

CHROM. 3909

QUANTITATIVE *IN SITU* AUSWERTUNG BANDENFÖRMIG
AUFGETRAGENER SUBSTANZEN IN DER DÜNNSCHICHTCHROMATO-
GRAPHIE

R. KLAUS

Analytisches Zentrallabor der Fa. E. Merck AG, Darmstadt (Deutschland)

(Eingegangen am 14. November 1968; geänderte Fassung am 14. Dezember 1968)

SUMMARY

Quantitative evaluation in situ of substances applied in the form of bands in thin-layer chromatography

Quantitative evaluation *in situ* of thin-layer chromatograms following non-quantitative sample application in the form of bands has been the subject of the experiments described in this paper. The technical advantage which application in the form of bands has over application in the form of spots with respect to measurement is stressed. Non-quantitative application may be taken into consideration when relating the quantity of the components to be analysed to the quantity of a so-called internal standard. Using an example from the field of clinical analysis—the analysis of cholesterol esters of the saturated fatty acids (cholesterol stearate) in human serum—details of the procedure are described. In another part of the paper the semi-quantitative determination *in situ* of other components of a compound with reference to the components analysed quantitatively is suggested. As an example a description is given of the determination of several cholesterol esters of unsaturated fatty acids in human serum which employs the cholesterol stearate calibration curve.

In conclusion it is stated that the techniques described in the paper, *i.e.*, the application in the form of bands and the use of an internal standard for reference, do not exclude employing procedures that do not require calibration samples. Experiments in which the transferability of the extinction from one plate to another is examined, have not yet been terminated. Moreover, it should be possible to use the described method in electrophoresis without further substantial limitations.

Obwohl bei Dünnschichtchromatogrammen mit bandenförmig aufgetragenen Substanzen im Vergleich zu solchen mit punktförmiger Substanzauftragung neben einer besseren chromatographischen Trennung¹ ein geringerer photometrischer Schwierigkeitsgrad bei *in situ* Analysen zu erwarten ist, wurde seither im Routinebetrieb relativ wenig Gebrauch von diesem Verfahren gemacht. Dies erscheint darüber hinaus um so erstaunlicher, als ein Grossteil der von der Geräteindustrie seit Jahren auf den Markt gebrachten Geräte zur Photometrierung von Elektrophoresestreifen,

z.B. der Extinktionsschreiber II der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, sowie das Elektro-phoreseauswertgerät zum Photometer Eppendorff der Fa. Netheler und Hinz, ohne weiteres für diesen Zweck eingesetzt werden kann. Die mit diesen Geräten in der Regel einstellbare rechteckige Messflächenbegrenzung ist für die hier zur Diskussion stehenden Chromatogramme im Gegensatz zu punktförmig aufgetragenen Chromatogrammen nicht nur ausreichend, sondern zwingend. Dagegen dürfte allerdings—und dies scheint ein wesentlicher Grund für die nur begrenzte Anwendung des Verfahrens zu sein—die quantitative punktförmige Auftragung der Bandentechnik überlegen sein. Im Rahmen dieser Arbeit wird aber gezeigt, dies sei an dieser Stelle vorweggenommen, dass eine quantitative bandenförmige Auftragung umgebar ist, wenn man nur darauf achtet, dass die Auftragszonen in sich gleichmässig sind. Zur Einhaltung dieser Bedingung sind neuerdings in der Literatur eine grosse Anzahl brauchbarer Verfahren²⁻⁴ und Geräte* angeboten worden. Hingewiesen sei an dieser Stelle auch auf die Einführung sogenannter Fertigplatten¹, die sich nicht nur durch eine für die Bandenauftragung günstig auswirkende Abriebfestigkeit auszeichnen.

