

KONZENTRATIONS-BESTIMMUNG MIT HILFE DER U.V.-REMISSION VON DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE-FLECKEN

WALTER HUBER

Analytische Laboratorien der J. R. Geigy A.G., Basel (Schweiz)

SUMMARY

Determination of the concentration by means of U.V. remission of spots on thin-layer chromatograms

The reproducibility of the photometric evaluation of spots on thin-layer chromatograms for the determination of the concentration of substances was investigated. The remission of some U.V.-absorbing test substances was measured at a wavelength of 254 nm.

The deviation of the remission value on one plate, on plates of the same series and on plates of different series was determined.

A calibration curve obtained for one series of measurements can be used for later measurements if calibration values at two different concentrations are determined again. When using plates that have not been specially selected, the relative standard deviation with which the concentration can then be determined from the remission value—at not too low concentrations—is on an average 10%.

In the cases investigated, it was found that for low concentrations measurement of the remission value of the centre of the spot gives the most accurate results, while for medium concentrations about the same accuracy is obtained when the remission values over the whole spot are averaged.

The thickness and density of the silica gel layer primarily affect the ascension rate of the solvent front and consequently the spread of the spot in the direction of flow. Only a very slight influence of the thickness of the layer on the remission value could be detected, since several effects compensate each other.

I. EINLEITUNG

Bis jetzt sind nur wenige Untersuchungen veröffentlicht worden, aus denen hervorgeht, mit welcher Genauigkeit die Konzentration von chromatographierten Substanzen aus der Lichtremission auf der Dünnschichtplatte ermittelt werden kann¹⁻³. JORK² gibt an, dass eine Konzentrationsbestimmung mit einer relativen Standardabweichung von 3-4% möglich ist.

Um abzuklären, inwieweit das Resultat einer Eichmessung für die Auswertung eines anderen Chromatogrammes übernommen werden kann, und wie genau sich Eichkurven reproduzieren lassen, wurden die Messungen durchgeführt, über die hier

berichtet wird. Zu diesem Zweck wurden die Abweichungen der Remissionswerte des Substanzfleckes auf verschiedenen Bahnen einer Platte, auf verschiedenen Platten einer Herstellungsserie und auf Platten mit verschiedenen Herstellungsdaten ermittelt.

Da es schwierig ist, das absolute Remissionsvermögen bei der für die Messung verwendeten Wellenlänge von 254 nm zu bestimmen, wurde darauf verzichtet, die Eichkurven (Abhängigkeit der Lichtremission von der aufgetragenen Substanzmenge m , bzw. von der Konzentration der Substanz in der aufgetragenen Lösung) durch eine Funktion nach KUBELKA und MUNK zu beschreiben, wie dies von JORK^{1,2} getan wurde. Sie wurden vielmehr durch eine empirische Kurve mit zwei Parametern angepasst. Für die Auswertung wurde die relative Remission R benützt. R ist der beim Abtasten der Platte erreichte minimale Photometeraussschlag A_{\min} bezogen auf den Ausschlag A_0 , den die leere Platte ergibt: $R = A_{\min}/A_0$.

Als Testsubstanzen wurden 2-(Methylthio)-4,6-bis(isopropylamino)-s-triazin (Prometryn, Aktivsubstanz des Herbizids Gesagard[®], Geigy), Acetanilid und N,N'-(4,4'-Dichlor-3-trifluormethyl-diphenyl)-harnstoff (Irgasan CF₃[®], Geigy) verwendet. Die Lichtabsorption dieser Substanzen liegt im kürzerwelligen U.V.-Bereich. Das Absorptionsmaximum von Prometryn in Methanol-Lösung liegt bei der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 222$ nm (molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{\max} = 4.33 \cdot 10^4$, $\epsilon_{254 \text{ nm}} = 0.62 \cdot 10^4$), das Absorptionsmaximum von Acetanilid in Methanol-Lösung bei $\lambda_{\max} = 241$ nm ($\epsilon_{\max} = 1.56 \cdot 10^4$, $\epsilon_{254 \text{ nm}} = 0.88 \cdot 10^4$) und das Absorptionsmaximum von Irgasan CF₃ bei $\lambda_{\max} = 265$ nm ($\epsilon_{\max} = 4.72 \cdot 10^4$, $\epsilon_{254 \text{ nm}} = 3.00 \cdot 10^4$).

