

CHROM. 4455

TRENNUNG UND NACHWEIS IM SUBNANOGRAMMBEREICH DURCH
DÜNNFILM-CHROMATOGRAPHIE AN FESTEN OBERFLÄCHEN

E. CREMER, F. DEUTSCHER, P. FILL UND H. NAU

Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Innsbruck, Innsbruck (Österreich)

SUMMARY

Separation and determination in the subnanogram range by thin-film chromatography on solid surfaces

Liquid films obtained by spreading of a liquid on a solid surface can be used as mobile phase for chromatographic separations. With this method non-volatile substances can be separated in as short a time as 10–100 sec. Especially suitable are solid surfaces whose electron micrographs exhibit a micro-roughness in the μ -range. Such surfaces are exemplified by evaporated films of indium oxide, which also were used to determine the time dependence for the height of rise during the spreading process. For a limited height of rise (up to 2.5 cm), the increase in distance between start and front obeys a negative first-order rate law. The rate constant κ is in first approximation inversely proportional to the thickness of the evaporated film. Films with a thickness from 0.6–3.6 μ were used. Examples of separations are given for indicator dyes, estrogens and fluorescent substances. The latter ones can be detected by a Zeiss spectrophotometer in the range of 10^{-11} g. With the estrogens $2 \cdot 10^{-10}$ g could be detected, using a solution with a concentration of 1 p.p.m. Aluminum surfaces which were etched and anodized were also found suitable for sharp and rapid separation of dyes. By means of autoradiography about 10^{-14} g of radioactive sulfur and 10^{-16} g of radioactive phosphorus could be detected.

EXPERIMENTELLE GRUNDLAGEN

Die Dünnschicht-Chromatographie (TFC) kann man als Grenzfall der Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auffassen, den man erreicht, wenn man zu immer dünneren Schichten übergeht. Es bleibt dann schliesslich nur mehr eine mehr oder minder rauhe Oberfläche übrig, auf der ein dünner Flüssigkeitsfilm spreitet, der die mobile Phase bildet^{1,2}. Da dieses Spreiten ein relativ schnell verlaufender Vorgang ist, kann man mit dieser Methode schon in 10–100 sec sehr gute Trennungen schwer flüchtiger Substanzen erzielen. Die Belastbarkeit der Schicht ist zwar klein, doch gelingt dafür auch der Nachweis entsprechend kleinerer Mengen. Fig. 1 zeigt einen Querschnitt durch eine normale Dünnschicht mit ihren relativ grossen Poren und einen solchen durch einen Dünnschicht mit entsprechend dünner Unterlage. Als

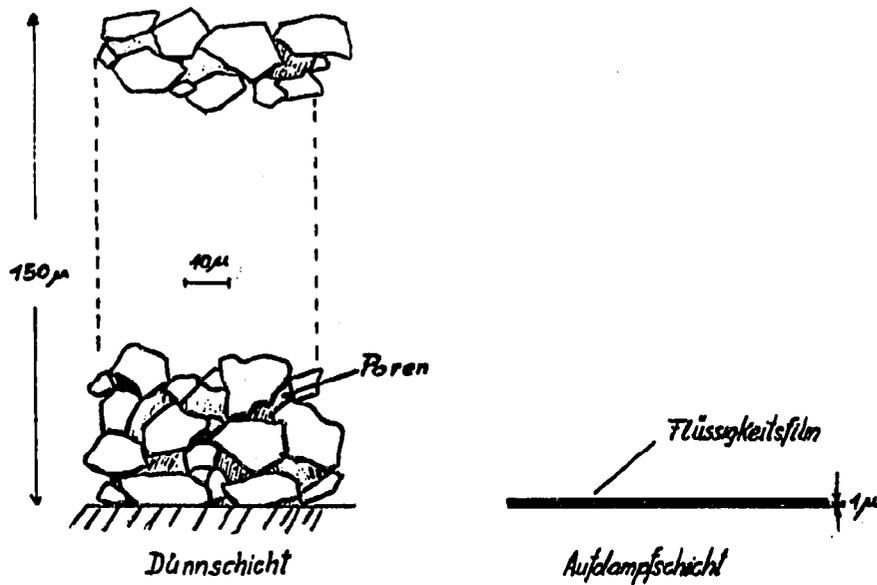


Fig. 1. Größenvergleich zwischen TLC und TFC².



