m μ und 1 cm Schichtdicke gemessen.

Nach dieser Methode gelingt es, 1 bis 50 γ Selen zu bestimmen. Berechnet man auf die Einwaage von 50 mg, so entspricht dies 20 bis 1000 p.p.m. oder 0,002 bis 0,1 % Selen.

2. Spurenbestimmung von Phosphor

Versucht man die empfindliche Molybdänblaureaktion zu einem Spurennachweis für Phosphor auszuarbeiten, so zeigen die Versuche, daß bei der Reduktion eines Gemisches von Molybdänsäure und Phosphormolybdänsäure auch kleine Spuren Molybdänsäure zu Molybdänblau reduziert werden. Extrahiert man jedoch die Phosphormolybdänsäure mit Amylalkohol/Äther, wobei die Molybdänsäure in der wäßrigen Phase verbleibt, so läßt sich die Molybdänblaumethode zu einem äußerst empfindlichen Spurennachweis von Phosphor ausarbeiten⁸.

Der Aufschluß erfolgt ebenfalls im Schöniger-Kolben, wobei 15 ml n-Schwefelsäure vorgelegt werden. Nach der Zugabe von 5 ml Ammonmolybdat (5 g $[\text{NH}_4]_6 \cdot \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 60 ml Wasser und 40 ml 5-n Schwefelsäure) wird die Phosphormolybdänsäure mit 25 ml Amylalkohol/Äther (3 Vol.-Teile tert. Amylalkohol, 1 Vol.-Teil Äther) extrahiert und mit zweiwertigem Zinn (10 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 25 ml konz. Salzsäure : n-Schwefelsäure = 1 : 200, verdünnte Lösung frisch bereiten) zu Molybdänblau reduziert. Man mißt nach einer Stunde im Spektrophotometer bei 625 m μ und 1 cm Schichtdicke gegen einen Nullwert. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Testwertes mit 20 γ Phosphor.

Nach dieser Methode lassen sich 0,2 bis 20 γ Phosphor bestimmen. Dies entspricht bei einer Einwaage von 50 mg 4 bis 400 p.p.m. oder 0,0004 bis 0,04 % Phosphor.

3. Spurenbestimmung von Eisen

Die colorimetrische Bestimmung erfolgt nach der Reduktion zu zweiwertigem Eisen mit o-Phenanthrolin.

⁸ Versuche von W. BÜCHLER, CIBA AG, Basel (unveröffentlicht).

Die Fehlergrenze beträgt $\pm 2 \gamma$. Der Aufschluß kann jedoch mit Magnesiumnitrat erfolgen, wobei Einwaagen bis zu 1 g Substanz möglich sind.

Nach dem Aufschluß mit Magnesiumnitrat wird der Tiegelinhalt in 8 ml 5-n Salzsäure gelöst, der Salzsäureüberschuß mit Natriumbicarbonat abgestumpft, das Eisen soll dabei nicht ausfallen, und die Lösung auf 50 ml gebracht. Ein aliquoter Teil, der maximal 100 γ Eisen enthalten soll, wird abpipettiert, mit 10 ml Natriumcitrat (250 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 1 l Wasser), 2 ml Hydrochinon (1 g in 100 ml Wasser) und 4 ml o-Phenanthrolin (0,5 g in 200 ml Wasser, heiß gelöst) versetzt und das Volumen auf 50 ml gebracht. Der gebildete rote Ferrophenantrolinkomplex wird nach zwei Stunden mit einem Spektrophotometer bei 490 m μ und 2 cm Schichtdicke gemessen.

Bei einer Einwaage von 1 g lassen sich 2 bis 100 p.p.m. entsprechend 0,002 bis 0,01 Prozent Eisen bestimmen.