2. UNTERSCHIEDE DES REMISSIONSWERTES BEI GLEICHBLEIBENDER SUBSTANZKONZENTRATION

In der ersten Versuchsserie wurde auf allen Platten und allen Bahnen die gleiche Menge m von 5 μg Prometryn aufgetragen.

Die mittlere Schwächung ($1-\bar{R}$) der Remission und die ermittelten Standardabweichungen der Remissionswerte R sind in der Tabelle I wiedergegeben. Die Streuung zwischen den Mittelwerten von R über die einzelnen Plattenserien (Standardabweichung s_s), wurde aus 5 Serien ermittelt. Die Streuung zwischen den Mittelwerten über die einzelnen Platten innerhalb einer Serie (Standardabweichung s_p) wurde aus 15 Platten von 2 Serien bestimmt. Die einem Gang folgenden Abweichungen der Werte auf verschiedenen Bahnen innerhalb der Platten (Standardabweichung s_b) und die unregelmässige Reststreuung (Standardabweichung s_r), wurden aus einer Serie von 10 Platten errechnet. Es zeigte sich, dass der Gang nicht allen Platten der gleichen Serie gemeinsam ist, sondern für jede Platte einzeln bestimmt werden muss. Mit s_0 ist auch die auf Grund der unterschiedlichen Körnung der Schicht auftretende relative Schwankung des Remissionsvermögens der leeren Platte angegeben.

Durch Überlagern der einzelnen Streuungen ergeben sich die Streuungen des R -Wertes (Standardabweichung s_R), die zu erwarten sind, (1) zwischen benachbarten Bahnen, (2) zwischen nicht benachbarten Bahnen der gleichen Platte, (3) zwischen verschiedenen Platten der gleichen Serie und (4) zwischen Platten aus verschiedenen Herstellungsserien. Mit Hilfe der im nächsten Abschnitt besprochenen Eichkurven kann aus s_R berechnet werden, mit welchen Standardabweichungen s_m für die aus R ermittelten Substanzmenge m in den einzelnen Fällen zu rechnen ist. Wie aus den Werten von s_m/m der Tabelle I hervorgeht, ist im vorliegenden Fall die Genauigkeit,

TABELLE I

STREUUNG DES REMISSIONSWERTES R BEI PROMETRYN (AUFGETRAGENE MENGE $m = 5 \mu\text{g}$). ZU ERWARTENDE STANDARDABWEICHUNGEN DES REMISSIONSWERTES (s_R) UND DER AUS R ERMITTELTEN MENGE (s_m)

Lichtfleck	13 mm breit	2 mm breit		
Mittelwert, $1 - \bar{R}$	0.195	0.379		
<i>Gemessene Standardabweichungen</i>				
der Remission des Plattenuntergrundes, s_0	0.002	0.006		
der Mittelwert von R über verschiedene Serien, s_s	0.019	0.024		
der Mittelwert von R über Platten einer Serie, s_p	0.013 ₅	0.013		
der einem Gang folgenden Abweichung von R innerhalb einer Platte, s_b	0.005 ₅	0.007		
der Reststreuung von R , s_r	0.009 ₅	0.007 ₅		
	s_R	s_m/m (%)	s_R	s_m/m (%)
<i>Berechnete Standardabweichungen von R</i>				
(1) zwischen benachbarten Bahnen	0.009 ₅	9.5	0.007 ₅	5
(2) innerhalb einer Platte	0.011	11	0.010	6
(3) zwischen Platten der gleichen Serie	0.017	17	0.016 ₅	10
(4) zwischen Platten verschiedener Serien	0.026	25	0.029	17

mit der m bestimmt werden kann grösser, wenn mit einem Lichtfleck gemessen wird, der nur über die Mitte des Substanzfleckes streicht, als bei der Messung mit einem breiten Lichtfleck.

3. REPRODUZIERBARKEIT DER EICKURVEN UND ABWEICHUNGEN DER REMISSIONSWERTE VON DEN EICKURVEN

Um die Konzentrationsabhängigkeit von R zu bestimmen, wurden Substanzmengen m im Bereich von $0.1 \mu\text{g}$ bis $5 \mu\text{g}$ auf die Platten aufgetragen. Der Zusammenhang zwischen R und m wurde durch den empirischen Ansatz (1) ausgedrückt

$$1 - R = r_1 \ln \left(1 + \frac{m}{m_0} \right) + r_2 \left[\ln \left(1 + \frac{m}{m_0} \right) \right]^2 \quad (1)$$

Mit diesem Ansatz wurde berücksichtigt, dass $1 - R$ für kleine m proportional zu m ansteigt, und in einem gewissen mittleren Bereich sich linear mit dem Logarithmus von m ändert. Der Wert m_0 wurde so gewählt, dass in erster Näherung der Zusammenhang zwischen R und m durch die Konstante r_1 charakterisiert wird:

$1 - R \approx r_1 \ln (1 + m/m_0)$. m_0 wurde in allen Fällen gleich $0.3 \mu\text{g}$ gesetzt.