Fig. 2. Mikroskopischer Vergleich einer In_2O_3 -Aufdampfschicht (a) mit Kieselgel G (b) für die TLC. Immersion: Methylenjodid.

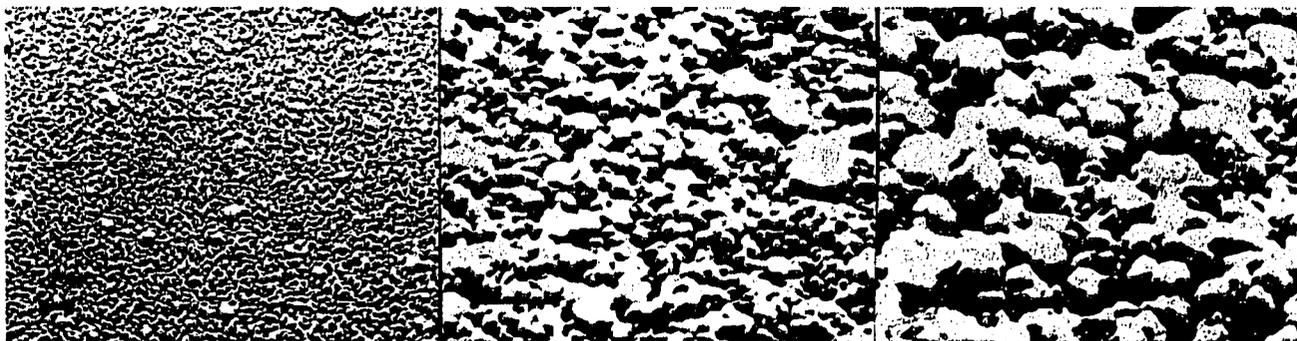


Fig. 3. Aufnahme einer 2μ dicken In_2O_3 -Schicht mit einem Rasterelektronenmikroskop (Stereo-scan: H. MÄRKL und E. SEIDL, Reaktorzentrum Seibersdorf).