Besonders zu erwähnen ist eine Veröffentlichung von ACKERMANN UND ASSMUS⁵. In dieser sich mit der Auswertung von Papierchromatogrammen beschäftigenden Arbeit wird neben einer prinzipiell auch für die Dünnschichtchromatographie anwendbaren Methode zur Herstellung gleichmässig belegter Zonen über Fehlerquellen, die bei den verschiedenen diskutierten Messverfahren auftreten können, berichtet. Unter anderem wird eine gewisse Abhängigkeit der Messwerte von der Fleckbelegung angegeben.

Diese von STAHL UND JORK und KLAUS für punktförmig aufgetragene Dünnschichtchromatogramme an anderer Stelle⁶⁻⁸ ebenfalls behandelten systematischen Messwertbeeinflussungen reduzieren sich bei bandenförmiger Auftragung erheblich. So führen bei Anwendung des Durchlichtverfahrens im wesentlichen Falschlichtanteile zu einer Beeinträchtigung der Messwerte. Aufgrund dieser verminderten Messwertbeeinflussung wird in einem späteren Abschnitt auf die Möglichkeit hingewiesen, unter gewissen Voraussetzungen halbquantitative Aussagen auch von solchen Komponenten der Analysensubstanz zu machen, die nicht direkt geeicht werden.

Bezüglich der eigentlichen Analysendurchführung wurden in Anbetracht der in der Industrie bzw. in der Klinik noch in überwiegender Zahl verwendeten Geräte, die mit durchfallendem Licht arbeiten, eine Messanordnung benutzt, die diesen Gegebenheiten entspricht. Sie setzte sich aus Teilen eines Spektralphotometers PMQ II, der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, einem Transmission-Extinktions-Wandler, einem Kompensationsschreiber und einem Chromatogrammzusatz (Eigenbau)⁷ zusammen. Als Messgrössen, für deren Registrierung eine Spaltblende 6×0.2 mm verwendet wurde, boten sich somit die Extinktionen bzw. Extinktionsortsintegrale an.

QUANTITATIVE AUSWERTUNG BEI NICHTQUANTITATIVER BANDENFÖRMIGER AUFTRAGUNG

Wie einleitend bereits angedeutet, dürfte eine der Schwierigkeiten bei der *in situ* Analyse bandenförmiger Chromatogramme in dem quantitativen Auftragen der Substanzen auf die Dünnschicht-Platte zu suchen sein. Wir haben zur Verminderung der hierdurch bedingten Fehlermöglichkeiten daher versucht, ein auf anderen Gebieten

* z.B. Linomat, Hersteller Fa. CAMAG, Muttenz (Schweiz).

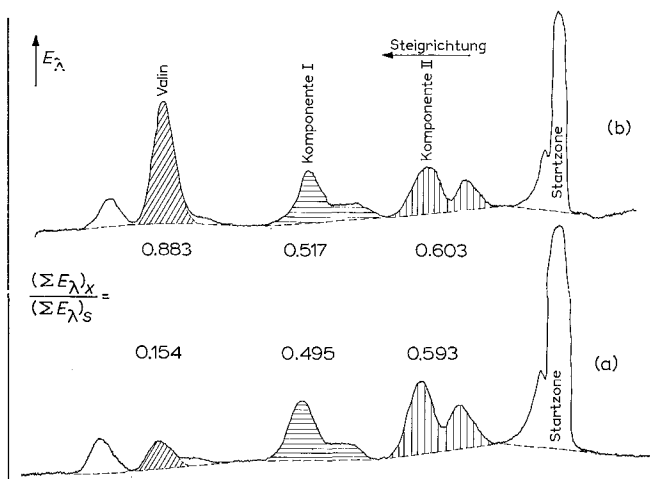


Fig. 1. Extinktionsortskurven eines dünn-schichtchromatographisch getrennten Serums. (a): Normalserum; (b): Normalserum + Valin.