In der Tabelle II sind die Ergebnisse der Messung mit dem 2 mm breiten Lichtfleck wiedergegeben. Die Mittelwerte der Konstanten r_1 und r_2 sind in der Tabelle rechts aufgeführt. Ihre Streuung (Standardabweichungen s_{r_1} und s_{r_2}) von Platte zu Platte ist recht gross. Es besteht allerdings eine gewisse Korrelation zwischen den Änderungen von r_1 und von r_2 . Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Änderungen ist durch den Regressionskoeffizienten $\Delta r_2 / \Delta r_1$ wiedergegeben. Wird diese

Korrelation berücksichtigt, so wird die Unsicherheit von r_2 , bei festgelegtem r_1 , durch die Standardabweichung s'_{r_2} charakterisiert.

Die Standardabweichungen s_R bzw. s_m , die links in der Tabelle II für die verschiedenen Substanzmengen m aufgeführt sind, geben die statistischen Abweichungen der Remissionswerte R von der Eichkurve, bzw. die daraus sich ergebende Unsicherheit der Bestimmung von m aus R wieder, falls für jede Platte beide Parameter r_1 und r_2 angepasst werden. Die Anpassung der beiden Parameter kann durch Eichmessungen mit zwei verschiedenen Substanzkonzentrationen auf jeder Platte vorgenommen werden. Die erreichbare relative Genauigkeit (s_m/m) nimmt ab, je geringer

TABELLE II

STREUUNG DER REMISSIONSWERTE R UM DIE EICHKURVE (STANDARDABWEICHUNG s_R) UND DARAUF BERUHENDE UNGENAUIGKEIT DER BESTIMMUNG DER SUBSTANZMENGE m (STANDARDABWEICHUNG s_m) BEI DEN SUBSTANZEN PROMETRYN, ACETANILID UND IRGASAN CF_3 FÜR VERSCHIEDENE m (EICHKURVE FÜR JEDE PLATTE ANGEPASST). KONSTANTEN r_1 UND r_2 DER EICHKURVEN UND DEREN STANDARDABWEICHUNGEN ZWISCHEN VERSCHIEDENEN PLATTEN

m (μg)		0.10	0.46	1.16	2.48	5.00	$I - R = r_1 \ln \left(I + \frac{m}{m_0} \right) + r_2 \left[\ln \left(I + \frac{m}{m_0} \right) \right]^2$			
Prometryn	$1 - \bar{R}$	0.029	0.107	0.204	0.305	0.380	$\bar{r}_1 =$	0.096 ₅	$\bar{r}_2 =$	0.014 ₅
	s_R	0.007 ₅	0.008	0.011	0.012	0.012	$s_{r_1} =$	0.046 ₃	$s_{r_2} =$	0.013
	s_m/m (%)	26	11	10	8	7	$\frac{\Delta r_2}{\Delta r_1} =$	-0.26	$s'_{r_2} =$	0.003 ₅
Acetanilid	$1 - \bar{R}$	0.018	0.074	0.152	0.236	0.318	$\bar{r}_1 =$	0.072 ₅	$\bar{r}_2 =$	0.014 ₅
	s_R	0.005	0.012	0.016	0.015	0.014	$s_{r_1} =$	0.037	$s_{r_2} =$	0.014
	s_m/m (%)	28	20	17	12	9	$\frac{\Delta r_2}{\Delta r_1} =$	-0.36	$s'_{r_2} =$	0.004 ₅
Irgasan CF_3	$1 - \bar{R}$	0.029	0.095	0.168	0.277	0.363	$\bar{r}_1 =$	0.091	$\bar{r}_2 =$	0.013
	s_R	0.009	0.009	0.013	0.023	0.023	$s_{r_1} =$	0.024	$s_{r_2} =$	0.009
	s_m/m (%)	32	13	12	18	14	$\frac{\Delta r_2}{\Delta r_1} =$	-0.40	$s'_{r_2} =$	0.004

die Substanzmenge ist. Die Bestimmungen mit dem 13 mm breiten Lichtfleck sind für die untersuchten Konzentrationen um den Faktor 1.3 bis 1.8 ungenauer.