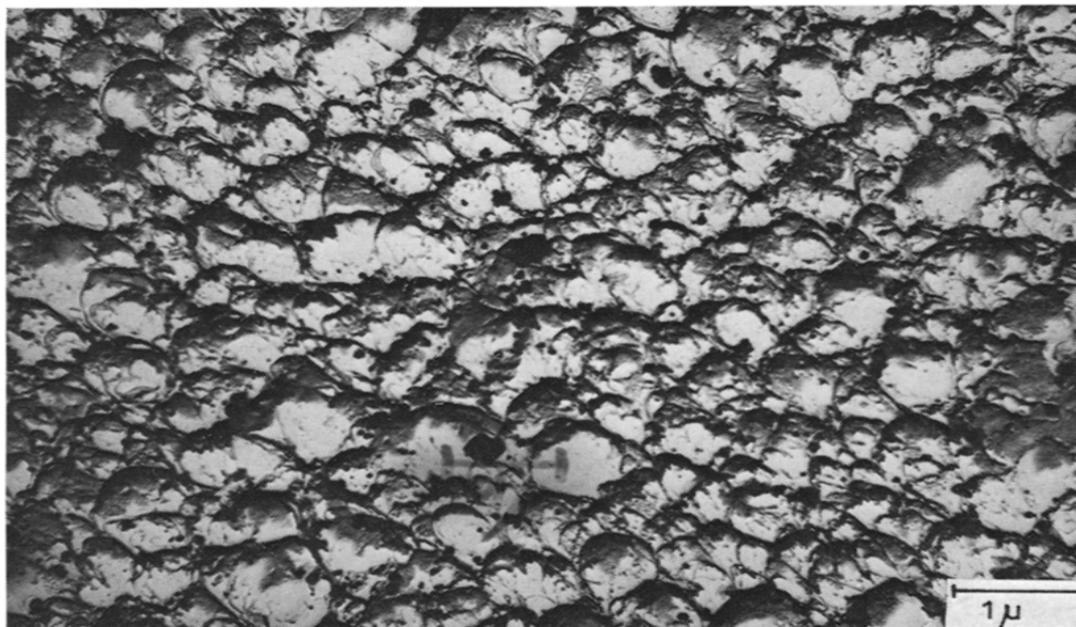


Fig. 4. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer In_2O_3 -Schicht (0.6μ). Zu ihrer Herstellung wurde von der Schicht eine Kollodiummatrize angefertigt, von der durch Aufdampfen mit Kohle ein Filmabdruck hergestellt (Vgl. z.B. Lit. 3) und zur Erhöhung des Kontrastes mit Gold-Palladium schrägbeschattet wurde.

stationäre Phase besonders geeignet waren oxidische Aufdampfschichten. Fig. 2 zeigt einen mikroskopischen Vergleich einer In_2O_3 -Schicht und einer Kieselgelaufschwemmung, wie sie für eine normale Dünnschicht verwendet wird. Fig. 3 zeigt weitere mit einem Rasterelektronenmikroskop aufgenommene Vergrößerungen einer Aufdampfschicht, die die "Mikrorauhigkeit" dieser Schichten gut erkennen lassen. Fig. 4 zeigt einen beschatteten Abdruck einer 0.6μ dicken Schicht, der mit Hilfe eines normalen Elektronenmikroskops aufgenommen wurde.

Gibt man auf eine solche Platte einige Zehntelmikroliter bis Nanoliter der Lösung eines Substanzgemisches auf und taucht dann den unteren Rand der Platte in ein geeignetes Fliessmittel, z.B. Methanol, so erhält man in wenigen Minuten, zu-

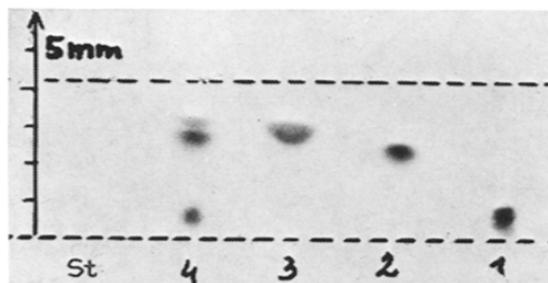


Fig. 5. TFC von Indikatorfarbstoffen, 1 = Eosin- NH_4 , 2 = Bromphenolblau, 3 = Bromthymolblau, 4 = 1+2+3. Fliessmittel: Methanol-Acetonitril (1:1). Laufzeit: 2 min. Probenmengen: ng-Bereich⁴.

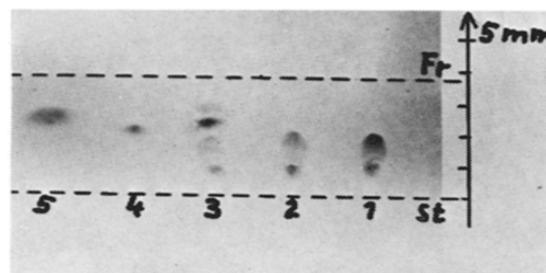


Fig. 6. TFC von Indikatorfarbstoffen, 1 = Eosin- NH_4 , 2 = Phenolrot, 3 = 1+2+4+5, 4 = Bromphenolblau, 5 = Bromthymolblau. Fliessmittel: Methanol-Acetonitril-Methylenchlorid- NH_3 (10:10:10:0.1). Laufzeit: 2 min. Probenmengen: ng-Bereich⁴.

