

Direkte quantitative Photometrie an Dünnschicht-Chromatogrammen

Von Ute Hezel^[*]

Anhand von Anwendungsbeispielen werden die wichtigsten Meßmethoden zur direkten photometrischen Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen diskutiert. Da das Licht an den DC-Sorbentien stark gestreut wird, ist die Absorptionsmessung in Remission der Transmissionsmessung vorzuziehen. Bei der Remissionsmessung führt ein Näherungsverfahren für die Kubelka-Munk-Funktion zu einwandfreien Eichgeraden. Der Arbeitsbereich für quantitative Remissionsmessung liegt im µg-Bereich, die Nachweisgrenze in der Größenordnung von 10^{-8} g. Die Standardabweichung für Flecken gleicher Konzentration ist kleiner als $\pm 1\%$. – Durch eine simultane Remissions- und Transmissionsmessung wird das Signal-Untergrund-Verhältnis verbessert. – Gegenüber der Remission im Absorptionsmaximum erweist sich die Messung der Fluoreszenzminderung („Fluoreszenzlöschung“) als weniger empfindlich. Gleichzeitige Messung der Remission und Fluoreszenzminderung ergibt jedoch eine Empfindlichkeitssteigerung gegenüber der reinen Remissionsmessung. – Die Fluoreszenzmessung ist analog zur Lösungsphotometrie im allgemeinen wesentlich empfindlicher als die Absorptionsmessung. Der Arbeitsbereich liegt normalerweise im ng-Bereich, die Nachweisgrenze bei 10^{-11} g. – Sämtliche Untersuchungen wurden am Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer durchgeführt.

1. Einleitung

Nachdem sich die Dünnschicht-Chromatographie (DC) zu einer im gesamten Gebiet der Chemie weit verbreiteten Mikrotrennmethode entwickelt hat, wird immer mehr eine quantitative Untersuchung von DC-Flecken erforderlich. Der bloß visuelle, subjektive Vergleich der Flecke untereinander – sei es nach der Farb- oder Leuchtintensität^[1–4] oder gar nur der Fleckgröße^[5] – läßt lediglich eine Genauigkeit von 10–20% erreichen. Als objektive Meßmethode bietet sich an, die einzelnen Flecke von der Platte abzukratzen, die Substanzen von der stationären Phase zu eluieren und dann absorptionsphotometrisch oder fluorimetrisch zu bestimmen. Diese Methode läßt wohl eine Genauigkeit von ca. 3% zu^[6]. Nachteilig ist jedoch, daß man zum einen – um diese Genauigkeit zu erreichen – ca. 50–100 µg Substanz pro Fleck auftragen muß; dabei wird die Platte oft bereits übersättigt, und man erhält schlecht getrennte, verschleppte Flecke. Zum anderen ist das Auskratzen und Eluieren zeitraubend, störungsanfällig und bei sich überlappenden Flecken nur fehlerhaft möglich^[7]. Diese Schwierigkeiten kann man umgehen, indem man die Flecke auf der Platte direkt absorptionsphotometrisch oder fluorimetrisch auswertet, man spricht dann von „in-situ“-Messung^[8–13].

2. Absorptionsmessung im Auflicht (Remission)

DC-Flecke erscheinen deshalb farbig, weil sie aus der auffallenden polychromatischen sichtbaren Strahlung Licht eines bestimmten, für sie charakteristischen Wellenlängenbereiches absorbieren. Dadurch wird im Vergleich zum

weißen, nicht absorbierenden Untergrund weniger Licht remittiert (= diffus reflektiert). Diese Remissionsminderung durch Absorption im sichtbaren sowie auch im ultravioletten Bereich kann für die quantitative Auswertung der DC-Flecke herangezogen werden. Der Remissionsgrad hängt nicht linear mit der Konzentration zusammen, sondern wird am besten beschrieben durch die Kubelka-Munk-Funktion^[14–17]:

$$\frac{(1 - R_{abn})^2}{2R_{abn}} = \frac{\epsilon \cdot c}{s} = \frac{k}{s}$$

R_{abn} = absoluter Remissionsgrad
 ϵ = Extinktionskoeffizient
 c = Konzentration
 s = Streukoeffizient
 k = Absorptionskoeffizient

Die Theorie fordert für solche Remissionsmessungen eine homogene Verteilung der Probe innerhalb der Meßfläche. Um bei der Messung an DC-Flecken, deren Konzentration ja in der Fleckmitte am größten ist, diese Bedingung zu erfüllen, kann man eine im Vergleich zur Fleckgröße kleine Meßfläche (z. B. 1 mm²) wählen. Die gesamte Substanzmenge eines Flecks wird dann erfaßt, wenn man den Fleck in einer mäanderförmigen Bewegung an der Meßfläche vorbeiführt. Dabei muß darauf geachtet werden, daß jeder Teil des Flecks tatsächlich genau einmal gemessen, d. h. kein Teil doppelt oder überhaupt nicht erfaßt wird. Nach dem mäanderförmigen Abtasten werden die Meßwerte in Kubelka-Munk-Werte umgerechnet und addiert. Auf diese Weise erhält man eine einwandfreie Eichgerade, wie am Beispiel von 0.1–2.0 µg Sudanrot in Abbildung 1, Kurve 1, gezeigt sei.

Dieses Verfahren ist allerdings recht zeitaufwendig, und es wurde deshalb nach einer für die Praxis brauchbaren Vereinfachung gesucht: Führt man die DC-Flecke mit einer spaltförmigen Meßfläche ab, welche den Fleckdimensionen

[*] Dr. U. Hezel
Abteilung für physikalisch-chemische Analyse
Carl Zeiss Oberkochen
7082 Oberkochen, Postfach 35/36

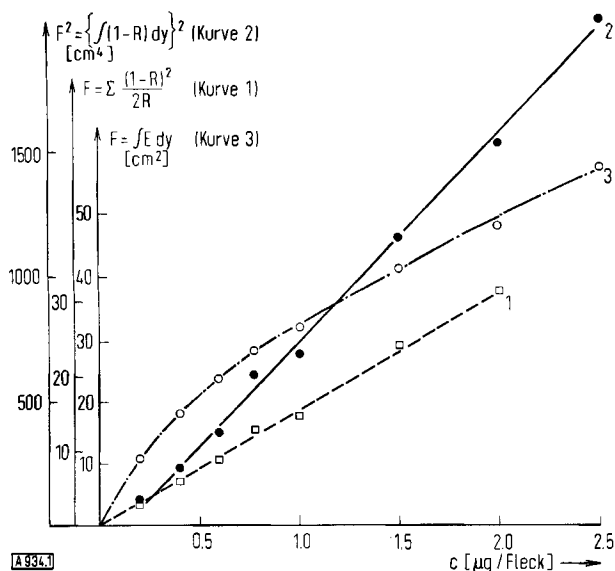


Abb. 1. Eichreihe für Sudanrot, Absorptionsmessung bei $\lambda = 500$ nm. Kurve 1: Remission, punktweise Messung und Auswertung über die Kubelka-Munk-Funktion; Kurve 2: Remission, Abfahren mit Meßspalt und Auswertung über das Flächenquadrat; Kurve 3: Transmission, Abfahren mit Meßspalt und Auswertung über die Fläche in Extinktionseinheiten.

