

EINIGE KRITISCHE BETRACHTUNGEN ZUR PHOTOMETRISCHEN AUSWERTUNG VON DÜNNSCHICHTPLATTEN

R. KLAUS

Kontroll-Laboratorium der Firma E. Merck AG, Darmstadt (Deutschland)*

(Eingegangen den 4. März 1964)

Mit der fortschreitenden Anwendung der Dünnschichtchromatographie als routinemässigem Analysenverfahren taucht immer wieder die Frage der photometrischen Auswertung auf. Wir bemühen uns daher seit einigen Monaten, geeignete Methoden sowohl für angefärbte als auch für fluoreszierende Dünnschichtchromatogramme zu finden. Neuerdings wurden die Untersuchungen auf fluoreszierende Platten mit Kieselgel HF 254 ausgedehnt.

Wir liessen uns bei den Versuchen von dem Gedanken leiten, die uns zur Verfügung stehenden Geräte ohne wesentliche Eingriffe in ihren Aufbau auf ihre eventuelle Verwendung zu prüfen. In Frage kamen hierfür Remissionsmessungen mit einem lichtelektrischen Remissionsmessgerät der Firma Zeiss, Durchlässigkeits- einschliesslich Extinktions- bzw. Fluoreszenzmessungen mit einem Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss und letztlich Durchlässigkeitsmessungen mit einem Spektrenauswertgerät der Optischen Werke, Jena. Letzteres konnte in die Untersuchungen bisher noch nicht einbezogen werden, da uns die hierzu erforderliche Optik zur Vergrösserung des Gesichtsfeldes noch nicht zur Verfügung steht.

DURCHLÄSSIGKEITSMESSUNGEN VON PLATTEN MIT ANGEFÄRBTEN FLECKEN

Auf Grund der Erfahrungen, die wir bei den Untersuchungen zur Auswertung fluoreszierender Papierchromatogramme¹ mit dem Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss gemacht haben, versuchten wir zunächst, dieses zur Photometrierung von Platten mit angefärbten Flecken heranzuziehen.

Versuchsanordnung

Die Versuchsanordnung ist aus Fig. 1 und 2 zu ersehen. Die zu analysierende Platte steht in einem vertikalen Rahmen zwischen Leuchte und Monochromator. Dieser Rahmen kann mit Hilfe der Schraube S_1 in vertikaler Richtung bewegt werden. Der Motor M transportiert über die Kupplung K die Platte in horizontaler Richtung senkrecht zu der optischen Achse. Mit Schraube S_2 der Kupplung kann diese Bewegung von Hand ausgeführt werden. Zur Photometrierung der zu analysierenden Flecke wird die Lage der Platte durch Drehen der Schraube S_1 so weit verändert, dass erstere sich in Höhe der optischen Achse befinden. Durch Einschalten des automatischen Platten-vorschubes werden die Flecke an einem Vorspalt vorbeibewegt. Ein an das Anzeige-

* Direktor: Prof. Dr. K. G. KREBS.

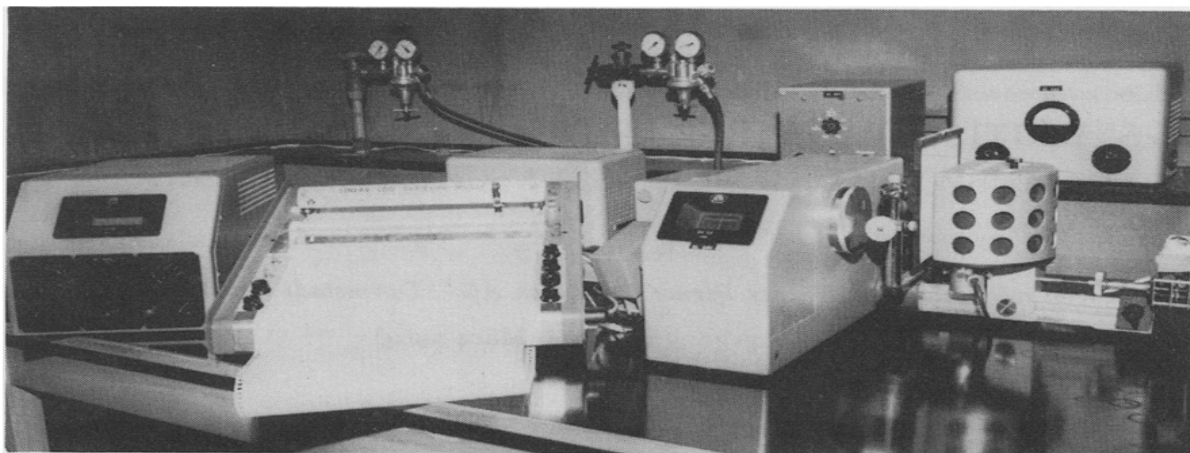


Fig. 1. Gesamtansicht der Messanordnung für Durchlässigkeits- bzw. Extinktionsmessungen.

gerät angeschlossener Kompensationsschreiber registriert die der jeweiligen Zone zuzuschreibenden Messwerte.

Beziehungen zwischen Fleckform und photometrischen Grössen bei Durchlässigkeitsmessungen

Bei der visuellen Auswertung von Dünnschichtplatten beobachtet man u. U., dass der Fleck der zu bestimmenden Komponente gegenüber den Vergleichsflecken mehr oder weniger deformiert ist. Wir versuchten daher, zunächst auf rechnerischem Wege den Einfluss der Fleckform auf das Messergebnis zu klären, und insbesondere den durch eine zusätzliche Deformation des Analysenflecks möglichen Fehler abzuschätzen. Wir be-

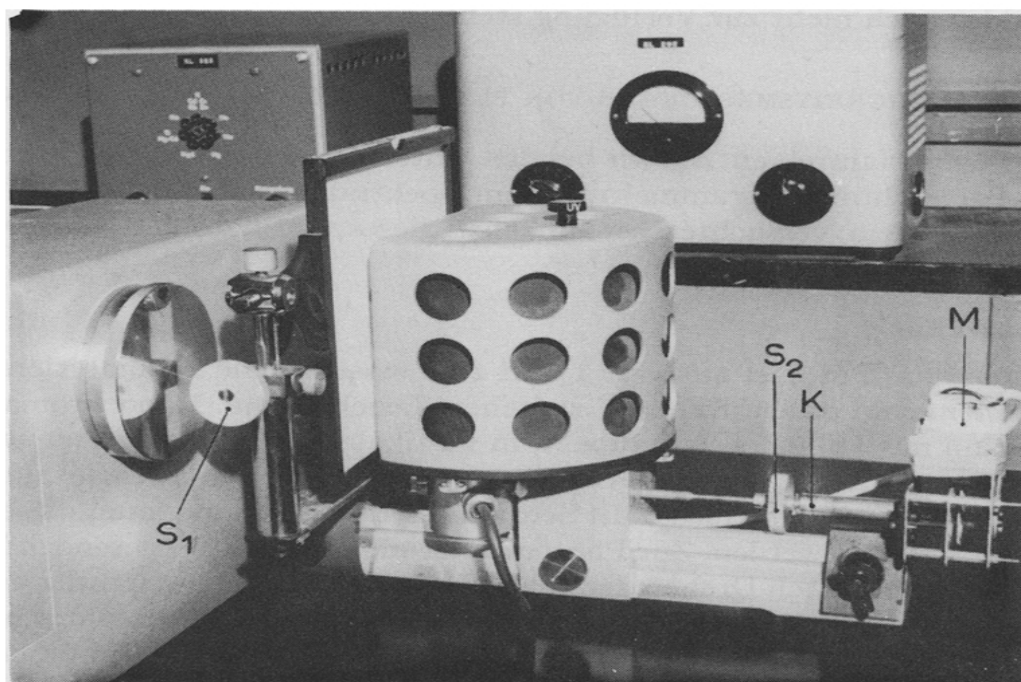


Fig. 2. Zusatzeinrichtung für Durchlässigkeits- bzw. Extinktionsmessungen.

handelten bewusst die Analyse unter Berücksichtigung der angedeuteten Deformation als Allgemeinfall, der den Sonderfall einer nicht auftretenden Deformation einschliesst.