weilen schon in Sekunden, ein Chromatogramm. Fig. 5 zeigt eine schwarz-weiss Aufnahme einer In_2O_3 -Platte, an der drei verschiedene Farbstoffe getrennt wurden⁴, Fig. 6 eine solche, an der fünf deutlich getrennte Banden sichtbar sind⁴. Man sieht auf diesen Chromatogrammen, dass sich die Zonen der schnell laufenden Stoffe horizontal verbreitern, sozusagen nach der Seite ausgebildete Schwänze zeigen. Diese Erscheinung findet man zuweilen auch in der Dünnschicht-Chromatographie. Sie tritt dann auf, wenn die Substanz eine Zeit lang von der Front mitgenommen wurde. Für die Trennung ist dieser Effekt natürlich günstig⁵, nur wird die Berechnung von Bodenhöhen (vgl. z.B. Lit. 6) aus der Verbreiterung der Zonen in Laufrichtung dann problematisch.

VARIATION DER MOBILEN PHASE

Die Zeitabhängigkeit des Aufsteigens der Front gehorcht demselben Gesetz wie das Aufsteigen der Flüssigkeit in den Poren einer gepackten Dünnschicht⁷, nämlich einer Geschwindigkeitsgleichung minus erster Ordnung. Dies bedeutet, dass der Abstand Start-Front mit der Wurzel aus der Zeit wächst (Fig. 7). Man kann die Fliessgeschwindigkeit für ein gegebenes System sowohl durch Änderung der Schichtdicke der Unterlage als auch dadurch variieren, dass man den Abstand zwischen Aufgabe und Flüssigkeitsspiegel verändert. Durch Variation des Plattenmaterials kann die Fliessgeschwindigkeit nochmals um etwa eine Grössenordnung erhöht werden, meist aber unter Einbusse der Trennschärfe (vgl. Fig. 8 und 9).

Bei Variation des Fliessmittels fanden wir Änderungen des Koeffizienten der Fliessgeschwindigkeit

$$\kappa = Z_f^2/t \quad (Z_f = \text{Steighöhe}, t = \text{Zeit})$$

bis auf das Achtfache. In Tabelle I sind für elf häufig benützte Fliessmittel die entsprechenden Werte, die von uns an einer 1.4μ dicken In_2O_3 -Platte gemessen wurden,

Prüfung des Quadratgesetzes

$$z_f^2 = \kappa \cdot t$$

an In_2O_3 -Schichten verschiedener Dicke

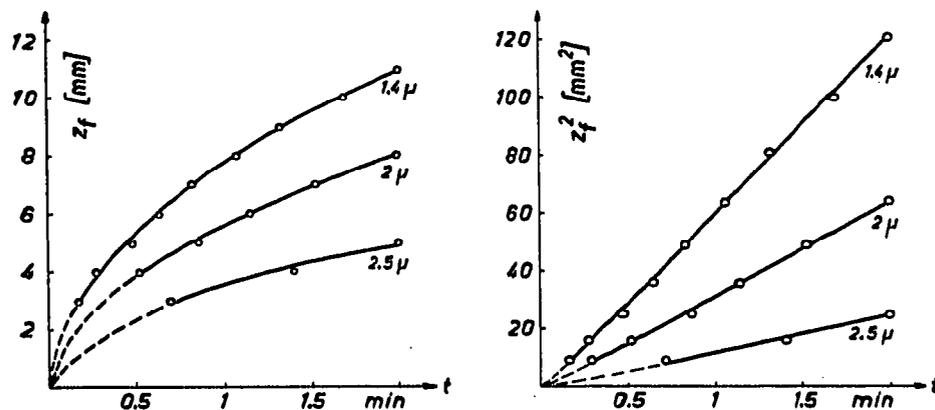


Fig. 7. Wanderungsgeschwindigkeit der Fliessmittelfront. Methanol als Fliessmittel und In_2O_3 -Schichten verschiedener Dicke als stationäre Phase⁴.