in der Breite angepaßt ist, so wird z. B. die in Abbildung 2 dargestellte Remissions-Orts-Kurve registriert. Die Fläche zwischen dieser Kurve und der Basislinie wird quadratisch gegen die Konzentration aufgetragen. So sind im μg -Bereich gute Eichgeraden (z. B. Abb. 1, Kurve 2) zu erhalten^[18-23]. Der Konzentrationsbereich, für den diese Näherung gilt, ist in praxi völlig ausreichend und umfaßt im allgemeinen ca. eine Zehnerpotenz. Man hat damit ein Verfahren gefunden, dessen Abweichungen von der Linearität (Korrelationskoeffizienten im allgemeinen $> 99.5\%$) geringer sind als die Schwankungen, welche durch das Auftragen und die chromatographischen Parameter bedingt sind. Als Gesamtfehler des Verfahrens werden 3-4% angegeben^[24]. – Die Fläche zwischen der Remissions-

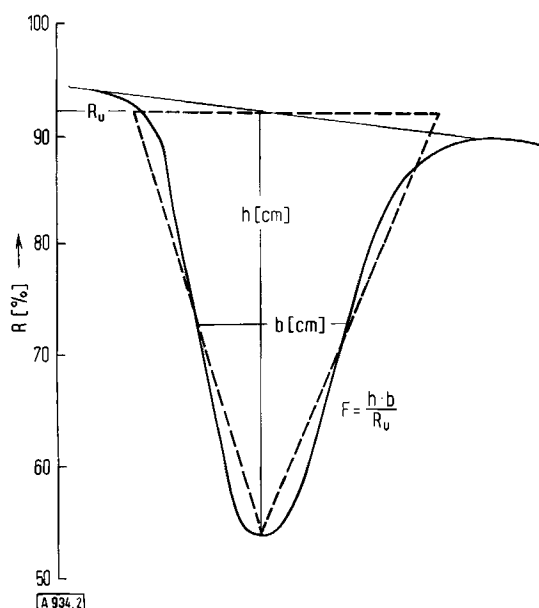


Abb. 2. Remissions-Orts-Kurve mit Dreiecksnäherung und Untergrundkorrektur.

Orts-Kurve und der Basislinie läßt sich in den meisten Fällen gut durch ein Dreieck nähern. Wie man in Abbildung 2 erkennt, ist diese graphische Integration auch noch bei schrägen Basislinien sinnvoll. Auch der von Fleck zu Fleck leicht variierende Remissionsuntergrund kann einfach rechnerisch dadurch korrigiert werden, daß man den interpolierten mittleren Remissionsuntergrund R_u am Fleck auf 100% Remission normiert:

$$\text{Fläche (F)} = \frac{\text{Höhe (b)} \cdot \text{Halbwertsbreite (b)}}{\text{Mittlerer Remissionsuntergrund (R}_u\text{)}}$$

Wesentlich ist, daß hierbei im Gegensatz zu dem im folgenden diskutierten Zweistrahl-Verfahren der interpolierte Remissionsuntergrund am Fleck selbst berücksichtigt wird. Dadurch ließ sich mit dieser Methode eine Standardabweichung für den Einzelwert von 0.8% erreichen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Reproduzierbarkeit von acht Sudanrot-Flecken zu je 2 μg , auf Kieselgel-Merck-Fertigplatten, Fließmittel: Benzol, Meßwellenlänge 500 nm.

h [mm]	b [mm]	R_u [%]	$F = \frac{h \cdot b}{R_u}$ [mm ²]
107	36.5	94.5	41.3
107	36.5	94.5	41.3
107	36.5	93.5	41.8
108	36.5	94.5	41.7
107.5	36.5	94.5	41.5
105.5	36.5	93	41.4
106	36.5	93.5	41.4
104	36.5	93	40.8
Mittelwert			41.4
Standardabweichung des Einzelwerts			$0.3 \pm 0.73\%$
Standardabweichung des Mittelwerts			$0.1 \pm 0.25\%$

Um Untergrundschwankungen zu eliminieren, hat man versucht, das für die Lösungsphotometrie zweckmäßige Zweistrahl-Meßprinzip auch bei Messungen an DC-Platten zu verwenden^[25-27]. Dies ist aber nur dann sinnvoll, wenn wirklich der Untergrund in der Fleckspur und in der Vergleichsspur identisch ist. Diese Forderung ist besonders am Plattenrand nicht erfüllt, Unterschiede in der Größenordnung von 2-3% sind keine Seltenheit. Solche Abweichungen gehen in den Meßwert voll als systematische Fehler ein und verschlechtern die Reproduzierbarkeit gegenüber der Einstrahl-Messung. Hinzu kommt, daß Meß- und Vergleichsspur voneinander durch Längsrillen in Trennrichtung abgegrenzt werden müssen. Damit soll verhindert werden, daß bei größeren R_f -Werten die DC-Flecke in die Vergleichsbahn diffundieren. Dies bedeutet eine wesentliche Veränderung der chromatographischen Bedingungen: erstens werden die Flecke länglicher, was die Trennfähigkeit verschlechtert; zweitens entstehen leicht unsymmetrische und hantelförmige DC-Flecke, welche wahrscheinlich auf Verdampfungsstörungen an den Rillen zurückzuführen sind, – die Reproduzierbarkeit und die Trennfähigkeit werden dadurch weiter vermindert. Außerdem wird durch die zusätzlichen Vergleichsspuren die Probenkapazität pro Platte herabgesetzt.

Bei der Einstrahl-Remissionsmessung können z. B. 10 ng Coffein bei $\lambda = 275$ nm noch ohne weiteres nachgewiesen

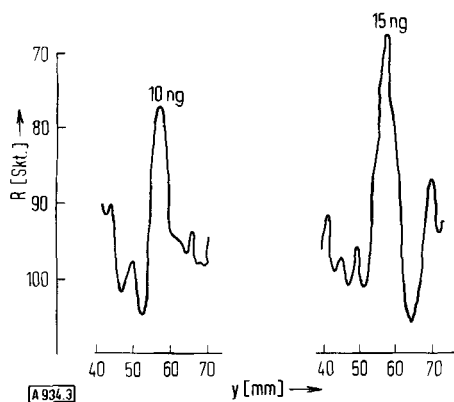


Abb. 3. Nachweisgrenze für Coffein auf Kieselgel-Merck-Fertigplatte (ohne Fluoreszenzindikator). Fließmittel: Benzol/Äther/Eisessig (40:50:10) NS; Steighöhe 10 cm; Remissionsmessung, $\lambda = 275$ nm, Meßfläche 2×3.5 mm².

werden (Abb. 3). Das Signal entspricht einer Remissionsänderung von 100% auf ca. 99%. Beim Zweistrahl-Verfahren kann dieser geringe Effekt aufgrund der Unterschiede in Meß- und Vergleichsstrahl, die in der gleichen Größenordnung liegen, verlorengehen.