Wird die Eichmessung nur für eine Konzentration durchgeführt, so können r_1 und r_2 mit Hilfe der angegebenen Werte von \bar{r}_1 , \bar{r}_2 und $\Delta r_2/\Delta r_1$ ausgerechnet werden. Es ergibt sich aus der Standardabweichung s'_{r_2} und der Beziehung (1), dass sich in diesem Falle s_R und s_m/m bis um etwa das 1.5-fache gegenüber den in der Tabelle eingetragenen Werten erhöhen, je nachdem wie weit die zu bestimmende Menge von jener Menge abweicht, mit der die Eichung durchgeführt worden ist.

4. ABHÄNGIGKEIT DES REMISSIONSWERTES VON VERSCHIEDENEN PLATTEN- UND FLECKEIGENSCHAFTEN

Es ist zu erwarten, dass die Dicke der Chromatographier-Schicht einen gewissen

Einfluss auf den Wert von R hat. Die Korrelation zwischen der Zunahme von $(1 - R)$ und der Abnahme der Dicke ist jedoch recht gering. (Korrelationskoeffizient 0.1 bis 0.2.) Eindeutig hängt jedoch der gemessene Remissionswert von der Höhe der Laufmittelfront ab. Dies gilt vor allem deswegen, weil bei grösserer Wanderungsstrecke der Fleck in Laufrichtung (mit Ausnahme der Substanzen, deren R_F -Wert nahe bei 1 liegt) stärker ausgedehnt ist.

Die Höhe der Laufmittelfront ist bei konstanter Chromatographierzeit ihrerseits wieder bedingt durch die Dicke und die Dichte der Chromatographierschicht. Dickere Schichten lassen die Front schneller wandern, dichtere Schichten im Gegensatz dazu langsamer.

Da ein gegenläufiger Zusammenhang von $(1 - R)$ mit der Fleckausdehnung in Laufrichtung besteht, stellt sich die Frage, wie gut sich das Produkt der beiden Grössen als Mass zur Bestimmung von m eignet.

Es zeigte sich, dass im Bereich von $1 \mu\text{g}$ bis $5 \mu\text{g}$ eine Auswertung mit Hilfe dieses Produktes—unter Verwendung der R -Werte aus der Messung mit dem 13 mm breiten Lichtfleck—im Durchschnitt gleich genau ist, wie die in Abschnitt 3 wiedergegebene Auswertung. Im Bereich unterhalb $1 \mu\text{g}$ war jedoch das Vorgehen gemäss Abschnitt 3 vorteilhafter.

5. EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN

Zur photometrischen Auswertung der Platten diene eine im Prinzip ähnliche Anordnung wie sie JORK angegeben hat². Es wurde jedoch kein Monochromator verwendet. Als Lichtquelle diene eine Niederdruck-Quecksilberdampf-Lampe (Hanau NK 4/4). Diese Lampe strahlt im wesentlichen nur Licht von der Wellenlänge 254 nm aus. Vor der Lichtquelle und vor dem als Empfänger dienenden Photomultiplier war je ein Interferenzfilter mit Durchlassband bei 254 nm angeordnet. Vor der Lampe war ein auswechselbarer Spalt angebracht. Dieser wurde mit einer Quarzlinse auf die Dünnschichtplatte abgebildet. Der Lichtfleck auf der Platte hatte wahlweise die Abmessungen $1 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$ oder $1 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$. Im einen Falle wurde demnach der Substanzfleck auf der ganzen Breite, im andern Falle nur sein Zentrum abgetastet, wenn die Platte in Chromatographier-Laufrichtung unter der feststehenden Lampe und dem Empfänger durchgezogen wurde.

Die $20 \times 20 \text{ cm}$ grossen Platten waren auf einem Shandon Unoplan Beschichtungsgerät mit Kieselgel G der Firma Merck beschichtet worden. Mit dem Gerät kann im selben Streichvorgang eine Serie von zehn Platten hergestellt werden. Die Dicke der Kieselgel-Schicht betrug im Mittel 0.20 mm. Die Schicht wurde durch Einritzen mit einer Nadel in zehn 15 mm breite Bahnen eingeteilt.

Die Testsubstanzen wurden in Acetonlösung mit $2 \mu\text{l}$ -Kapillarröhrchen (Drummond Microcaps) auf den Startpunkt der Platte aufgetragen.