Chromatographie

Die ältesten mikroanalytischen Methoden waren chromatographische Methoden. Vor bald hundert Jahren wurde in Basel die *Papierchromatographie* begründet. Im Jahre 1861 sprach der damalige Professor für Chemie an der Universität, CHRISTIAN FRIEDRICH SCHÖNBEIN, in der Basler Naturforschenden Gesellschaft «Über einige durch die Haarröhrchenanziehung des Papiers hervorgerufenen Trennungswirkungen»⁹. Bei seinen Versuchen mit wässerigen Alkalien, Säuren, Salzen und Farbstoffen erkannte und beschrieb SCHÖNBEIN bereits die Grundlagen der Papierchromatographie, wie verschiedene Steighöhen der einzelnen Substanzen und das Vorseilen der Wasserfront. F. GOPPELSROEDER, der den Vortrag von SCHÖNBEIN hörte, erfaßte sofort die Möglichkeiten der neuen Methode. Noch im gleichen Jahr sprach er ebenfalls in der Basler Naturforschenden Gesellschaft «Über ein Verfahren, die Farbstoffe in ihren Gemischen zu erkennen»¹⁰; eine direkt modern anmutende Arbeit über die papierchromatographische Trennung von Farbstoffen. Auf der Grundlage von mehreren Tausenden von Versuchen hat dann F. GOPPELSROEDER 1906 sein Buch *Anregung zum Studium der auf Capillaritäts- und Adsorptionerscheinungen beruhenden Capillaranalyse*¹¹ herausgegeben. Darin behandelt er die Papierchromatographie von Farbstoffen, Alkaloiden und anorganischen Stoffen sowie die Anwendung der Papierchromatographie in der pharmazeutischen und physiologischen Chemie. Die beschriebene Arbeitstechnik unterscheidet sich

⁹ Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel 1861, S. 249 (im Druck erschienen 1863). CH. F. SCHÖNBEIN erklärte seine beobachteten Trennungen durch Kapillaritätserscheinungen an feinen Röhrchen im Papier, daher der Name «Haarröhrchenanziehung». Er knüpfte damit an jahrhundertalte Versuche über Kapillaritätserscheinungen an feinen Röhrchen an, worüber schriftliche Abhandlungen über PLATEAU (1842–1870), TH. YOUNG (1804), SEGNER (1751), ISAAK VOSS (1618–1689), G. A. BORELLI (1608–1679), N. ACCIUNTI (1600–1635) bis auf LEONARDO DA VINCI (1452–1519) zurückgehen.

¹⁰ Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel 1861, S. 268 (im Druck erschienen 1863).

¹¹ Verlag von Helbing & Lichtenhahn, Basel 1906.

kaum von der modernsten Methodik. F. GOPPELSROEDER arbeitete unter Glasglocken, benutzte auch schon imprägnierte Papiere, kannte den Nachweis mit Reagenzien auf dem Papier, fand und beschrieb gleiche Steighöhen gleicher Substanzen unter gleichen Bedingungen, löste die Farbstoffe nach der chromatographischen Trennung zur Untersuchung vom Papier ab oder tränkte die Papiere mit Öl und wies die Substanzen auf dem Papier spektrophotometrisch nach. Selbst halbquantitative Arbeiten durch Schätzung gegen bekannte Testpunkte war ihm bereits bekannt. Diese ältesten Beispiele, deren Reihe sich bis zur allgemeinen Verbreitung der Papierchromatographie nach dem Zweiten Weltkrieg fortsetzen läßt, sollen zeigen, daß es sich dabei nicht um eine neue Methodik handelt. Die allgemein übliche Arbeitstechnik sowie die neuere Literatur ist in den Berichten von Fräulein Dr. A. GRÜNE, herausgegeben von der Firma Schleicher & Schüll, Dassel (Feldmeilen ZH), eingehend beschrieben. Die in der CIBA AG gebräuchlichen Arbeitsmethoden und deren Anwendung auf dem Gebiete der Sterine und Steroide hat R. NEHER in mehreren Publikationen^{12, 13, 14} behandelt. Ich möchte daher den Stand der quantitativen Arbeitstechnik an wenigen unveröffentlichten Beispielen von Farbstoffzwischenprodukten zeigen.

Handelt es sich um die Bestimmung von kleineren Mengen Verunreinigungen bis etwa 5%, so kommt man mit der visuellen Technik auf erstaunlich genaue Resultate. Dabei werden definierte Mengen als Testpunkte oder Testgemische von Reinsubstanzen mitlaufen gelassen. Scharfe Trennungen auf dem Papier lassen sich in der Regel mit größeren Substanzmengen als 200 bis 500 γ nicht mehr erreichen. Um die nötige Bestimmungsempfindlichkeit von 0,2 bis 0,5% zu erzielen, müssen folglich die Nachweisverfahren in der Größenordnung von 1 γ ansprechen.