3. Absorptionsmessung im Durchlicht (Transmission)

Es lag nahe, die in der Lösungsphotometrie gebräuchliche Transmissionsmessung – möglichst auch als Zweistrahl-Anordnung – ebenfalls bei der quantitativen Auswertung von DC-Platten anzuwenden^[25–27]. Im Gegensatz zu echten Lösungen sind aber DC-Platten stark streuende Medien, für welche das Lambert-Beer-Gesetz keineswegs auch nur annähernd erfüllt ist. Abbildung 1, Kurve 3, zeigt am Beispiel von Sudanrot deutlich, daß besonders im Bereich geringer Konzentrationen die Extinktions-Konzentrations-Kurve stark gekrümmt ist und nur in engen Konzentrationsbereichen durch Geraden angenähert werden kann, die jedoch keine Nullpunktsgersten sind und somit auch nicht den bei Gültigkeit des Lambert-Beer-Gesetzes ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$) zu erwartenden direkten linearen Zusammenhang zwischen Extinktion E und Konzentration c wiedergeben. Aus der Kubelka-Munk-Theorie läßt sich eine Näherungsformel herleiten, welche diese Krüm-

mung begründet^[27]. Die dazu empirisch ermittelten Korrekturparameter gelten aber nur für Kieselgel bestimmter Qualität und sind daher nicht universell anwendbar. – Im Gegensatz dazu ergibt die Remissionsmessung mit Auswertung des Flächenquadrats in demselben Konzentrationsbereich eine einwandfreie Eichgerade (Abb. 1, Kurve 2). – Vor allem aber sind solche Transmissionsmessungen an DC-Platten nur im sichtbaren Bereich möglich, da zum einen die meist verwendeten Trägermaterialien wie Glas oder Aluminiumfolien das Meßlicht im UV völlig absorbieren und zum anderen die Schicht selbst besonders im kurzwelligen UV-Bereich erheblich absorbiert.

Ein weiteres hervorzuhebendes Argument für die Remissionsmessung liefert der Vergleich des Signal-Untergrund-Verhältnisses für Auflicht- und Durchlichtmessung: Wesentlich ist, daß bei Transmissionsmessungen Plattenfehler wie Korngrößen- und Schichtdickenunterschiede die Untergrundschwankungen gegenüber der Remissionsmessung erhöhen^[7] (Abb. 4). Hinzu kommt, daß beim Entwickeln der DC-Platte durch das Abdampfen des Fließmittels von der Plattenoberfläche eine Fließmittelströmung entsteht, welche den Flecken an die Oberfläche schiebt^[28] (Abb. 5). Bei Remissionsmessungen geht fast ausschließlich die Oberflächenschicht ein, so daß die relative Substanzkonzentration in der Meßfläche größer ist als

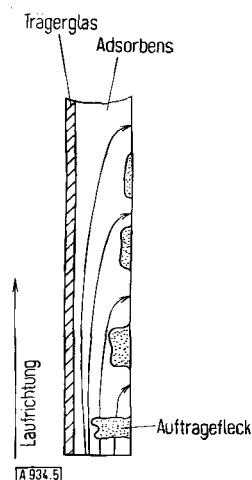


Abb. 5. Schematische Darstellung der Fleckeneindringtiefe in Abhängigkeit von der Laufstrecke der Flecken [28].

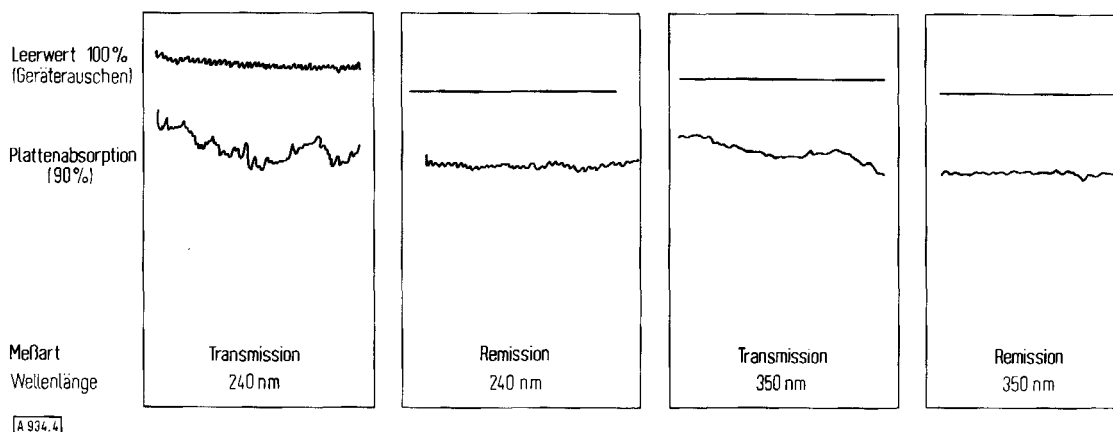


Abb. 4. Vergleich des Platten-Untergrundes für Remission und Transmission, Messungen an der gleichen Bahn, Kieselgelschicht auf Quarz-Trägerplatte.

bei Transmissionsmessungen, bei denen ja die gesamte Schichtdicke des Adsorbens in die Messung einbezogen wird. Darauf ist es zurückzuführen, daß im Gegensatz zu theoretische Überlegungen^[25,27] das Meßsignal im Durchlicht gegenüber der Auflichtmessung nur unwesentlich größer ist. Durch das geringere Untergrundrauschen erhält man aber stets für Remissionsmessungen ein günstigeres Signal-Untergrund-Verhältnis als für Transmissionsmessungen. Aus Abbildung 6 geht hervor, daß z. B. für

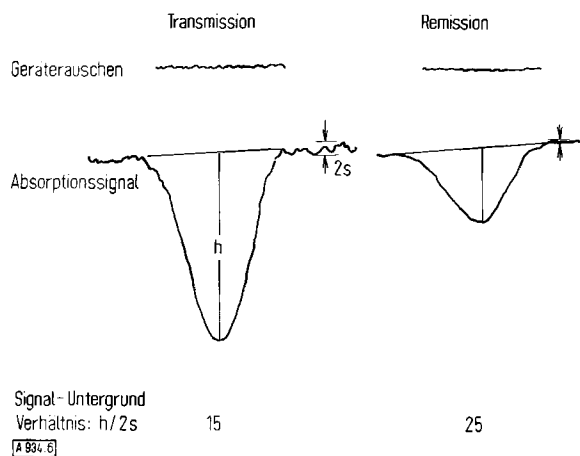


Abb. 6. Vergleich des Signal-Untergrund-Verhältnisses in Remission und Transmission für 1.25 µg Buttergelb bei $\lambda = 440$ nm.

Buttergelb bei $\lambda = 440$ nm an Kieselgel-Fertigplatten das Signal-Untergrund-Verhältnis in Remission um den Faktor 1.7 besser ist als in Transmission.

Die starke Untergrundschwankung bei Transmissionsmessungen macht eine Untergrundkorrektur dringend erforderlich. Aber gerade hierfür ist das Zweistrahl-Verfahren wenig geeignet, weil die Untergrundschwankung im Meß- und Vergleichsstrahlengang keineswegs identisch ist. Hat man bei einer Zweistrahl-Messung z. B. einen durchaus möglichen Unterschied von 2% Transmissions-Untergrund im Meß- und Vergleichsstrahlengang, so geht diese Abweichung additiv und damit absolut als $\Delta E = 0.009$ ein. Dies führt besonders bei kleinen Konzentrationen zu erheblichen relativen Fehlern. Für 0.2 µg Sudanrot erhält man eine maximale Extinktion von ca. 0.1 und würde dabei beispielsweise bereits einen Fehler von 9% in Kauf nehmen müssen.