Die Chromatogramme wurden in den üblichen Glaskammern, ohne Filterpapier-Einlage, mit dem Gemisch Benzol-Chloroform-Essigester (2:2:1) als Laufmittel hergestellt. Die Laufzeit betrug 30 min.

6. VERWENDETE METHODE DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG DER MESSDATEN

Die Daten einer Plattenserie wurden nach einer Modifikation des Verfahrens

der mehrfachen Streuungszerlegung ausgewertet. Nach den Regeln der mehrfachen Streuungszerlegung wird angenommen, dass R innerhalb einer Serie zerlegt werden kann nach der Formel (2) ^{4,5}.

$$R = \bar{R} + P(i) + B(k) \quad (2)$$

\bar{R} ist der Gesamtmittelwert, $P(i)$ gibt den Unterschied zwischen verschiedenen Platten wieder (i , Index der Platte), $B(k)$ die für alle Platten als gleich angenommene Abhängigkeit von einer zweiten Variabel. In Abschnitt 2 wurde k als Index der Bahn verwendet, in Abschnitt 3 jedoch als Index für die aufgetragene Substanzmenge m .

Um nun den für jede Platte individuellen Gang zu berücksichtigen, wurde $B(k)$ ersetzt durch die Überlagerung eines Gliedes $T_{\text{lin}}(i, k)$, das linear mit k geht, und eines Gliedes $T_{\text{qu}}(i, k)$ das quadratisch in k ist. Anstelle von (2) wurde somit den Ansatz (3) verwendet.

$$R = \bar{R} + P(i) + T_{\text{lin}}(i, k) + T_{\text{qu}}(i, k) \quad (3)$$

In Abschnitt 2 spiegelt $T_{\text{lin}}(i, k)$ den Unterschied der einen Plattenhälfte gegenüber der andern wieder, $T_{\text{qu}}(i, k)$ den Unterschied zwischen mittleren und äusseren Bahnen.

In Abschnitt 3 sind die Mengen m so gewählt worden, dass $\ln(1 + m/m_0) = k$ in gleichen Intervallen zunimmt. Die Konstanten r_1 und r_2 können dann durch einfache Umrechnung aus T_{lin} und T_{qu} gewonnen werden.

DANK

Der Verfasser dankt den Herren G. SZÉKELY und B. KARLHUBER für die Anweisung zur Herstellung der Chromatogramme.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Reproduzierbarkeit der photometrischen Auswertung der Flecke von Dünnschicht-Chromatogrammen zur Bestimmung der Substanz-Konzentration wurde untersucht. Gemessen wurde die Remission einiger im U.V. absorbierender Test-Substanzen bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Die Streuung des Remissionswertes innerhalb einer Platte, zwischen Platten der gleichen Herstellungsserie und zwischen verschiedenen Herstellungsserien wurde ermittelt.

Eine Konzentrations-Eichkurve kann von einer Messreihe für eine spätere Auswertung übernommen werden, wenn Eichwerte bei zwei verschiedenen Konzentrationen neu bestimmt werden. Bei Verwendung von nicht speziell ausgesuchten Platten liegt die relative Standardabweichung, mit der die Konzentration dann aus dem Remissionswert bestimmt werden kann—bei nicht zu kleinen Konzentrationen—im Durchschnitt bei 10%.

In den untersuchten Fällen ist bei kleinen Konzentrationen die Bestimmung mit Hilfe des Remissionswertes des Zentrums des Fleckes die genaueste, bei mittleren Konzentrationen ergibt die über den ganzen Fleck gemittelte Remission etwa die gleiche Genauigkeit.

Dicke und Dichte der Kieselgel-Schicht haben primär einen Einfluss auf die

Steiggeschwindigkeit der Laufmittelfront und damit auf die Ausdehnung des Fleckes in Laufrichtung. Der feststellbare Einfluss der Schichtdicke auf den Remissionswert ist nur gering, da sich verschiedene Effekte gegenseitig kompensieren.

LITERATUR

- 1 H. JORK, *III. Intern. Symp. Chromatog., Brüssel, 1964*, S. 295.
 - 2 H. JORK, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 17.
 - 3 H. T. GORDON, *J. Chromatog.*, 22 (1966) 60.
 - 4 O. L. DAVIES, *Statistical Methods in Research and Production*, Oliver and Boyd, London, Edinburgh, 1957, Chap. 6.
 - 5 A. LINDER, *Planen und Auswerten von Versuchen*, Birkhäuser, Basel, 1953. Abschnitte 15, 16 und 63.
- J. Chromatog.*, 33 (1968) 378-384