Geht man von einer konstanten Messfläche f aus (Fig. 3), auf der sich ein Fleck

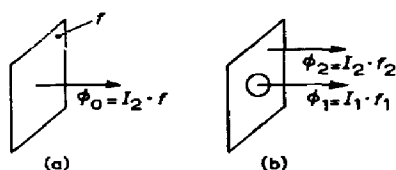


Fig. 3. Messfläche f . (a) Ohne Fleck. (b) Mit Fleck.

beliebiger Grösse aber konstanter Farbdichte befindet, so lässt sich unter Berücksichtigung der von den einzelnen Zonen durchgelassenen Lichtströme ϕ eine Aussage über die Gesamtdurchlässigkeit $D_{\lambda\Sigma}$ von f bei einer vorgegebenen Wellenlänge λ machen:

$$D_{\lambda\Sigma} = \frac{\phi_1 + \phi_2}{\phi_0} \quad \text{mit} \quad \begin{aligned} \phi_0 &= I_2 \cdot f \\ \phi_1 &= I_1 \cdot f_1 \\ \phi_2 &= I_2 \cdot f_2 \\ f &= f_1 + f_2 \end{aligned}$$

wobei I_1 und I_2 die jeweiligen durchgelassenen Intensitäten bedeuten (Fig. 3).

Setzt man diese Grössen in die Gleichung für $D_{\lambda\Sigma}$ ein, so erhält man nach einigen Umformungen folgende Beziehung:

$$D_{\lambda\Sigma} = 1 - \frac{f_1}{f} (1 - D_\lambda)$$

$D_{\lambda\Sigma}$ bedeutet hierbei die der gesamten Fläche f zuzuschreibende Durchlässigkeit bezogen auf eine gleich grosse Stelle der Platte ohne Fleck (= 100 %), $D_\lambda = I_1/I_0$ ist die Durchlässigkeit des homogen angenommenen Fleckes ebenfalls auf die gleiche Plattenstelle bezogen.

Variiert man in dieser Gleichung f_1 mit D_λ als Parameter, so erhält man den in Fig. 4 wiedergegebenen Zusammenhang $D_{\lambda\Sigma} = \text{Funkt.}(f_1)$. Aus dieser so ermittelten Kurvenschar lassen sich nun die Bedingungen ableiten, unter denen sich für verschiedene Flecke die gleichen Gesamtdurchlässigkeiten ergeben.

Der Mehrdeutigkeit der Funktion entsprechend bestimmt man für $D_{\lambda\Sigma} = \text{konst.}$ die jeweiligen Wertepaare f_1 und D_λ und trägt D_λ in Abhängigkeit von f_1 graphisch

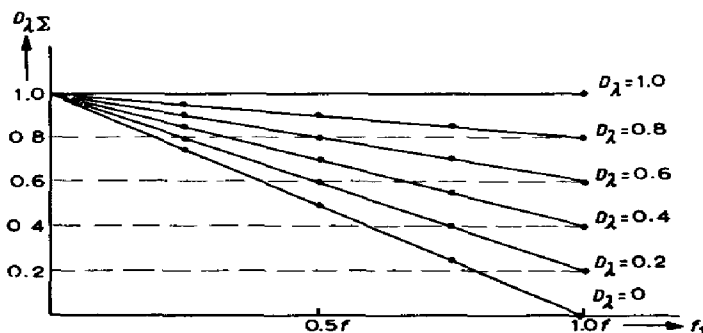


Fig. 4. Abhängigkeit der Gesamtdurchlässigkeit $D_{\lambda\Sigma}$ von der Fleckfläche f_1 mit D_λ als Parameter.

auf. Fig. 5 zeigt diese Kurven für drei von uns angenommene Werte $D_{\lambda\Sigma}$. Die der Forderung $D_{\lambda\Sigma} = \text{konst.}$ genügenden Durchlässigkeiten D_{λ} nehmen mit abnehmender Fleckgrösse sehr stark ab und nähern sich bei einer von der jeweiligen, vorgegebenen Durchlässigkeit $D_{\lambda\Sigma}$ abhängenden Fläche f_1 dem Wert 0.

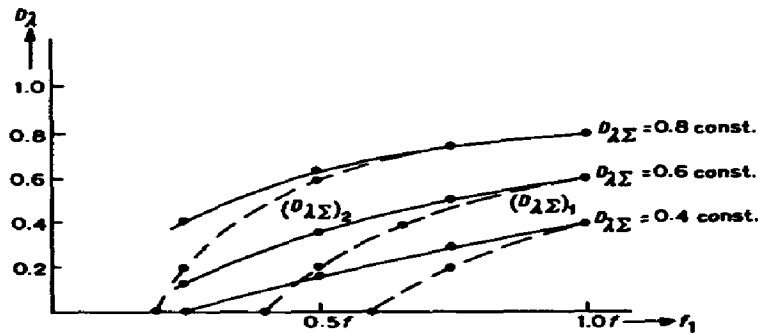


Fig. 5. ----- Fleckdurchlässigkeiten D_{λ} als Funktion von f_1 für $D_{\lambda\Sigma} = \text{konst.}$ ——— Fleckdurchlässigkeiten D_{λ} bei jeweils konstant aufgetragenen Substanzmengen als Funktion von f_1 und einer angenommenen Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes.

Während die einleitend untersuchte Funktion einen Zusammenhang herstellt zwischen den einzelnen, die Gesamtdurchlässigkeit der Messfläche bestimmenden Faktoren, sollen die folgenden Untersuchungen über das Verhalten der Grössen $D_{\lambda\Sigma}$, f_1 und D_{λ} bei Veränderung der Fleckbelegung und einer angenommenen Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes Aufschluss geben. Ausgangspunkt der Überlegungen ist ein Fleck, dessen Gesamtdurchlässigkeit $D_{\lambda\Sigma}$ bei der Fleckgrösse von $f_1 = f$, $(D_{\lambda\Sigma})_1$ betragen soll. Setzt man, wie bereits erwähnt, die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes voraus, so müsste bei einer Verkleinerung der Fleckgrösse von $f_1 = f$ auf $f_1 = 1/2 f$ bei konstant aufgetragener Substanzmenge entsprechend der auf das Doppelte gesteigerten Belegung die Extinktion E "im Fleck" sich verdoppeln. Die der Extinktion E zuzuordnende Grösse D_{λ} wird in $D_{\lambda\Sigma}$ eingesetzt: man erhält die Gesamtdurchlässigkeit des Fleckes $(D_{\lambda\Sigma})_2$. Führt man eine analoge Überlegung mit weiteren Wertepaaren durch, so folgt hieraus die in Fig. 5 durchgezogene gezeichnete Kurvenschar. Gegenüber den nach der Gleichung $D_{\lambda\Sigma} = 1 - f_1 (1 - D_{\lambda})/f = \text{konst.}$ ermittelten Kurven ergeben sich, wie Fig. 5 zeigt, zum Teil erhebliche Abweichungen, die bereits eine Abhängigkeit des Messwertes von der Fleckgrösse erkennen lassen.