4. Absorptionsbestimmung durch simultane Remissions- und Transmissionsmessung^[29]

Wie Abbildung 7 zu entnehmen ist, wird die Nachweisgrenze bei der photometrischen Direktauswertung von Dünnschichtplatten nicht durch das Geräterauschen bestimmt, sondern durch die Inhomogenitäten in der Sorbensschicht, welche in Abhängigkeit von der Meßstelle unterschiedliche Streuungen erzeugen. Man erkennt jedoch deutlich, daß sich diese Meßwertschwankungen in Abhängigkeit von der Meßstelle für Remission und Transmission exakt komplementär verhalten – auf dem fleckfreien und damit nicht absorbierenden Plattenuntergrund bedeutet eine durch Streuung verringerte Transmission eine ver-

stärkte Remission. Eine echte Absorption hingegen – z. B. hervorgerufen durch einen DC-Fleck – verringert im Auflicht wie im Durchlicht den Meßwert. Addiert man also das Remissions- und das Transmissionsignal, so wird bei einem bestimmten Größenverhältnis dieser beiden Signale

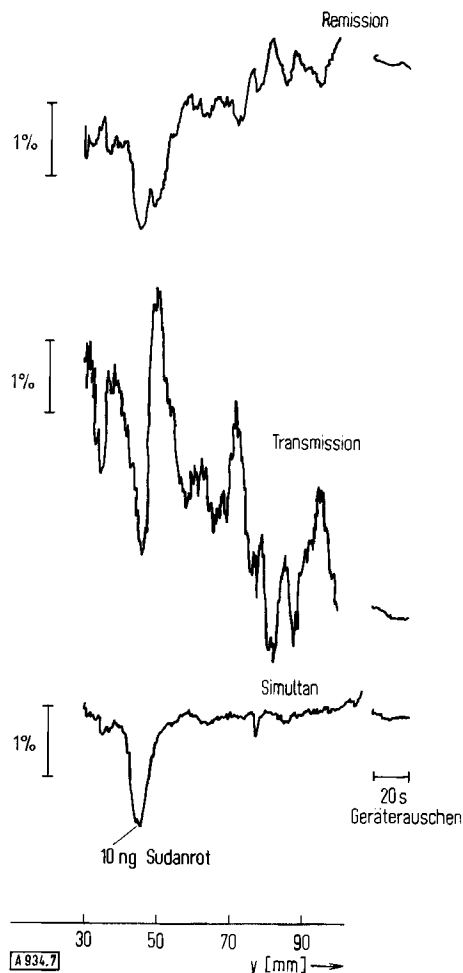


Abb. 7. Absorptionsmessung von 10 ng Sudanrot, auf Kieselgel-Merck-Fertigplatte, Fließmittel: Benzol; Meßwellenlänge 500 nm, Spalt: 0.1×10 mm².

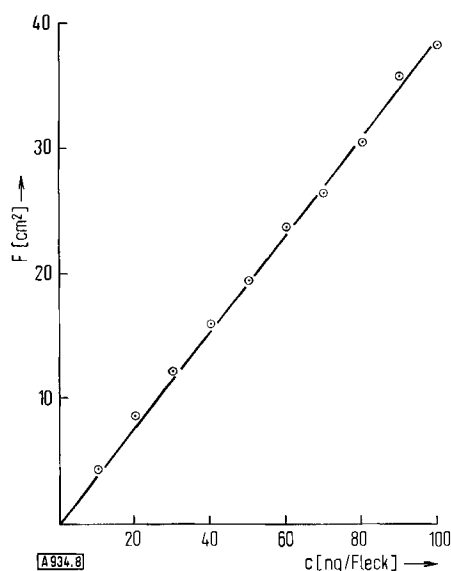


Abb. 8. Simultane Remissions- und Transmissionsmessung an 10-100 ng Sudanrot; Meßwellenlänge 500 nm; Verstärkungsverhältnis Remission: Transmission = 10:4, Spalt: 0.1×7 mm².

die Basislinie geglättet und zugleich der Absorptionsmeßwert für die DC-Flecke gegenüber der reinen Remissionsmessung vergrößert (Abb. 7). Dadurch wird das Signal-Untergrund-Verhältnis wesentlich verbessert; so lassen sich mit dieser Methode noch ohne weiteres 5 ng Sudanrot nachweisen.

Die quantitative Auswertung von 10–100 ng Sudanrot ist in Abbildung 8 dargestellt. In diesem Bereich sehr kleiner Absorptionen hängt die Fläche zwischen der Absorptionskurve und der Basislinie linear von der Konzentration ab. Die Simultan-Messung ist besonders im sichtbaren Spektralbereich wirksam, da hier die Meßstrahlung merklich in das Plattenmaterial eindringt.

Wesentlich ist an diesem Verfahren, daß für die simultane Remissions- und Transmissionsmessung – im Gegensatz zum Zweistrahlverfahren – durch die Beibehaltung des Einstrahlprinzips tatsächlich der Untergrund an der Meßstelle selbst korrigiert wird.

5. Indirekte Absorptionsmessung durch Fluoreszenzminderung im Auflicht und Durchlicht

Die Fluoreszenzminderung – irreführend oft auch Fluoreszenzlöschung (Quenching) genannt – wird bei der visuellen Untersuchung von DC-Flecken verwendet, welche nur im UV-Bereich absorbieren. Diese Fluoreszenzminderung ist kein Löschphänomen sondern ein Absorptionseffekt^[30,31], im allgemeinen für die 254 nm-Quecksilberlinie. Der Effekt soll im folgenden für die üblichen F_{254} -Platten diskutiert werden (Abb. 9).

----- Anregungsstrahlung, 254 nm Hg
 ——— grüne Emissionsstrahlung

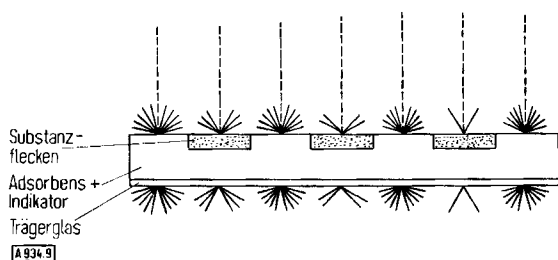


Abb. 9. Schematische Darstellung der Fluoreszenzminderung.