der Analytik mit gutem Erfolg angewandtes Verfahren auf diesen Sektor der Messtechnik zu übertragen. Bei dieser Methode des sogenannten inneren Standards wird die Messgröße der zu analysierenden Komponente auf die Messgröße einer konstanten Komponente bezogen. Letztere kann sowohl Bestandteil der Analysensubstanz als auch eine zu der Analysensubstanz zugesetzte Komponente sein. Von diesem so errechneten Messgrößenquotienten sollte man erwarten, dass er unabhängig von den absoluten Beträgen der beiden Messgrößen und somit von dem Auftragsvolumen ist. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass der funktionelle Zusammenhang zwischen den beiden Messgrößen und den dazu gehörigen Konzentrationen der Komponenten einander entsprechen, was sich einerseits durch eine sinnvolle Wahl der Bezugskomponente, andererseits durch eine entsprechende Verdünnungsstufe der Analysenlösung fast immer erreichen lässt.

Diese theoretische Überlegung der Konstanz der Quotienten wurde an einer Reihe von Dünnschichtchromatogrammen überprüft. Von einem solchen zeigt Fig. 1 die Extinktionsortskurven zweier Bahnen des gleichen Serums bei verschiedenen aufgetragenen Mengen. Die Darstellung bzw. die Auswertung der Kurven bestätigt den erwarteten Sachverhalt. Die Quotienten der integrierten Extinktionen

$$\frac{(\sum E_{\lambda}) \text{ Komp. I bzw. II}}{(\sum E_{\lambda}) \text{ Startzone}}$$

ergeben einen annähernd konstanten Wert. Gleichzeitig gibt Fig. 1 ebenso wie die folgende Fig. 2 die Veränderung der Werte

$$\frac{(\sum E_{\lambda})_x}{(\sum E_{\lambda}) \text{ Startzone}}$$

bei qualitativer Zugabe verschiedener Komponenten zu dem Serum wieder.

Darüber hinaus ist aus den Extinktionsortskurven von Fig. 2 zu ersehen, dass trotz der hier gewählten optimalen Bedingungen bei der chromatographischen Vorbereitung der Platte nur eine ungenügende Trennung der einzelnen Komponenten

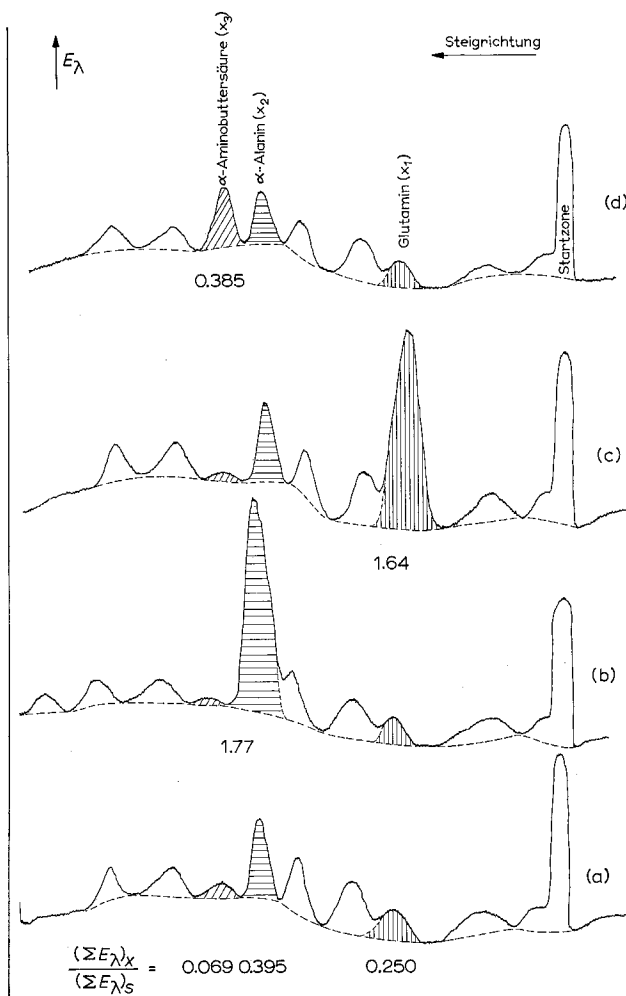


Fig. 2. Extinktionsortskurven eines dünn-schichtchromatographisch getrennten Serums. (a): Normalserum; (b): Normalserum + α -Alanin; (c): Normalserum + Glutamin; (d): Normalserum + α -Aminobuttersäure.