Die Zusammenhänge werden deutlicher, wenn man wie in Fig. 6 die Abhängigkeit der für drei angenommene Konzentrationen C_1 , C_2 und C_3 erhaltenen Gesamtdurch-

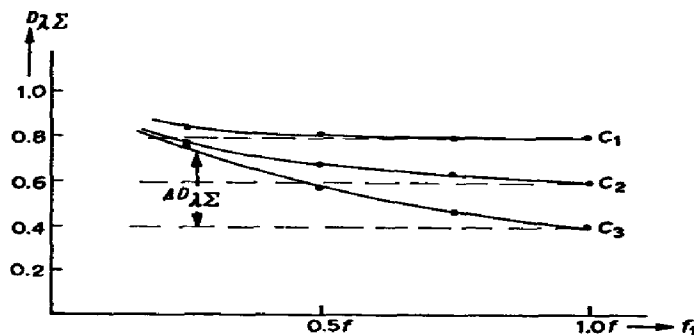


Fig. 6. Definition der Grösse $\Delta D_{\lambda\Sigma}$; Abhängigkeit von f_1 und aufgetragener Substanzmenge.

lässigkeiten $D_{\lambda x}$ von der Fleckgrösse unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes graphisch aufträgt. Errechnet man nun die Durchlässigkeitsdifferenzen zwischen den so erhaltenen Kurven und den entsprechenden Isotransmittances, so gibt diese Grösse $\Delta D_{\lambda x}$ eine Antwort auf die eingangs gestellte Frage.

Trägt man bei einer chromatographischen Analyse steigende Mengen der Eichsubstanz auf, so nehmen Farbdichte und je nach der angewandten Arbeitstechnik auch die Fleckgrösse mehr oder weniger zu. Hieraus ergibt sich, wie aus Fig. 6 zu ersehen ist, dass sich die Grösse $\Delta D_{\lambda x}$, der die Bedeutung einer methodischen Abweichung zukommt, mit steigender Konzentration laufend verändert, was zu einer Verzerrung der Eichkurve führt. Beim Auftragen konstanter Volumina ist diese nur konzentrationsbedingt. Treten sekundäre Veränderungen des Analysenflecks nicht ein, so ergibt eine unter diesem Gesichtspunkt durchgeführte Analyse daher ein durchaus brauchbares Ergebnis. Trägt man dagegen zum Erstellen der Eichkurve steigende Volumina auf, so tritt eine von dem jeweiligen Volumen abhängige Beeinflussung der Messwerte ein, die eine quantitative Bestimmung fraglich werden lässt.

Darüberhinaus führt, wie bereits angedeutet, eine durch sekundäre Einflüsse hervorgerufene Deformierung des Analysenflecks zu einer Verfälschung des Messergebnisses, die um so grösser ist, je kleiner das Verhältnis f_1/f und je grösser die Farbdichte des Fleckes ist.

Fasst man die im vorstehenden gemachten Ausführungen zusammen, so lassen sich für Durchlässigkeits- bzw. Extinktionsmessungen folgende günstigste Analysenbedingungen angeben:

- (a) Fleckausdehnung gross;
- (b) Durchlässigkeit D_{λ} im Fleck gross;
- (c) Deformation des Fleckes gering.

Das Einhalten dieser Bedingungen dürfte bei vielen Analysen aber nur schwer durchzuführen sein. Für diese Fälle weisen wir auf die beiden folgenden Korrekturmöglichkeiten hin:

(a) Im Falle annähernd linear verlaufender Eichkurven kann die Zusatzmethode mit nachfolgender Extrapolation angewendet werden.

(b) Eine gute Annäherung dürfte auch der nach der Gleichung $C = C_0 \cdot \Delta / \Delta'$ berechnete Wert ergeben. C_0 bedeutet hierbei den aus der Standardkurve abgelesenen Wert, Δ ein bekannter Zusatz zur Analysensubstanz, Δ' der aus der Eichkurve ermittelte Zusatz.

Versuche mit Testflecken

Von einigen unter Benutzung eines Extinktionsschreibers durchgeführten Versuchen mit Testflecken sei nun im folgenden berichtet:

Fig. 7 zeigt ein photographisches Positiv einer mit einer Fuchsinlösung hergestellten Testreihe (a). Die Auftropftechnik wurde dabei so gewählt, dass mit steigender

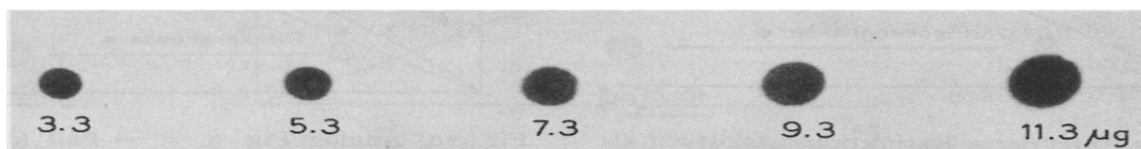


Fig. 7. Fuchsin – Testreihe (a).

aufgetropfter Substanzmenge die Fleckgrösse ebenfalls zunimmt. Nach Planimetrierung der Extinktionsortskurven (Fig. 8) erhält man den im Fig. 9 graphisch dargestellten Zusammenhang (Fall a).

Parallel hierzu wurde eine weitere Testreihe (b) mit demselben Konzentrationsbereich untersucht. Die Versuchsbedingungen wurden aber so abgeändert, dass die Ausdehnung der Testflecke konstant und ausserdem dem grössten Fleck der Reihe (a)

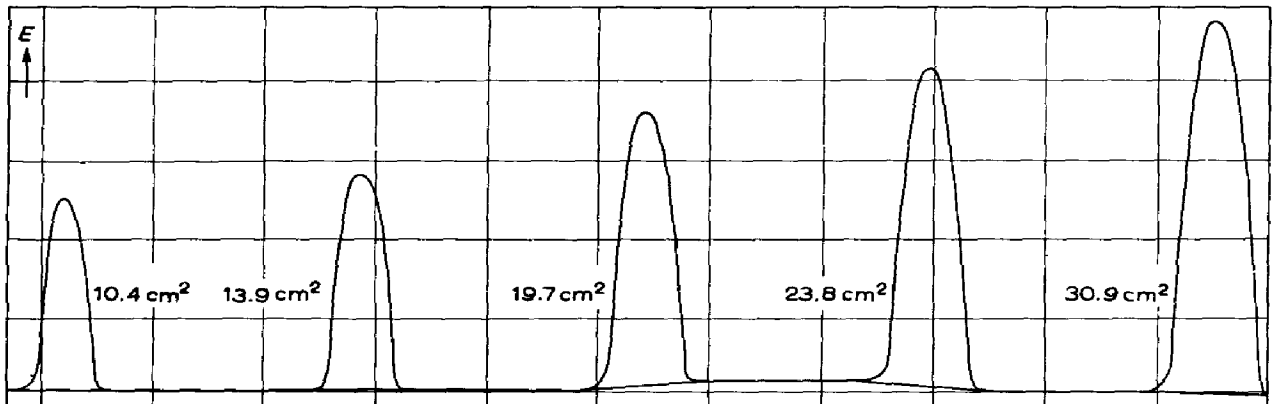


Fig. 8. Extinktionsortskurven der in Fig. 7 dargestellten Testreihe.

flächengleich sind. Die aus der Reihe (b) resultierende Kurve (Fig. 9) liefert nun erheblich höhere Extinktionsintegrale. Dies kann als eine Bestätigung der bereits abgeleiteten Beziehungen zwischen Fleckform und Messwert angesehen werden.

Mit zwei weiteren Testreihen wurden analoge Untersuchungen in einem gegenüber (a) bzw. (b) verkleinerten Konzentrationsbereich angestellt. Während bei Reihe (c) die Flecke wieder eine konstante Grösse hatten (flächengleich mit b), nahm diese bei Reihe (d) mit steigender Konzentration (analog a) zu. Es bestand also wieder Flächengleichheit der Flecke (c) mit dem grössten Fleck (d). Die Messergebnisse sind in Fig. 10 festgehalten. Auch hier zeigt sich ein dem Fig. 9 entsprechendes Verhalten.

Es liegt nun nahe, die Kurven (c) und (d) in (a) und (b) einzuordnen. Während sich die Werte der Flecke mit konstanter Ausdehnung zu einer gemeinsamen Kurve zusammenfassen lassen, ist eine Kombination der Kurven (a) und (d) nicht möglich.