Die folgenden Nachweisverfahren sind für Farbstoffe und Farbstoffzwischenprodukte in Mengen von 1 γ und darunter von allgemeiner Anwendbarkeit.

1. Viele Produkte lassen sich im ultravioletten Licht oder auf dem Fluoreszenzschirm direkt auswerten.

2. Fast sämtliche kuppelbaren Substanzen können auf dem Papier mit diazotierter Sulfanilsäure (*p*-Amino-benzolsulfonsäure) nachgewiesen werden.

3. Aminogruppenhaltige Substanzen werden auf dem Papier diazotiert und anschließend mit Chromotropsäure gekuppelt (1,8-Dioxynaphtalin-3,6-disulfonsäure).

Zur Diazotierung stellt man die Chromatogramme in ein Glasgefäß um eine Schale mit festem Natriumnitrit (NaNO_2) auf. Mit einer Pipette gibt man durch ein Loch im Deckel konz. Salzsäure in die Schale und läßt die sich entwickelnden nitrosen Gase etwa 15 min auf die Papiere einwirken. Hierauf werden die Chromatogramme herausgenommen und mit Chromotropsäure besprüht.

Verbindungen mit Nitrogruppen können nach der Reduktion der Nitrogruppen mit Hydrosulfit auf dem Papier nachgewiesen werden.

Liegen die zu bestimmenden Substanzen in beliebigen Verhältnissen vor, so müssen nach der papierchromatographischen Trennung die einzelnen Substanzen vom Papier abgelöst und in Lösung quantitativ bestimmt werden. Die Lage der gesuchten Verbindungen auf dem Chromatogramm wird nach Möglichkeit durch Fluoreszenz oder UV-Absorption bestimmt. Läßt sich die Substanz auf diese Weise nicht lokalisieren, so wird auf einem Leitchromatogramm durch eine Farbreaktion der gesuchte Ort der Substanz ermittelt. Die dadurch gefundenen Stellen werden aus dem Papier ausgeschnitten und die Substanz in einer Glassinternutsche über einem Wittschen Topf durch ein geeignetes Lösungsmittel abgelöst. Mit dem Eluat führt man Farbreaktionen aus, meist entsprechend den erwähnten Nachweisverfahren, und mißt die entstandene Farbe spektrophotometrisch. Die Eichkurve wird genau entsprechend mit reinen Substanzen über das Papierchromatogramm ermittelt.

Nach dieser Methodik werden in unseren Laboratorien mehr als 50 Produkte analysiert, worunter sehr viele Isomerenbestimmungen, die sich sonst nur durch äußerst zeitraubende Verfahren trennen und quantitativ bestimmen lassen. So analysieren wir z. B. seit 1952 in 1-Naphtylamin-7-sulfonsäure (1,7-Clevesäure) die folgenden Isomere 1,2, 1,4, 1,5, 1,6, 1,8 und 2,7 quantitativ¹⁵. In Brombenzanthon gelingt die Bestimmung von Anthrachinon, Benzanthon und Dibrombenzanthon¹⁶. In 2-Naphtol-6,8-disulfonsäure (G-Salz) läßt sich 2-Naphtol-3,6-disulfonsäure (R-Salz) und 2-Naphtol-6-sulfonsäure bestimmen¹⁶.

Als wertvolle Ergänzung zur Papierchromatographie hat sich die *Dünnschichtchromatographie* nach E. STAHL¹⁷ erwiesen. Dabei wird Kieselgel mit Gips als Bindemittel und Wasser zu einem Brei gemischt und mit einem Streichgerät auf eine Glasplatte aufgetragen. Die Chromatographie kann prinzipiell gleich wie auf dem Papier erfolgen, wobei mit gleichen Substanzmengen gearbeitet werden kann. Gegenüber dem mit Al_2O_3 imprägnierten Papier erhält man kleinere Flecken und viel größere Trennschärfen, vor allem sind aber bei der Dünnschichtchromatographie auch bei höheren Temperaturen alle Lösungsmittel unbeschränkt anwendbar.