Die Sorbensschicht enthält einen Fluoreszenzindikator, der bei Anregung mit der 254 nm-Quecksilberlinie grün fluoresziert. Befindet sich auf der DC-Platte ein Fleck, welcher die 254 nm-Strahlung bereits selbst absorbiert, so wirkt dieser als Filter; das bedeutet, daß weniger Anregungslicht auf den Indikator fällt und somit an dieser Stelle weniger Fluoreszenzlicht entsteht. Daher erscheint der UV-absorbierende Fleck im Vergleich zum intensiv grün fluoreszierenden Untergrund dunkler. Mit steigender Substanzkonzentration wird der Filtereffekt verstärkt, so daß die Flecken zunehmend dunkler erscheinen. Dieser Effekt kann auch für die quantitative Direktbestimmung von UV-absorbierenden Substanzen genutzt werden:

An nicht-streuenden Objekten würde in Transmission für die Minderung der grünen Fluoreszenzstrahlung das Lambert-Beer-Gesetz gelten. Der Glasträger der Dünnschichtplatte wirkt bei der Transmissionsmessung im allgemeinen als Kantenfilter für die Anregungsstrahlung. Das Ergebnis einer solchen Messung ist in Abbildung 10, Kurve 1, wie-

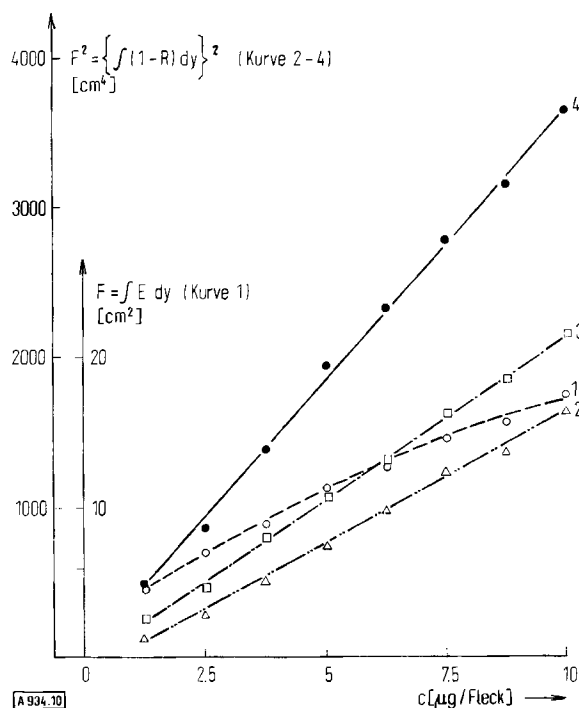


Abb. 10. Eichreihe für Coffein, Absorptionsmessung. Kurve 1: Fluoreszenzminderung bei 254 nm Hg in Transmission, Auswertung über die Fläche in Extinktionseinheiten; Kurve 2: Fluoreszenzminderung bei 254 nm Hg in Remission, Auswertung über das Flächenquadrat; Kurve 3: Remission bei 275 nm, Auswertung über das Flächenquadrat; Kurve 4: gleichzeitige Remission und Fluoreszenzminderung bei 275 nm, Auswertung über das Flächenquadrat.

dergegeben. Dabei ist $\int E \, dy$ für die einzelnen Flecken gegen die Konzentration aufgetragen. Man erkennt auch hier – wie bei Transmissionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich (Abb. 1, Kurve 3) –, daß das Lambert-Beer-Gesetz aufgrund der Streuung keineswegs erfüllt ist: man erhält gekrümmte Eichkurven. Wird hingegen das diffus zurückgestrahlte Fluoreszenzlicht gemessen, so ergibt sich wiederum über das Flächenquadrat eine korrekte Eichgerade (Abb. 10, Kurve 2). Die gestreute Anregungsstrahlung wird dabei durch ein Sekundärfilter abgeschnitten. Wie zu erwarten, bringt die Transmissionsmessung also auch für die Auswertung über die Fluoreszenzminderung gegenüber der Remissionsmessung keinerlei Vorteile. Zu prüfen ist noch, ob die Messung der Fluoreszenzminderung vorteilhaft ist im Vergleich zur Absorptionsmessung in Remission:

Mit der Fluoreszenzminderung erfaßt man lediglich die Absorption der DC-Flecken bei der Wellenlänge der Anregung des Indikators, im allgemeinen 254 nm. Im normalen Fall, für Substanzen, deren Absorptionsmaximum nicht zufällig dieser Wellenlänge entspricht, verliert man deshalb bei der Fluoreszenzminderungsmessung gegenüber der Messung bei der Wellenlänge maximaler Absorption an Empfindlichkeit. Der Effekt sei in Abbildung 11, Kurve 1

bis 4, an einem Arzneimittelgemisch demonstriert, dessen Hauptkomponenten Coffein ($\lambda_{\max}=275\text{ nm}$), Phenacetin ($\lambda_{\max}=250\text{ nm}$) und Salicylamid ($\lambda_{\max}=305\text{ nm}$) sind (Spektren: Abb. 12). Es sind die Remissions-Orts-Kurven, ge-

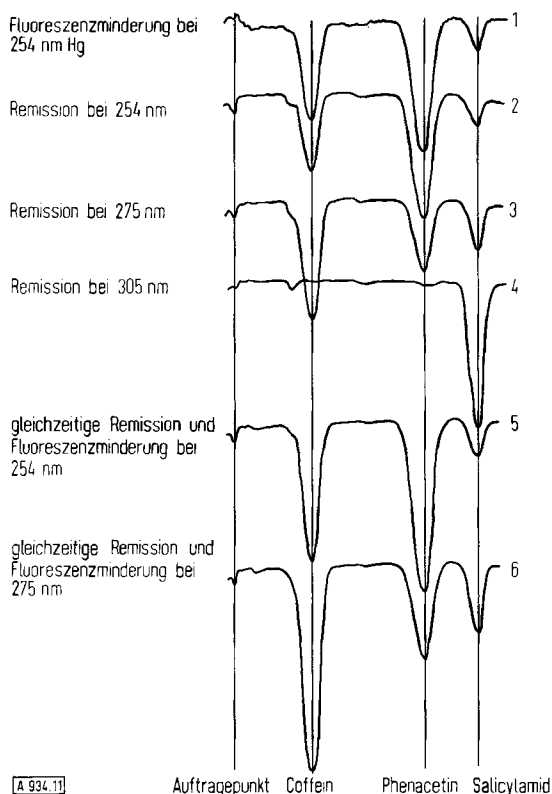


Abb. 11. Absorptions-Orts-Kurven eines Arzneimittelgemisches in Remission, Fluoreszenzminderung sowie gleichzeitiger Remission und Fluoreszenzminderung.

messen bei verschiedenen Wellenlängen, der Ortskurve gegenübergestellt, die durch Messung der Fluoreszenzminderung erhalten wird. Besonders ausgeprägt ist der Empfindlichkeitsverlust für Salicylamid. Der Meßwert beträgt für die Messung der Fluoreszenzminderung mit Anregung bei 254 nm nur ein Sechstel des Wertes, welcher bei der Remissionsmessung im Absorptionsmaximum bei 305 nm registriert wird.

Bestimmungen anhand der Fluoreszenzminderung sind demnach zu vergleichen mit der Messung mit einem Filterphotometer, welches alle farbigen Substanzen nur bei einer Wellenlänge, z. B. bei 365 nm, messen könnte.

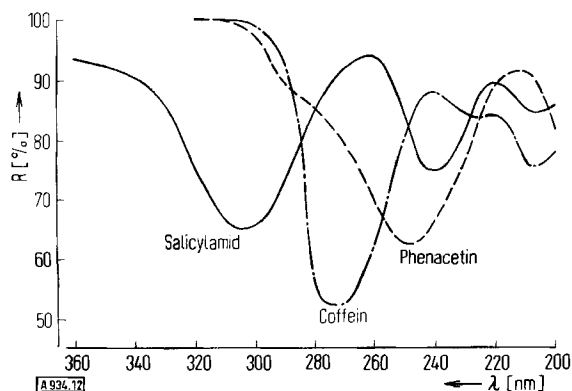


Abb. 12. Remissionsspektren für je 4 µg Coffein, Phenacetin und Salicylamid, bezogen auf Kieselgel.