erzielt wurde, so dass eine graphische Korrektur der registrierten Banden erforderlich ist. Auf diese Notwendigkeit sei hingewiesen, da sich auch bei optimal gewählten Verhältnissen von Spaltbreite zu Bandenbreite dieser Effekt häufig nicht vermeiden lässt.

Diese Gesichtspunkte seien der eigentlichen Beschreibung der quantitativen Analyse, für die sich im wesentlichen die drei folgenden Verfahren anbieten, vorausgestellt:

(a) Die Analyse erfolgt unter Anwendung von Eichkurven, die mit Reinsubstanzen der zu prüfenden Komponenten bzw. des zugegebenen inneren Standards erstellt werden.

(b) Die Analyse wird unter Verwendung von Eichsubstanzen durchgeführt, welche sich aus sämtlichen Komponenten chromatographiereiner Qualität der zu prüfenden Substanz zusammensetzen. Sind in der Analysesubstanz Komponenten

in geringerer Konzentration zu bestimmen, so bietet sich eine Nebenkomponente als innerer Standard an.

(c) Die zu prüfende Substanz wird nach dem Zumischverfahren mit nachfolgender Extrapolation analysiert.

Während das Verfahren (b) unter anderem aus Beschaffungsgründen der reinen Grundsubstanzen nur einen begrenzten Anwendungsbereich haben dürfte, das Verfahren (a) aber z.B. bei Spurenanalysen aufgrund der für Proben- und Vergleichsbahn verschiedenartigen chromatographischen Bedingungen u.U. Korrekturverfahren erfordern würde, legen wir unseren Analysen die Methode (c) zugrunde.

Das Zumischverfahren geht von der Voraussetzung aus, dass die zu der zu analysierenden Substanz zugesetzten Mengen der zu bestimmenden Komponente den gleichen Beeinflussungen unterliegen wie der ursprünglich vorhandene Anteil selbst. Auf diese Notwendigkeit sei hingewiesen, da das Verfahren bei Nichterfüllung dieser Bedingung an Richtigkeit verlieren kann. Darüber hinaus sollten die Analysenbedingungen so gewählt werden, dass man den linearen bzw. annähernd linearen Bereich der Messwert-Konzentrationskurve erreicht. Dies lässt sich in der Regel durch eine entsprechende Verdünnung der Analysenlösung bzw. durch die Wahl der Zusätze herbeiführen.

Mit einem Beispiel aus dem Bereich der Serumanalytik soll das Verfahren durchgeführt werden. Der eigentliche chromatographische Trennungsgang, der zur Isolierung der zu bestimmenden Cholesterinester der gesättigten Fettsäuren (Cholesterinstearat) führt, sei als gegeben vorausgesetzt und lediglich in der Legende zu Fig. 3 kurz angedeutet. Auf die Herstellung der aufgetragenen Lösungen soll im folgenden näher hingewiesen werden, da sie der Gehaltsberechnung zugrunde gelegt werden