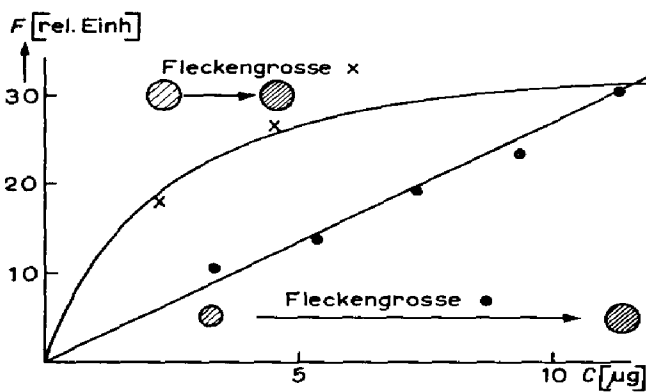


Fig. 9. Integrierte Extinktionsortskurven als Funktion der aufgetragenen Substanzmenge, ● = Fall (a), × = Fall (b).

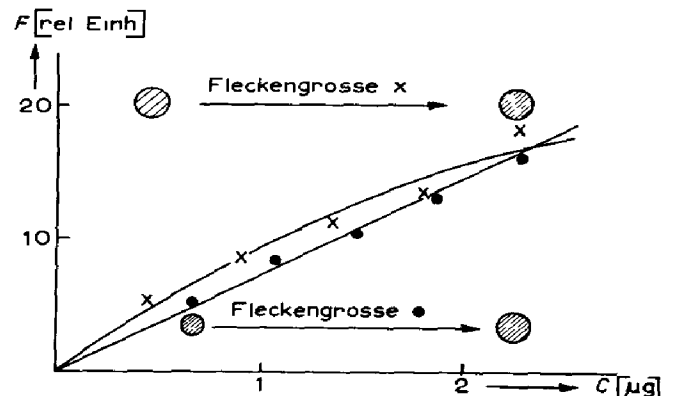


Fig. 10. Analog Fig. 9, × = Fall (c), ● = Fall (d).

Die bereits definierte Abweichung $\Delta D_{\lambda\Sigma}$ des höchsten Konzentrationspunktes der Reihe (d) unterscheidet sich von dem des niedrigsten Punktes der Reihe (a) beträchtlich. Die in den beiden Bildern dargestellten Versuchsreihen bestätigen aber die Aussage, dass der Einfluss der Fleckform auf das Messergebnis um so geringer wird, je geringer die Farbdichte im Fleck, d. h. je grösser D_{λ} ist.

VERSUCH ZUR AUSWERTUNG DURCH REMISSIONSMESSUNGEN

Wie einleitend angedeutet, versuchten wir, neben dem bereits beschriebenen Verfahren die Remissionsmethode auf ihre Brauchbarkeit zur Auswertung von Dünnschichtplatten mit angefärbten Flecken zu prüfen.

Der experimentelle Teil der Arbeiten wurde mit einem lichtelektrischen Remissionsphotometer der Firma Zeiss durchgeführt. Um eine Beschädigung der Schichtseite, die beim Anlegen der Platte an die Messöffnung entstehen kann, zu vermeiden, wurde die Platte zuvor mit Neatan besprüht.

Auch hier hielten wir es für angebracht, zunächst die Frage nach der Abhängigkeit des Messwertes von der Fleckform als primär zu klären.

Der Gesamtremissionsgrad eines festgelegten Flächenelementes f mit einem Fleck der Ausdehnung f_1 und Remissionsgrad R_{λ} (bezogen auf eine Plattenblindstelle) errechnet sich:

$$R_{\lambda\Sigma} = 1 - \frac{f_1}{f} (1 - R_{\lambda})$$

Die Diskussion dieser Gleichung, auf die im einzelnen hier nicht eingegangen werden soll, führt nun zu einem den Durchlässigkeitsuntersuchungen analogen Ergebnis. Wir beschränken uns deshalb darauf, von den in diesem Zusammenhang durchgeführten Messreihen auf eine charakteristische hinzuweisen.

Fig. 11 zeigt die Abhängigkeit einer durch die Gleichung $1/h = R_{0\lambda\Sigma}/R_{\lambda\Sigma}$ definierten Grösse von dem aufgetragenen Volumen und damit indirekt auch von der Fläche f_1 bei konstanter Substanzmenge (Fuchsin). Mit wachsender Fleckausdehnung nimmt der Gesamtremissionsgrad $R_{\lambda\Sigma}$ laufend ab, d. h. der Wert von $1/h$ zu.

Dies steht vollkommen im Einklang zu der bei den Durchlässigkeitsmessungen gefundenen Abhängigkeit $D_{\lambda\Sigma} = \text{Funktion}(f_1)_{C=\text{konst.}}$.

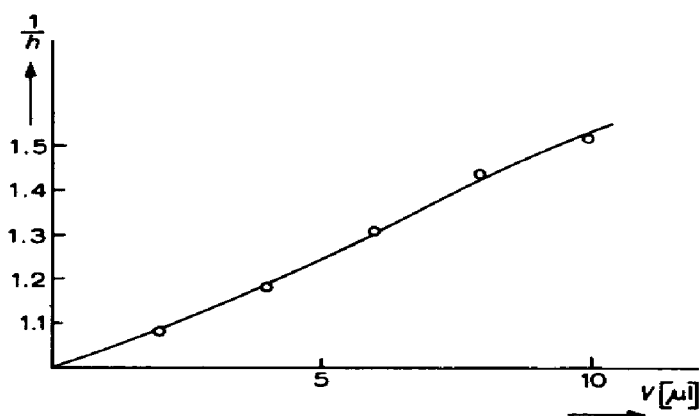


Fig. 11. Abhängigkeit der Grösse $1/h$ von dem aufgetragenen Volumen bei konstanter Substanzmenge.

Die quantitative Beurteilung einer auf einer Dünnschichtplatte aufgetragenen Messreihe verlangt daher auch bei dieser Methode im Falle einer unerwünschten Deformation des zu analysierenden Flecks die Anwendung zusätzlicher Korrekturverfahren.

AUSWERTUNG VON PLATTEN MIT FLUORESIZIERENDEN FLECKEN

Versuchsordnung

Die Versuche zur photometrischen Auswertung von fluoreszierenden Flecken wurden ebenfalls mit einem Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss durchgeführt. Ausgehend von der Tatsache, dass der Umlenkspiegel des Lampengehäuses in dem Monochromator abgebildet wird², änderten wir die in Fig. 2 gezeigte Zusatzeinrichtung derart ab, dass die Dünnschichtplatte an den Ort des Umlenkspiegels gebracht wird.

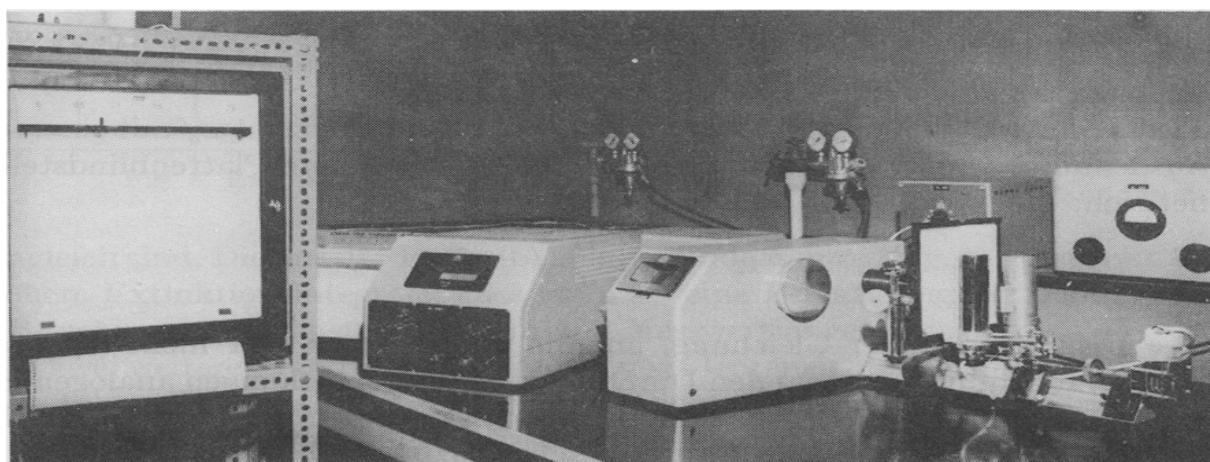


Fig. 12. Gesamtansicht der Messanordnung für Fluoreszenzmessungen.