Wenn auch die Messung der Fluoreszenzminderung als solche keine Vorteile bringt, so werden in der Praxis doch bevorzugt F_{254} -Platten verwendet, weil hier eine visuelle Schnell-Kontrolle der Chromatographie möglich ist. Solche Proben kann man außer mit der eben diskutierten ungünstigeren Fluoreszenzminderungsmethode (Abb. 10, Kurve 1) nach zwei Verfahren quantitativ auswerten:

Zum einen kann man bei polychromatischer Bestrahlung die Remission monochromatisch erfassen. Dabei wird der Meßwert praktisch nicht durch die Fluoreszenz des Indikators beeinflusst. Diese reine Absorptionsmessung in Remission genügt dem Kubelka-Munk-Gesetz und wird – wie schon erläutert – über das Flächenquadrat ausgewertet (Abb. 10, Kurve 3, Abb. 11, Kurve 2–4).

Zum anderen kann man die Platte monochromatisch mit der für die jeweilige Substanz charakteristischen UV-Absorptionswellenlänge bestrahlen. Dieses Licht wird remittiert. Da die F_{254} -Platten nicht nur Fluoreszenz bei Anregung mit 254 nm-Licht zeigen, sondern im gesamten UV-Bereich bis hinab zu ca. 235 nm angeregt werden können, entsteht bei dieser Meßanordnung auch langwellige Fluoreszenzstrahlung, welche ebenfalls auf den Empfänger gelangt. Remittiertes Licht wie Fluoreszenzlicht werden nach dem Gesetz von Kubelka-Munk durch die Absorption im Flecken geschwächt. Da die Absorption in beiden Fällen bei der gleichen Wellenlänge stattfindet, sind die Extinktionskoeffizienten ϵ identisch, die Streukoeffizienten s unterscheiden sich allerdings für die kurzwellige Remissions- und die langwellige Fluoreszenzstrahlung. Darauf ist es zurückzuführen, daß bei der gleichzeitigen Messung der Remission und der Fluoreszenzminderung das Meßsignal gegenüber der reinen Absorptionsmessung in Remission verstärkt ist (Abb. 11, Kurve 5, 6). Theoretisch genügen diese aus Remission und Fluoreszenz zusammengesetzten Meßwerte nicht der Kubelka-Munk-Funktion. Wie die Praxis zeigt, bringt aber auch für diese Meßmethode die Näherung über das Flächenquadrat einwandfreie Eichgeraden (Abb. 10, Kurve 4).

6. Fluoreszenzmessung

Fluoreszierende Substanzen können ebenfalls direkt auf der DC-Platte untersucht werden. Dabei ist genau wie in Lösung bei hinreichend geringer Absorption die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Substanzmenge im Fleck. Man muß nun nicht mehr eine homogene Substanzverteilung voraussetzen und kann die Gesamtfluoreszenz des Flecks auf einmal erfassen^[32]. Dies läßt sich mit einer kreisförmigen Meßfläche erreichen, deren Ausdehnung etwas größer gewählt wird als die zu untersuchenden DC-Flecke.

Die Fluoreszenzintensität genügt in Analogie zur Lösungsfluoreszenzphotometrie dem Gesetz^[13]:

$$I_{fl} \sim I_0(1 - 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d})$$

I_{fl} = Fluoreszenzintensität
 I_0 = eingestrahlte Lichtintensität
 ϵ = Extinktionskoeffizient
 c = Konzentration
 d = wirksame Substanz-Schichtdicke

Für kleine Extinktionen $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ (ungefähr ab $E < 0.02$) läßt sich die obige Gleichung innerhalb der Meßgenauigkeiten annähern^[13,32-35] durch

$$I_{fl} \sim E \sim c$$

Dieser lineare Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration wird in der quantitativen Fluorimetrie verwendet. Die Gültigkeit der Gesetze kann man z. B. an Rhodamin B demonstrieren: Das Anregungsmaximum liegt bei 546 nm Hg, das Emissionsmaximum bei 580 nm. In Abbildung 13 sind für 0.02–4 µg Rhodamin B

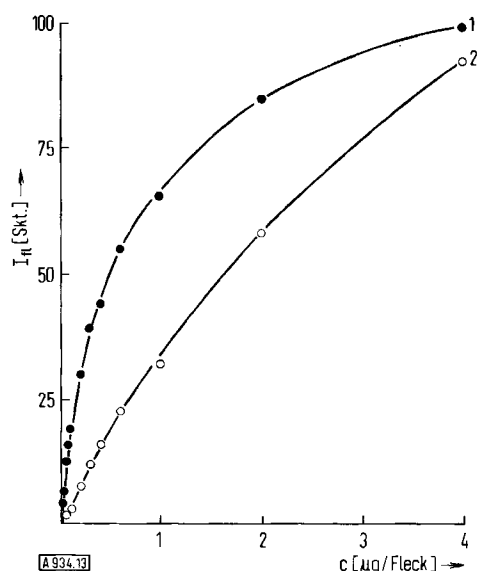


Abb. 13. Eichreihe für große Konzentrationen von Rhodamin B bei Anregung mit 546 und 365 nm Hg, Emission bei 600 nm, kreisförmige Meßfläche.
Kurve 1: Anregung mit 546 nm Hg; Kurve 2: Anregung mit 365 nm Hg.

metrie verwendet. Die Gültigkeit der Gesetze kann man z. B. an Rhodamin B demonstrieren: Das Anregungsmaximum liegt bei 546 nm Hg, das Emissionsmaximum bei 580 nm. In Abbildung 13 sind für 0.02–4 µg Rhodamin B

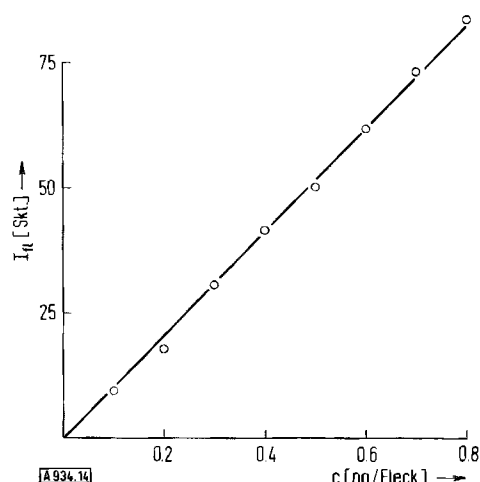


Abb. 14. Eichreihe für kleine Konzentrationen von Rhodamin B bei Anregung mit 546 nm Hg, Emission bei 600 nm, kreisförmige Meßfläche.

Eichkurven für Anregung mit verschiedenen Quecksilber-Linien dargestellt. Bei Anregung mit 546-nm-Licht reicht der lineare Eichbereich bis ca. 0.1 µg pro Fleck. Für 365-nm-

Licht ist der Extinktionskoeffizient und damit auch die Extinktion von Rhodamin B um ca. den Faktor 10 kleiner als bei 546 nm. Dementsprechend ist bei Anregung mit 365 nm die Meßempfindlichkeit um den Faktor 6 geringer, jedoch ist nun bereits bei 1 µg die Extinktion so klein, daß der lineare Zusammenhang bis zu dieser Konzentration gilt. – In der Praxis wird man die kleinere Absorption mit kleinen Konzentrationen verwirklichen. So erhält man z. B. bei Anregung mit 546-nm-Licht für 0.1–0.8 ng Rhodamin B eine ausgezeichnete Eichgerade (Abb. 14). Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10^{-2} ng Rhodamin B (Abb. 15).