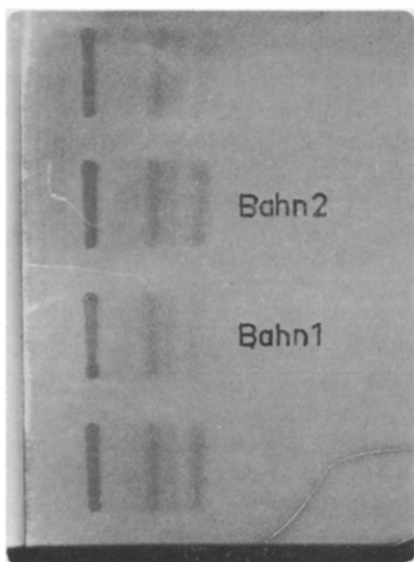


Fig. 3. Photographisches Positiv der für die Identifizierung von Cholesterinstearat in Serum hergestellten Platte. Bahn 1: Normalserum. Bahn 2: Normalserum + Cholesterinstearat (5 mg/10 ml). Sorptionsmittel: DC-Fertigplatte Kieselgel F₂₅₄, 20 × 20 cm. Fließmittel: Petroleumbenzin (60–80°)–Chloroform (90:10), viermalige Entwicklung je 10 cm hoch. Nachweis: Besprühen mit 20%iger Lösung von Molybdätosphorsäure in Äthanol, anschliessend etwa 2 Min. auf 120° erwärmen.

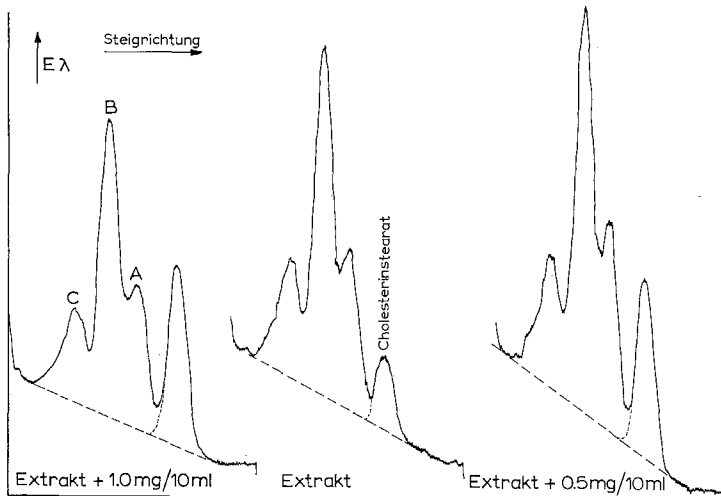


Fig. 4. Extinktionsortskurven der für die quantitative Analyse von Cholesterinesterat hergestellten Platte.

müssen. Als Ausgangslösung wurde eine Lösung des Extraktes von 2.5 ml Normal-Serum in 20 ml Chloroform gewählt. Nachdem in einem Vorchromatogramm— Fig. 3 zeigt ein photographisches Positiv eines Plattenausschnittes— der R_F -Wert der Analysenkomponente ermittelt war, wurden zu Teilen der Ausgangslösung 0.5 mg und 1.0 mg Cholesterinesterat, berechnet auf 10 ml Ausgangslösung, zugesetzt. Von diesen so erstellten Lösungen wurden aliquote Teile mit einer Blutzuckerpipette bandenförmig aufgetragen und anschliessend chromatographiert. Schliesslich wurden die Extinktionsortskurven der einzelnen Bahnen der Dünnschicht-Platte mit $\lambda = 600$ nm (Fig. 4) registriert und integriert (Tabelle I). Als innerer Standard bietet sich bei diesem Beispiel die Summe der drei vor dem Analysenpeak liegenden Komponenten an. Trägt man nun die in Tabelle I für die verschiedenen Bahnen errechneten Quotien-