Zur Anregung bestrahlen zwei HgS-Lampen unter einem Winkel von 45° zur Plattenormalen den auf die optische Achse justierten Fleck. Als Flächenbegrenzung kann vor der Platte wahlweise eine Spalt- oder Kreisblende montiert werden, deren Abmessungen der Größe des Umlenkspiegels angepasst sein müssen. Fluoreszierende Flecke mit dem Umlenkspiegel überschreitende Größenverhältnisse können mit einer Zwischenabbildung ausgewertet werden. Der Plattenvorschub wird wieder von dem Motor M durchgeführt. Die Registrierung der Fluoreszenzintensitäten erfolgt mit einem an das Anzeigegerät angeschlossenen Kompensationsschreiber. Fig. 12 zeigt die gesamte Messanordnung, Fig. 13 die Zusatzeinrichtung.

Zusammenhang zwischen photometrischen Größen und Fleckparametern

Der bei entsprechender Bestrahlung von einer fluoreszierenden Fläche in der Zeiteinheit ausgesandte Lichtstrom errechnet sich aus der Gleichung:

$$\phi = J \cdot \omega$$

Hierbei bedeuten J die Strahlungsstärke des Senders und ω den Raumwinkel in

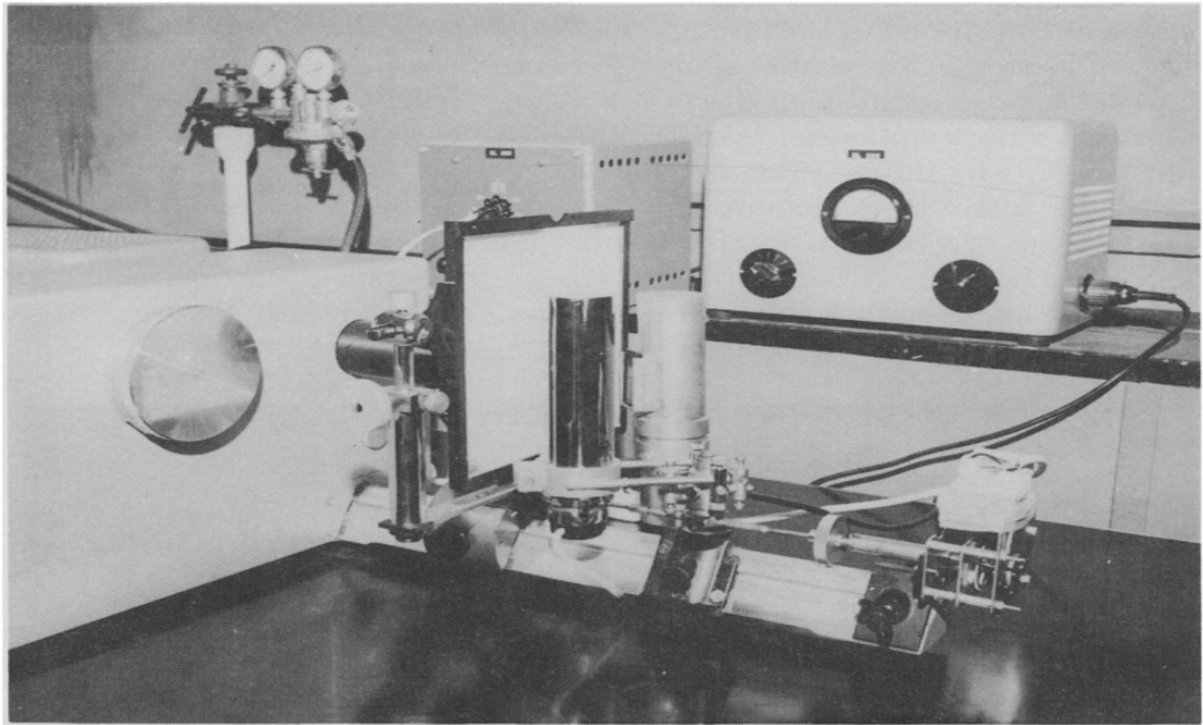


Fig. 13. Zusatzeinrichtung für Fluoreszenzmessungen.

den die Ausstrahlung stattfindet. Geht man nun von konstanten geometrischen Abbildungsverhältnissen aus, so ist $\omega = \text{konst.}$ (k_1) für verschiedene Flecke, d. h.

$$\phi_\lambda = k_1 \cdot J = s_\lambda \cdot f_1 \cdot k_1 \cdot k_2$$

k_2 bedeutet hier eine dem Emergenzwinkel proportionale Grösse, f_1 Fläche, s_λ Strahlungsdichte des Senders. Zwischen dem ausgesandten Lichtstrom ϕ_λ und dem am Photometer abgelesenen Fluoreszenzwert F_λ besteht andererseits die Beziehung:

$$F_\lambda = k_3 \cdot \phi_\lambda$$

Bringt man beide Gleichungen zueinander in Beziehung, so erhält man schliesslich:

$$F_\lambda = k \cdot s_\lambda \cdot f_1$$

Da es sich bei chromatographischen Analysen jeweils um Messungen mit Vergleichsflecken handelt, ist die Kenntnis der absoluten Grösse der Werte k nicht erforderlich. Somit lässt sich folgende Beziehung aufstellen:

$$F_\lambda \sim s_\lambda \cdot f_1$$

Dieser Ausdruck verbindet die photometrischen Grössen F_λ und s_λ mit der Fläche f_1 und führt zu den beiden Sonderfällen:

$$(a) s_\lambda = \text{konst.} \rightarrow F_\lambda \sim f_1$$

$$(b) f_1 = \text{konst.} \rightarrow F_\lambda \sim s_\lambda$$

In beiden Fällen ergibt die Rechnung einen linearen Zusammenhang zwischen dem Messwert und der jeweiligen unabhängig Veränderlichen.

Zur Prüfung der Richtigkeit dieser Aussagen, vornehmlich aber zur Abschätzung der Grenzen der in (b) aufgestellten Beziehung in Verbindung mit der aufgetragenen Substanzmenge, sei auf die beiden folgenden Versuche hingewiesen:

Ausgehend von der Beziehung $F \sim s_\lambda \cdot f_1$ wurde bei dem ersten Versuch $s_\lambda = \text{konst.}$ gesetzt und f_1 variiert durch Veränderung der aufgetragenen Volumina. Wie bereits in einer früheren Arbeit berichtet wurde, ergab sich erwartungsgemäss in gewissen Grenzen ein linearer Zusammenhang zwischen gemessener Fluoreszenzintensität F_λ und Fläche f_1 .

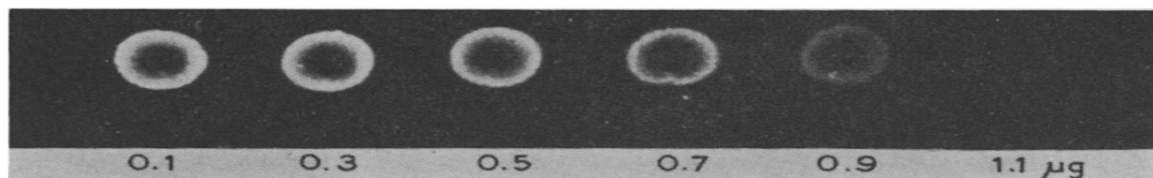


Fig. 14. Fluorescein-Na - Testreihe.