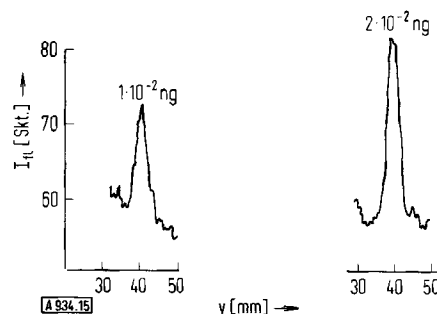


Abb. 15. Nachweisgrenze für Rhodamin B; Fluoreszenzmessung auf Kieselgel-Merck-Fertigplatte. Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser (40:10:50) NS; Laufstrecke 7 cm; Anregung bei 546 nm Hg, Emission bei 590 nm, Meßfläche: 0.3×6 mm².

Die Ortsauflösung bei kreisförmiger Meßfläche ist durch deren Durchmesser begrenzt. Bei sich überlappenden Flecken ist deswegen die Messung mit einem Meßspalt vorzuziehen. In Abbildung 16 ist die Fluoreszenz-Orts-Kurve der Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂ mit einer spalt-

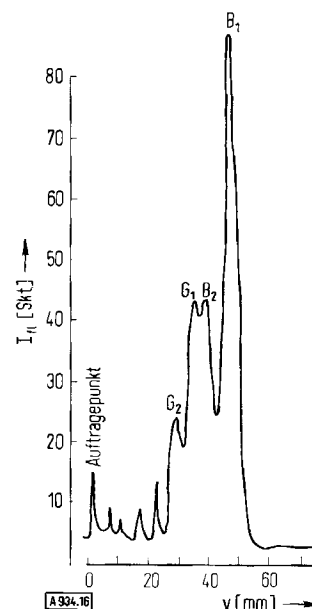


Abb. 16. Fluoreszenz-Orts-Kurve der Aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂; Anregung mit 365 nm Hg, Emission bei 435 nm, spaltförmige Meßfläche.

förmigen Meßfläche registriert. Die quantitative Auswertung muß dann natürlich über die Fläche unter der Kurve durchgeführt werden. Auf diese Weise erhält man die in Abbildung 17 dargestellte Eichgerade für Aflatoxin B₁,

anhand der 1.22 ng Aflatoxin B₁/μl Probenlösung mit einer Genauigkeit von 4% bestimmt werden konnten^[*].

μl Probenlösung	ng Aflatoxin B ₁
3	3.5
5	6.4
8	9.8

Mittelwert (1.22 ± 0.05) ng/μl Probenlösung.

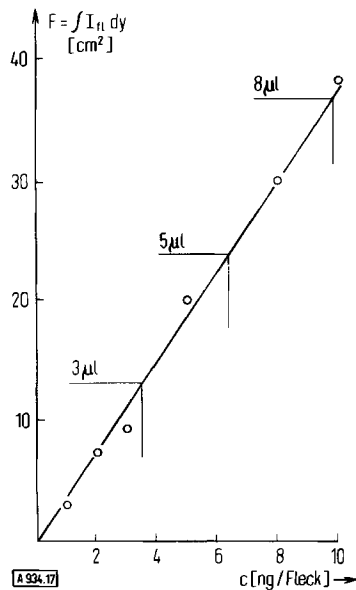


Abb. 17. Eichreihe für Aflatoxin B₁ und Gehalts-Bestimmung einer Probenlösung; Anregung mit 365 nm Hg, Emission bei 435 nm, spaltförmige Meßfläche.

7. Apparatives

Sämtliche Messungen wurden an einem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer in Kombination mit einem Servogor-Schreiber (Metrawatt) oder einem elektronisch integrierenden und logarithmierenden Schreiber W + W 3218 (Kontron) durchgeführt.

Für die Remissionsmessung wird im allgemeinen die folgende Geräteaufstellung gewählt (Abb. 18a): Licht der Wolfram- oder Wasserstoff-Lampe gelangt durch einen Quarz-Monochromator über eine achromatische Abbildungsoptik auf die Probe. Das hier gestreute Licht wird unter 45° mit einem Photomultiplier gemessen. Der Meßwert wird über einen Verstärker auf einem Schreiber registriert. Die spaltförmige Meßfläche wird durch eine 1:1-Abbildung des Monochromatoreintrittspaltes auf die Probe erzeugt. Die Anpassung an die Fleckbreite geschieht am Monochromator durch Einsteckblenden (3.5–14 mm). Die DC-Platte liegt auf einem motorisierten Kreuztisch; damit kann die Chromatogrammbahn an der spaltförmigen Meßfläche vorbeigeführt werden, und man erhält so die Remissions-Orts-Kurve für die quantitative Auswertung. Mit dieser Anordnung sind Remissionsmessungen bis herunter zu $\lambda = 190$ nm möglich.

[*] Herrn Lorenzen, Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt, Bonn, danke ich sehr für die Überlassung der Aflatoxin-Proben.

Für Remissionsmessungen, bei denen man Fluoreszenzen ausschließen will – z. B. eine Eigenfluoreszenz des Flecks oder die Fluoreszenz des Plattenuntergrundes – kehrt man den Strahlengang um (Abb. 18b): Die Probe wird nun polychromatisch bestrahlt, durch den Monochromator gelangt jedoch lediglich Licht der gewünschten Remissionswellenlänge auf den Empfänger. Für Messungen der Fluoreszenzminderung (Abb. 18c) wird der Hg-Mitteldruckbrenner St 41 anstelle der Glühlampe in das Lampengehäuse rechts vom Monochromator eingebaut. Mit dem Monochromator stellt man die Hg-Resonanzlinie bei 254 nm ein. Um die Anregungsstrahlung auszuschalten, wird zwischen Probe und Empfänger ein Sekundärkantenfilter ($\lambda_{\text{Kante}} \approx 460$ nm) eingeschoben.