TABELLE I

WERTETABELLE ZUR BESTIMMUNG VON CHOLESTERINESTEARAT IN SERUM NACH DEM EXTRAPO-LATIONSVERFAHREN

Bahn	$(\sum E_\lambda)_{\text{Cholesterinesterat}}$ (rel. Einh.)	$(\sum E_\lambda)_{\text{innerer Standard}}$ (rel. Einh.)	$(\sum E_\lambda)_{\text{Cholesterinesterat}}$ $(\sum E_\lambda)_{\text{innerer Standard}}$
1 Serum + 0.5 mg Cholesterinesterat (10 ml)	35.1	146.5	0.240
2 Serum	15.8	151.2	0.105
3 Serum + 1.0 mg Cholesterinesterat (10 ml)	55.9	138.3	0.403
4 wie 2	22.4	182.1	0.123
5 wie 1	44.1	183.4	0.240
6 wie 2	20.9	167.0	0.125
7 wie 3	46.8	142.2	0.329
Mittel 2,4,6			0.117
Mittel 1,5			0.240
Mittel 3,7			0.366

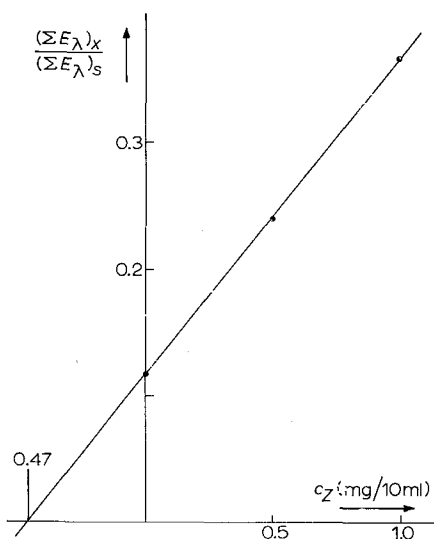


Fig. 5. Aus Tabelle I resultierende Eichkurve.

ten der integrierten Extinktionen in Abhängigkeit zu den der Ausgangslösung zugeetzten Cholesterinestearatmengen in einem Koordinatensystem auf (Fig. 5), so resultiert aus der graphischen Extrapolation der Cholesterinestearatgehalt der Ausgangslösung (0.47 mg/10 ml). Für das gewählte Serum ergab sich nach Umrechnung entsprechend der vorgenommenen Verdünnung ein Gehalt an Cholesterinestern der gesättigten Fettsäuren (Cholesterinestearat) von 3.7 mg/10 ml.

HALBQUANTITATIVE BESTIMMUNG NICHT DIREKT GEEICHTER KOMPONENTEN DER ANALYSENSUBSTANZ

In dem folgenden Abschnitt soll versucht werden, unter Anwendung der für einen Bestandteil der Analysensubstanz aufgenommenen Eichkurve, eine halbquantitative Abschätzung weiterer vorhandener, der Eichsubstanz ähnlicher Komponenten vorzunehmen. Der halbquantitative Charakter dieses Verfahrens ist im wesentlichen durch die beiden folgenden Punkte bedingt:

(a) Mögliche Abweichung der spezifischen Extinktion zwischen Eichkomponente und Analysensubstanz.

(b) Durch abweichende R_F -Werte für Eich- und Analysensubstanz hervorgerufene verschiedene Fleckbelegung und damit veränderter Falschlicheinfluss.

Unter Bezugnahme auf die Eichkurve von Cholesterinestearat werden die weiteren in Fig. 4 mit A, B und C bezeichneten Komponenten des im vorausgegangenen Abschnitt verwendeten Serums analysiert. Eine Identifizierung der zwischen der Startzone und Cholesterinestearat liegenden Bestandteile ergab, dass es sich bei diesen um die Cholesterinester der einfach, der zweifach und der dreifach ungesättigten Fettsäuren handelt. Zur halbquantitativen Auswertung werden nun die einzelnen Peakflächen der Extinktionsortskurven (Fig. 4) der drei ungesättigten Ester analog dem quantitativen Beispiel auf die Summe dieser drei Peakflächen als innerer Standard

TABELLE II

WERTETABELLE ZUR HALBQUANTITATIVEN AUSWERTUNG UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREESTER UNTER ANWENDUNG DER EICKURVE FÜR CHOLESTERINSTEARAT