Der zweite Versuch, der anschliessend beschrieben wird, geht von einer konstanten Fläche f_1 aus, bei Variation von s_λ . Man erhält diese Testreihe, indem man konstante Volumina verschieden konzentrierter Substanzlösungen (in diesem Falle Fluorescein-Na) aufträgt. Fig. 14 zeigt ein photographisches Positiv des betreffenden Plattenausschnittes.

Die Registrierung der fluoreszierenden Flecke wurde nach zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Im ersten Fall wurde mit einer Spaltblende als Vorspalt vor der Dünnschichtplatte gearbeitet. Diese Technik hat den Nachteil, dass die Gesamtfluoreszenz jedes Fleckes erst durch Integration der Fluoreszenzortskurven (die so erhaltene Grösse sei mit $F_{\lambda x}$ bezeichnet) erhalten wird.

Fig. 15 zeigt die registrierten Fluoreszenzortskurven, Fig. 16 Kurve \times die integrierten Fluoreszenzortskurven in Abhängigkeit von der Konzentration.

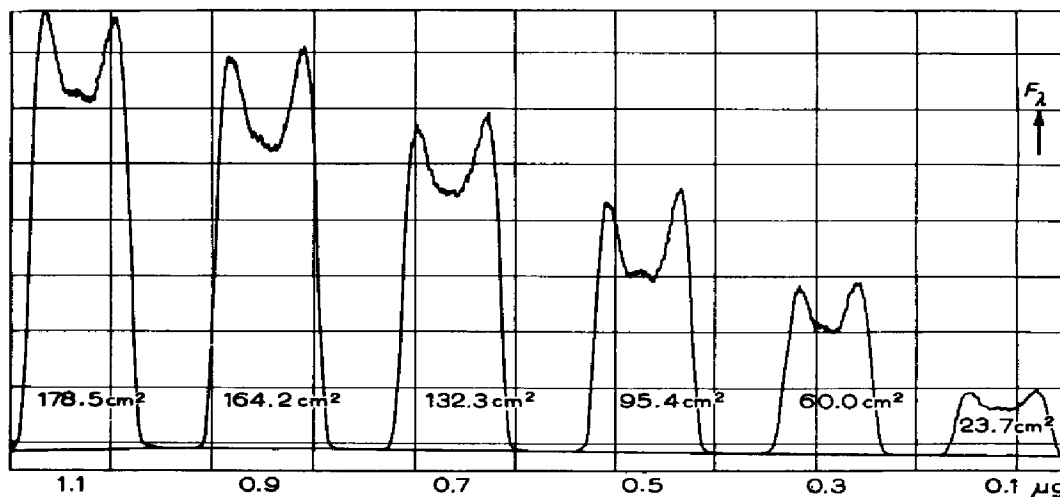


Fig. 15. Mit Spaltblende aufgenommene Fluoreszenzortskurven der Testreihe von Fig. 14.

Für die zweite Möglichkeit der Auswertung wurde eine Kreisblende, die den eingangs erwähnten Bedingungen genügt, gewählt. Die Peakhöhe ist hier ein direktes Mass für die der Gesamtfläche zuzuschreibenden Fluoreszenz.

Fig. 17 zeigt die registrierten Fluoreszenzkurven, Fig. 16 Kurve ● die Abhängigkeit der Peakhöhe von der aufgetragenen Substanzhöhe.

Ein Vergleich der beiden in Fig. 16 dargestellten Kurven lässt eine nur relativ geringe Abweichung erkennen. Bei grösseren Konzentrationen ($\sim 1 \mu\text{g}$) zeichnet sich

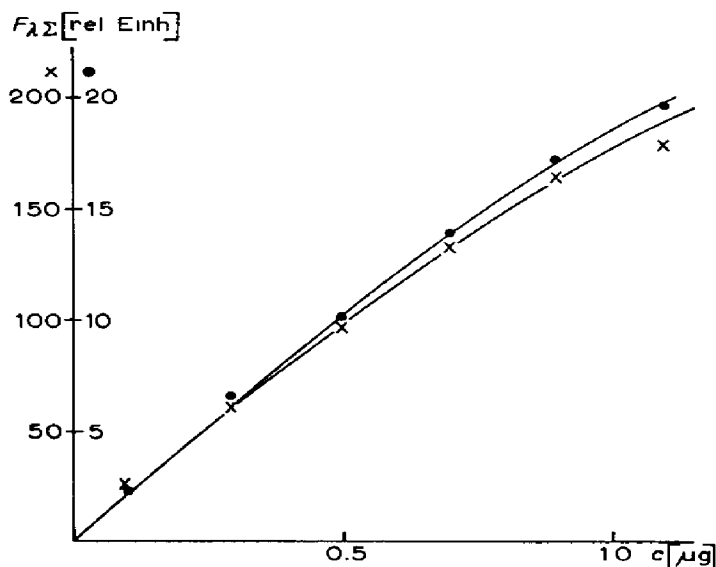


Fig. 16. Gesamtfluoreszenz $F_{\lambda\sigma}$ als Funktion der aufgetragenen Substanzmenge C (Fluorescein-Na)
 ● = Registrierung mit Kreisblende, x = Registrierung mit Spaltblende.

eine beginnende konkave Krümmung der Kurven ab, die auf eine Veränderung der Eindringtiefe der anregenden Strahlung bei zu grossen Flächenbelegungen zurückzuführen sein dürfte.

Die bei diesem Versuch zu klärende Frage nach der Abhängigkeit der Gesamtfluoreszenz von der Leuchtdichte s_λ unter Berücksichtigung der aufgetragenen Substanzmenge bei konstanter Fläche f_1 kann somit wie folgt beantwortet werden:

Für *nicht zu grosse Konzentrationen* besteht zwischen der gemessenen Fluoreszenz und der Konzentration ein angenähert linearer Zusammenhang. Dies weist aber andererseits, da $f_1 = \text{konst.}$, auf eine lineare Abhängigkeit zwischen der Konzentration und der Leuchtdichte s_λ hin.

Fasst man die in den beiden Versuchen erhaltenen Ergebnisse zusammen, so ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der gemessenen Gesamtfluoreszenz von der aufgetragenen Substanzmenge einerseits bei konstanter Leuchtdichte, andererseits bei konstanter Fläche aber nicht zu grossen Leuchtdichten. Mit diesen Aussagen lässt sich nun die auch hier interessierende Frage nach dem Zusammenhang zwischen Fleckform und Messergebnis beantworten. Eine durch sekundäre Einflüsse hervorgerufene Deformation des Fleckes dürfte unter normalen Bedingungen das Messergebnis nicht beeinflussen, zusätzliche Korrekturen sind demnach im allgemeinen nicht erforderlich.

Die Gültigkeit dieser Aussagen wird durch den im Fig. 18 angedeuteten Versuch mit mehreren Fluorescein-Na-Testflecken bestätigt.