Der Nachweis von Zersetzungsprodukten in Reserpin, die Trennung von 2-Oxy- und 2,6-Dioxy-anthrachinon sowie der Nachweis von Verunreinigungen im sehr schwerlöslichen Marineblau D gelangen ganz einwandfrei nach dem Dünnschichtverfahren.

Die quantitative Arbeitsweise mit Testpunkten und Testgemischen bleibt sich genau gleich wie bei der Papierchromatographie. Das Abtragen der Schicht mit den Substanzflecken und deren Extraktion und Bestimmung zeigt jedoch verschiedene Schwierigkeiten, und wir konnten dabei noch keine genügende Bestimmungsgenauigkeit erzielen.

Zur Bestimmung von kleinen Mengen Verunreinigungen hat A. BECKER eine neue Methodik entwickelt, die

¹² *Helv. Chim. Acta* 39 (1956) 1664.

¹³ *J. Chromatography* 1 (1958) 122.

¹⁴ *J. Chromatography* 1 (1958) 205.

¹⁵ Methode von CH. WITTEW und E. FELBER, CIBA AG, Basel (unveröffentlicht).

¹⁶ Methode von E. FELBER, CIBA AG, Basel (unveröffentlicht).

¹⁷ *Chem.-Ztg.* 82 (1958) 323.

er *Elatographie*¹⁸ nennt. Dabei werden Derivate der gesuchten Substanz chromatographiert und diese vorher direkt auf dem gleichen Papier hergestellt. Dies geschieht, indem man die zu prüfende Substanz durch eine Zone der auf das Papier gebrachten Reaktionslösung wandern läßt oder die Substanz direkt auf diese Zone auftröpfelt. Die Methodik eignet sich vor allem als Schnelltest, da sie höchstens 25 min Zeit benötigt.

Imprägniert man z.B. auf einem Filterpapierbogen einen schmalen Streifen mit Natriumnitrit in Methanol (gesättigt) und *p*-Nitroanilin in Methanol (gesättigte Lösung: Methanol = 1 : 10), tropft auf diese Stelle 100 γ 2-Naphtol-3,6-disulfonsäure (R-Salz) in 1-n Essigsäure (0,01 ml) gelöst, benützt als Fließmittel Soda/Ammoniak (40 ml 2-n Soda und 80 ml 5-n Ammoniak zu 200 ml verdünnt), so kann man nach 15 min eine Verunreinigung von 1 γ 2-Naphtol-6,8-disulfonsäure (G-Salz) noch genau erkennen. Das gleiche gelingt auch umge-

¹⁸ Name und Methodik von A. BECKER, CIBA AG, Basel (unveröffentlicht).

kehrt für 1 γ R-Salz in 100 γ G-Salz¹⁹. Auch eine Phenolbestimmung gelingt elatographisch innert 25 min. Man tropft die phenolhaltige Substanz auf eine schmale, vorher mit Dibromchinonchlorimid (0,3 g in 100 ml Methanol) behandelte Zone, läßt die Substanz mit Methanol/Wasser (1 : 1) durch eine schmale Zwischenzone (etwa 2 cm) in eine mit Kalilauge (normale methanolische Kalilauge) imprägnierte Papierzone laufen und kann dabei 1 γ Phenol neben z.B. 200 γ 1-Phenyl-5-aminopyrazol noch deutlich als blauen Flecken erkennen¹⁶.

Selbstverständlich arbeitet die Spurenanalyse und die Chromatographie auch mit allen modernen physikalisch-chemischen Methoden, wie Polarographie, Infrarotspektroskopie, Elektrophorese usw. Aber selbst im Großbetrieb, wo alle diese modernen Hilfsmittel zur Verfügung stehen, gibt es immer noch Probleme, die sich mit einfachen mikroanalytischen Methoden rascher und besser lösen lassen als nach irgendeiner andern Methodik.

¹⁹ Methode von P. BÜHLEB, CIBA AG, Basel (unveröffentlicht).