Bahn	Komponente	(ΣE_{λ})	(ΣE_{λ})	Konzentration (mg/10 ml Serum)
			$(\Sigma E_{\lambda})_{A+B+C}$	
2	A (einfach ungesätt. Ester)	36.8	0.232	7.4
2	B (zweifach ungesätt. Ester)	81.2	0.512	16.3
2	C (dreifach ungesätt. Ester)	34.9	0.220	7.0
3	A	36.7	0.242	7.8
3	B	85.3	0.563	18.0
3	C	30.6	0.202	6.5
4	A	54.5	0.273	8.7
4	B	107.2	0.536	17.1
4	C	38.0	0.190	6.1

bezogen. Die so erhaltenen Quotienten dienen als Masszahlen, die es erlauben, aus der Eichkurve Fig. 5 die Gehalte der einzelnen Komponenten zu ermitteln. Tabelle II gibt Aufschluss über die Werte, die aus drei Bahnen der für die Cholesterinstearat-analyse hergestellten Platte resultieren. Eine Mittelbildung führt schliesslich für das eingesetzte Serum mit den folgenden Gehalten der drei Komponenten:

A. (einfach ungesättigter Fettsäureester), 8.0 mg/10 ml Serum

B. (zweifach ungesättigter Fettsäureester), 17.1 mg/10 ml Serum

C. (dreifach ungesättigter Fettsäureester), 6.5 mg/10 ml Serum

zu Werten, deren Summe an der oberen Grenze des physiologischen Normalbereiches liegt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die quantitative *in situ* Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen bei nicht-quantitativer bandenförmiger Auftragung ist Gegenstand der vorstehenden Ausführungen. Insbesondere wird auf den messtechnischen Vorteil der *in situ* Auswertung bandenförmiger Chromatogramme gegenüber punktförmigen Chromatogrammen hingewiesen. Die nicht-quantitative Auftragung kann durch den Bezug der Messgrösse der Analysenkomponente auf die Messgrösse eines sogenannten inneren Standards berücksichtigt werden. Mit einem Beispiel aus dem Bereich der klinischen Analytik—einer Analyse von Cholesterinestern der gesättigten Fettsäuren (Cholesterinstearat) in Humanserum—werden Einzelheiten des Verfahrens mitgeteilt. In einem weiteren Abschnitt wird auf die Möglichkeit einer halbquantitativen *in situ* Bestimmung anderer Analysensubstanzbestandteile unter Bezugnahme auf die quantitativ analysierte Komponente hingewiesen. Als Beispiel wird die Bestimmung mehrerer Cholesterinester ungesättigter Fettsäuren in Humanserum bei Anwendung der Cholesterinstearat-Eichkurve beschrieben.

Abschliessend sei vermerkt, dass das hier erläuterte Verfahren des bandenförmigen Auftragens bzw. des Bezugs auf einen inneren Standard ein eichprobenfreies

Arbeiten nicht ausschliesst. Versuche, welche die Übertragbarkeit der Extinktionsquotienten von Platte zu Platte klären sollen, sind noch nicht abgeschlossen. Ebenso dürfte die Anwendbarkeit des Verfahrens bei der Elektrophorese ohne wesentliche zusätzliche Einschränkungen möglich sein.

LITERATUR

- 1 H. HALPAAP, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 144.
- 2 F. A. VANDENHEUVEL, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 102.
- 3 A. ACHÁVAL UND R. D. ELLEFSON, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 329.
- 4 W. WÄSSLE UND K. SANDHOF, *J. Chromatog.*, 34 (1968) 357.
- 5 G. ACKERMANN UND G. ASSMUS, *Z. Anal. Chem.*, 200 (1964) 418.
- 6 E. STAHL UND H. JORK, *Zeiss Informationen*, 68 (1968) 52.
- 7 R. KLAUS, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 311.
- 8 R. KLAUS, *Pharm. Ztg.*, 112 (1966) 480.

J. Chromatog., 40 (1969) 235-243