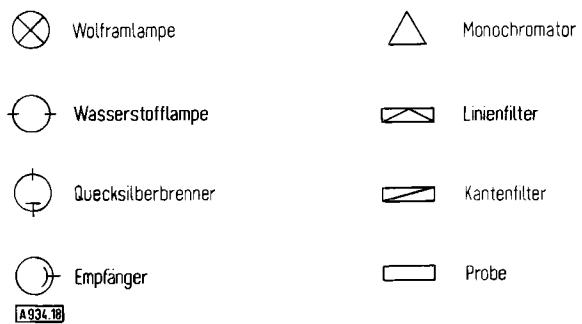
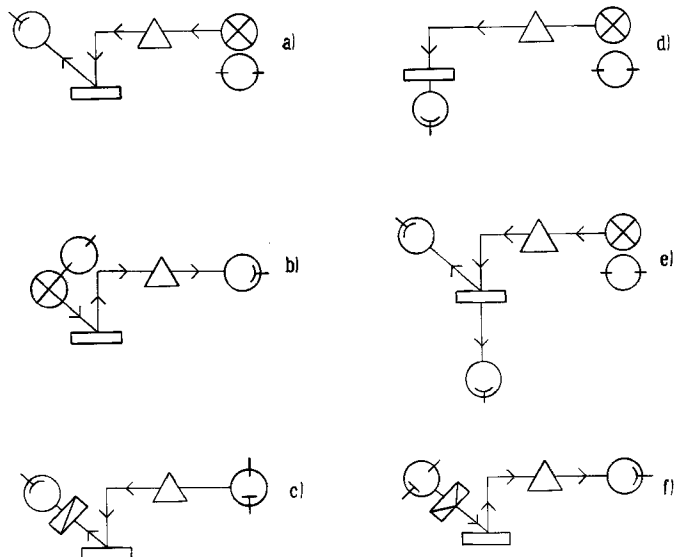


Abb. 18. Die wichtigsten Meßanordnungen des Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometers.

a) Absorptionsmessung in Remission bzw. in gleichzeitiger Remission und Fluoreszenzminderung; b) Absorptionsmessung in Remission bei Störungen durch Fluoreszenz; c) Absorptionsmessung in Fluoreszenzminderung, Anregung bevorzugt bei 254 nm Hg; d) Absorptionsmessung in Transmission; e) Simultane Absorptionsmessung in Remission und Transmission; f) Fluoreszenzmessung bei Anregung mit Hg-Linien.

Zur gleichzeitigen Messung der Remission und Fluoreszenzminderung an F₂₅₄-Platten wird dieselbe Anordnung wie für die normale Remissionsmessung gewählt (Abb. 18a).

Für Transmissionsmessungen wird das Meßobjekt senkrecht von oben beleuchtet, der Empfänger befindet sich unter der Platte (Abb. 18d).

Für simultane Remissions- und Transmissionsmessung wird die Probe ebenfalls senkrecht von oben beleuchtet; das diffus reflektierte Licht wird unter 45°, das Transmissionslicht unter 0° unterhalb der Probe gemessen (Abb. 18e).

Für Fluoreszenzmessungen wird die Probe mit dem Hg-Mitteldruckbrenner St 41 unter 45° bestrahlt (Abb. 18f). Die Quecksilberlinien werden durch Primärfilter ausgewählt. Mit Hilfe der Wechseloptik des Gerätes, kombiniert mit einer Irisblende, erhält man eine kreisförmige Meßfläche, womit die Gesamtfluoreszenz des DC-Flecks direkt integriert gemessen werden kann. Durch den Monochromator gelangt nur die Emissionsstrahlung auf den Empfänger. – Bei schlecht aufgetrennten Flecken verwendet man wegen der besseren Ortsauflösung die spaltförmige Meßfläche.

8. Präparatives

Das Arzneimittelgemisch aus Coffein, Phenacetin und Salicylamid, Sudanrot, Buttergelb sowie Rhodamin B wurden auf Kieselgel-Merck-Fertigplatten chromatographiert. Dabei wurden als Lösungs- und Fließmittel Merck-Uvasole verwendet. Die Aflatoxine wurden auf Kieselgel-Fertigplatten von Macherey und Nagel bestimmt.

Zum Auftragen der Lösungen wurde eine gasdichte 250µl-Spritze (Hamilton) in Kombination mit einer Agla-Mikrometerschraube benutzt.

Herrn Dr. W. Tausch, Oberkochen, danke ich für Diskussionen und sein Interesse bei der Zusammenstellung der Arbeit.

Eingegangen am 8. Juni 1972 [A 934]

[1] W. Keller-Schierlein, H. Zähler, V. Pünter-Sireit u. H. Bär, Biochem. Z. 341, 378 (1965).

[2] R. E. Peterson, A. Ciegler u. H. H. Hall, J. Chromatogr. 27, 304 (1967).

[3] O. L. Shotwell, C. W. Hesseltine, R. D. Stubblefield u. W. G. Sörensen, Appl. Microbiol. 14, 425 (1966).

[4] C. G. Honnegger, Helv. Chim. Acta 45, 2020 (1962).

[5] G. Wagner u. J. Wandel, Pharmazie 21, 105 (1966).

[6] H. Gänshirt u. K. Morianz, Arch. Pharm. (Weinheim) 293, 1065 (1960).

[7] H. Jork, Z. Anal. Chem. 236, 310 (1968).

[8] R. W. Frei in A. Niederwieser u. G. Pataki: Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods. Ann Arbor-Humphrey Science Publ., Ann Arbor 1970.

[9] W. Tausch, Meßtechnik 2, 38 (1972).

[10] E. J. Shellard, Symposiumsber.: Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography. Academic Press, New York 1968.

[11] N. Seiler u. H. Möller, Chromatogr. 2, 273 (1969).

[12] N. Seiler u. H. Möller, Chromatogr. 2, 319 (1969).

[13] N. Seiler u. H. Möller, Chromatogr. 2, 470 (1969).

[14] P. Kubelka u. F. Munk, Z. Tech. Phys. 12, 593 (1931).

[15] P. Kubelka, J. Opt. Soc. Amer. 38, 448, 1067 (1948).

[16] W. M. Wendlandt u. H. G. Hecht, Reflectance Spectroscopy. Wiley-Interscience, New York 1966.

[17] G. Kortüm: Reflexionsspektroskopie. Springer-Verlag, Berlin 1969.

[18] W. Schunack, E. Eich, E. Mutschler u. H. Rochelmeyer, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1756 (1969).

[19] E. Eich, H. Geissler, E. Mutschler u. W. Schunack, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1895 (1969).

[20] H. Zürcher, G. Pataki, J. Borko u. R. W. Frei, J. Chromatogr. 43, 457 (1969).

[21] R. W. Frei, H. Zürcher u. G. Pataki, J. Chromatogr. 45, 284 (1969).

[22] G. Pataki, Chromatogr. 1, 492 (1968).

[23] H. Schilcher, Sci. Pharm. 39, 151 (1971).

[24] H. Jork, Z. Anal. Chem. 221, 17 (1966).

[25] V. Novacek, Amer. Lab. S. 27 (Dez. 1969).

[26] J. C. Touchstone, S. S. Levin u. T. Murawec, Anal. Chem. 43, 858 (1971).

[27] J. Goldmann u. R. R. Goodall, J. Chromatogr. 32, 24 (1968).

[28] H. Jork, Vortrag, DC-Fortbildungstagung der GDCh, Saarbrücken 1971.

[29] L. R. Treiber, R. Nordberg, S. Lindstedt u. P. Stöllnberger, J. Chromatogr. 63, 211 (1971).

[30] W. Tausch, Chimia 23, 17 (1969).

[31] R. W. Frei, A. Kunz, G. Pataki, T. Prims u. H. Zürcher, Anal. Chim. Acta 49, 527 (1970).

[32] R. Klaus, J. Chromatogr. 16, 311 (1964).

[33] H. E. Geissler u. E. Mutschler, J. Chromatogr. 56, 271 (1971).

[34] D. Röder, E. Eich u. E. Mutschler, Pharm. Ztg. 115, 1430 (1970).

[35] P. L. Schuller, C. A. H. Verhülsdonk u. W. E. Paulsch, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 1517 (1970).