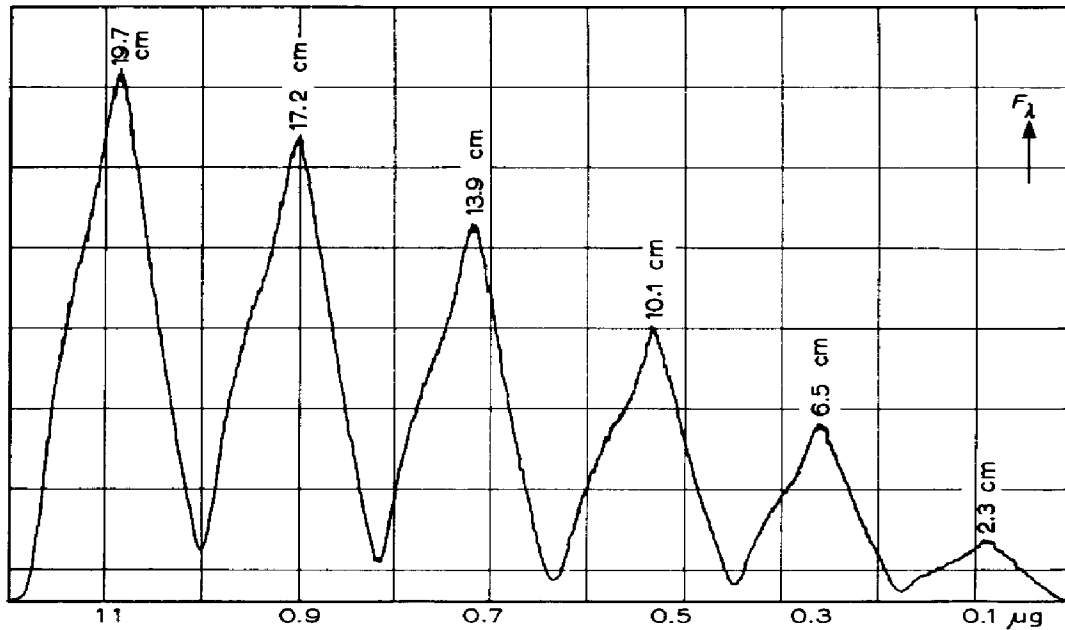


Fig. 17. Mit Kreisblende aufgenommene Fluoreszenzkurven der Testreihe von Fig. 14.

Im folgende sei nun ein Fluoreszenzversuch beschrieben, der einerseits die Vorteile der photometrischen Auswertung zeigt, andererseits aber auch die Mängel erkennen lässt, die der Vorbereitung der Platte zum Teil noch anhaften.

Auf einer Dünnschichtplatte wurde die zu analysierende Substanz (St 155) einschliesslich steigender Mengen der Vergleichssubstanz aufgetragen und entsprechend behandelt. Das Zustandekommen der Fluoreszenz verlangt nun in diesem Falle, dass man die Platte kurzzeitig einer höheren Temperatur (*ca.* 120°) aussetzt. Die auf diese Weise erhaltenen fluoreszierenden Flecke wurden mit der beschriebenen Anordnung (unter Verwendung der Kreisblende) registriert (Fig. 19) und durch Messung der Peakhöhe ausgewertet.

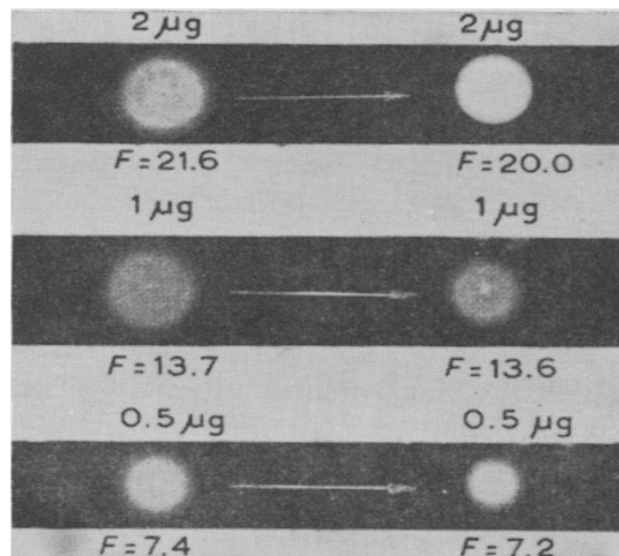


Fig. 18. Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Fleckfläche bei drei verschiedenen aufgetragenen Mengen Fluorescein-Na.

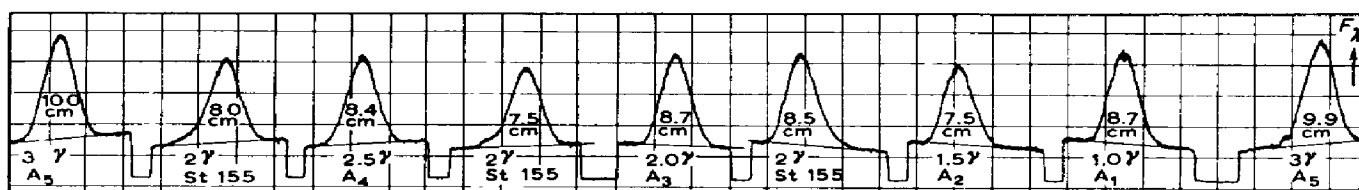


Fig. 19. Fluoreszenzkurven einer Testsubstanz einschliesslich Vergleiche A_1 – A_5 .

Für die zu analysierende Substanz, die dreimal aufgetragen wurde, ergaben sich Peakhöhen von 8.5 cm/7.5 cm/8.0 cm, also Werte mit nicht unbeachtlichen Streuungen. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Vergleichsflecken A_1 – A_5 . Die Streuungen, wahrscheinlich hervorgerufen durch eine nicht konstante Temperaturverteilung im Heizraum, lassen hier sogar das Aufstellen einer Eichkurve nicht ratsam erscheinen. Zur Reproduzierbarkeitsprüfung wurde der Vergleichsfleck mit der höchsten Konzentration (A_5) mehrere Male ausgewertet. Aus den beiden im Bild ersichtlichen Fluoreszenzkurven lassen sich Peakhöhen von 9.9 cm bzw. 10.0 cm ersehen.

Wenn auch bei der Mehrzahl der chromatographischen Analysen aufgrund einer einfacher zu kontrollierenden Plattenbehandlung mit geringeren Streuungen gerechnet werden kann, so sollten diese dennoch nicht unberücksichtigt bleiben.

Der Vorteil der photometrischen Auswertung besteht nun gerade darin, dass, in Gegensatz zu der visuellen Beurteilung, die Flecke in ihrer Gesamtheit für das Endergebnis bestimmend sind, sei es durch Mittelbildung der Messwerte der zu analysierenden Flecke oder durch die Festlegung einer aus den einzelnen streuenden Standardwerten ermittelten Eichkurve.

AUSWERTUNG VON DÜNNSCHICHTPLATTEN BEI VERWENDUNG VON KIESELGEL HF 254 ALS SCHICHTMATERIAL

In zunehmendem Masse finden in letzter Zeit Leuchtstoffplatten Anwendung, die unter dem Einfluss kurzweiliger U.V.-Strahlung, in diesem Falle der Hg-Linien $\lambda \sim 254$ nm, eine grüngelbe Fluoreszenz ergeben³. Trägt man auf die Platte nun Substanzen auf, die im Bereich $\lambda \sim 254$ nm zwar eine Absorption aufweisen, diese aber nicht in eine Fluoreszenzstrahlung transformieren, so resultiert hieraus eine Verringerung der Fluoreszenz des Leuchtstoffes am Ort des absorbierenden Stoffes.

Die von uns durchgeführten Versuche sollten auch hier klären, welcher Zusammenhang zwischen der Messgrösse einerseits und aufgetragener Substanzmenge andererseits besteht und im besonderen welche Bedeutung hierbei der jeweiligen Fleckgrösse zukommt. Hierüber sei im folgenden berichtet.

Versuchsordnung

Es wurde mit der in Fig. 13 beschriebenen Versuchsanordnung unter Verwendung einer Kreisblende gearbeitet. Die Anregung erfolgte durch die beiden HgS-Lampen mit entsprechenden Filtern UG 5 der Firma Schott und Gen, Mainz.

Messungen von Testflecken

Fig. 20 zeigt drei willkürlich angenommene Testflächen, auf denen die Substanzmengen C_0 (= 0), C_1 und C_2 aufgetragen sein sollen. Ordnet man diesen Testflächen die

Gesamtfluoreszenzen $F_{0\Sigma}$, $F_{1\Sigma}$ und $F_{2\Sigma}$ zu, so wäre eine fallende Charakteristik zu erwarten. Errechnet man dagegen aus den Werten $F_{C\Sigma}$ die auf die Fläche mit $C = 0$ bezogene Fluoreszenzverminderung, indem man die Differenzen

$$\Delta F_{1\Sigma} = F_{0\Sigma} - F_{1\Sigma}$$

$$\Delta F_{2\Sigma} = F_{0\Sigma} - F_{2\Sigma}$$

bildet, so erhält man für die Funktion $\Delta F_{C\Sigma} = \text{Funkt. } (C)$ mit C steigende Werte für $\Delta F_{C\Sigma}$.

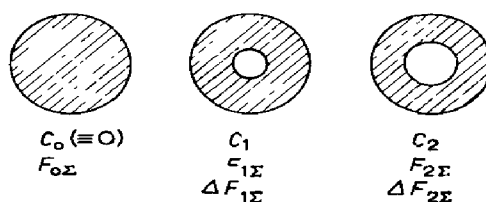


Fig. 20. Testflächen zur Definition der Grösse $\Delta F_{C\Sigma}$.

In den folgenden Untersuchungen wird die so definierte Grösse $\Delta F_{C\Sigma}$ als für die Analyse charakteristische Grösse eingesetzt. Es wurden die beiden folgenden Testreihen hergestellt:

Bei Reihe (a) wurden steigende Volumina einer Coffein-Standardlösung derart aufgetragen, dass Flecke mit $1-10 \mu\text{g}$ Coffein entstanden. Die mit Substanz belegten Zonen nahmen bei diesem Versuch mit wachsender aufgetragener Menge zu.

Bei dem Versuch (b) wurden konstante Volumina von Coffeinelösungen steigender Konzentration ebenfalls im Bereich $1-10 \mu\text{g}$ aufgetragen. Es bildeten sich mit Coffein belegte Zonen annähernd konstanter Ausdehnung. Die Fleckgrösse entsprach dabei etwa dem grössten Fleck der Reihe (a). Die Fig. 21 und 22 zeigen die registrierten Fluoreszenzkurven der beiden Testreihen.

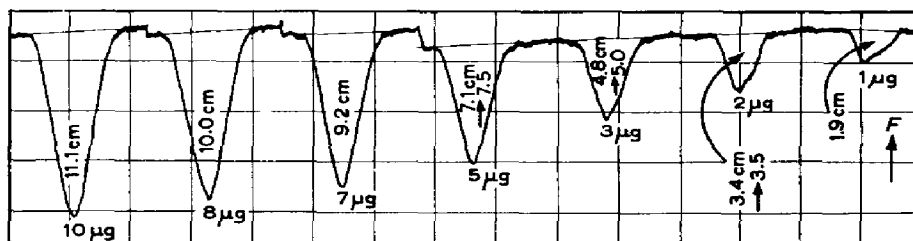


Fig. 21. Mit Kreisblende registrierte Fluoreszenzkurven von steigend aufgetragenen Coffeinmengen. Versuch (a), zunehmende Fleckgrösse.

Auf Fig. 21 ist für die im Bereich $1-5 \mu\text{g}$ liegenden Peaks deutlich der nicht konstante Untergrund, d. h. in diesem Falle der Fluoreszenzintensität $F_{0\Sigma}$ zu erkennen. Zur Vermeidung rechnerischer Untergrundkorrekturen ist daher gegebenenfalls eine Veränderung einer der Geräteparameter derart erforderlich, dass sich jeweils konstante Werte $F_{0\Sigma}$ ergeben. Die aus den Messergebnissen resultierenden Kurven zeigt Fig. 23.

Während für den Punkt $C = 10 \mu\text{g}$ für beide Reihen entsprechend der übereinstimmenden Fleckgrösse die gleiche Fluoreszenzverminderung $\Delta F_{C\Sigma}$ ermittelt wurde, ergaben sich für $C < 10 \mu\text{g}$ nicht unerhebliche Differenzen.

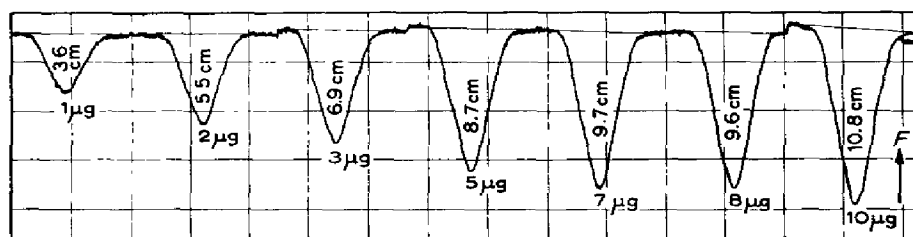


Fig. 22. Analog Fig. 21. Versuch (b), annähernd konstante Fleckgröße.

Es zeichnet sich ein, wenn auch nicht in diesem Ausmass, dem im Kapitel angefarbte Dünnschichtplatten entsprechender Sachverhalt ab: mit abnehmender Fleckgröße verringert sich bei jeweils konstant aufgetragenen Substanzmengen der Wert der Fluoreszenzverminderung.

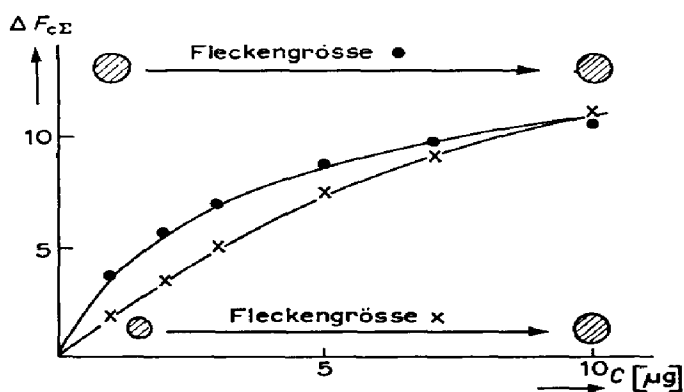


Fig. 23. Zusammenhang zwischen Fluoreszenzverminderung und aufgetragener Substanzmenge (Coffein) bei: (a) steigender Fleckgröße, ×; (b) konstanter Fleckgröße, ●.

ZUSAMMENFASSUNG

In den vorstehenden Ausführungen werden die Versuche beschrieben, welche zur photometrischen Auswertung von angefarbten bzw. fluoreszierenden Dünnschichtplatten nach verschiedenen Methoden angestellt wurden.

Ferner wird die Beeinflussung des Messwertes von der jeweiligen Fleckform sowohl rechnerisch als auch experimentell behandelt und insbesondere auf eine Verfälschung des Analyseergebnisses bei Nichtbeachtung von zusätzlich auftretenden Fleckdeformationen hingewiesen. Es werden zwei mögliche Korrekturverfahren erwähnt, über die gesondert zu einem späteren Zeitpunkt berichtet werden soll.

SUMMARY

A description is given of the photometric evaluation of coloured and fluorescent spots on thin-layer plates and of the different methods employed.

The influence of the actual shape of the spot on the values obtained is examined, both experimentally and mathematically. It is pointed out that erroneous results can be obtained by disregarding deformation of the spots. Two possible correction procedures are mentioned, but these will be reported separately at a later date.

LITERATUR

- ¹ W. ESSELBORN UND R. KLAUS, *Pharm. Ztg.*, 105 (1960) 34.
- ² G. ZEISS, *Gerätebeschreibung zum Spektralphotometer PMQ II.*
- ³ E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer, Berlin, 1962, S. 57; *Präparate Merck für die Dünnschicht-Chromatographie nach Stahl*, E. Merck AG, 1962.

J. Chromatog., 16 (1964) 311-326