TABELLE I

κ -WERTE UND $\kappa\eta$ -WERTE VON 11 GEBRÄUCHLICHEN FLIESSMITTELN AUF KIESELGEL HR (MERCK) NACH STAHL⁸ SOWIE AUF EINER 1.4 μ DICKEN In_2O_3 -AUFDAMPFSCHICHT⁴ UND ZUSAMMENHANG MIT IHREN VISKOSITÄTEN UND BENETZUNGSWÄRMEN AN TON⁹

Fließmittel	Viskosität η [cP]	Dünnschicht an Kieselgel HR		Dünnschicht (Nau) an In_2O_3 (1.4 μ)		Benetzungswärme an Ton [cal g ⁻¹]
		$\kappa \cdot 10^2$ [cm ² sec ⁻¹]	$\kappa\eta \cdot 10^2$ [dyn]	$\kappa \cdot 10^2$ [cm ² sec ⁻¹]	$\kappa\eta \cdot 10^2$ [dyn]	
Wasser	1.000	13.1	13.1	1.30	13	12.6
Methanol	0.584	18.9	11.0	1.00	5.8	11.0
Acetonitril	0.358	31.2	11.2	0.92	3.3	—
Äthanol	1.200	8.5	10.2	0.25	3.0	10.8
n-Propanol	1.256	5.5	6.9	0.17	2.1	10.2
THF	0.486	17.6	8.6	0.42	2.0	—
Aceton	0.323	27.8	9.0	0.42	1.4	8
Benzol	0.647	16.2	10.5	0.22	1.4	(6)
Chloroform	0.570	14.8	8.4	0.22	1.3	9
n-Hexan	0.326	31.1	10.2	0.22	0.72	(1)
Äther	0.235	17.8	4.2	0.22	0.52	6

aufgeführt und den aus der Literatur entnommenen Messwerten bei der TLC⁸ gegenübergestellt. Das Produkt aus κ und der Viskosität η muss nach der Definition der dynamischen Viskosität der treibenden Kraft proportional sein. Die Substanzen wurden in der Reihenfolge fallender $\kappa\eta$ Werte für die TFC geordnet. In derselben Reihenfolge fallen auch die für Ton in der Literatur angegebenen Benetzungswärmen⁹ (mit Ausnahme der nichtpolaren Kohlenwasserstoffe, siehe Tabelle I, letzte Spalte). Bei der TLC an Silicagel ist die Reihenfolge nicht dieselbe, man kann also in bezug auf die Fließmittel die gewonnenen Erfahrungen nicht ohne weiteres von der einen auf die andere Methode übertragen.

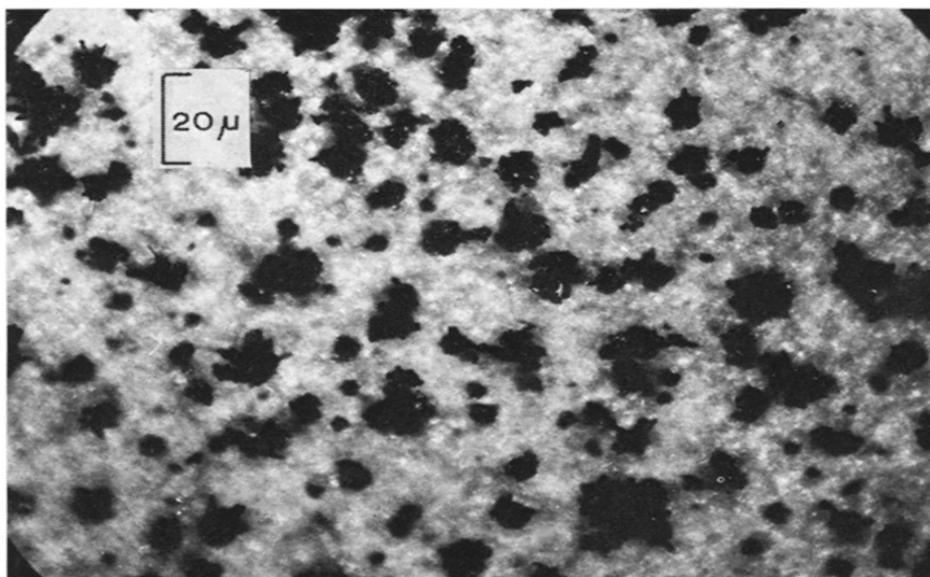


Fig. 8. Anodisch oxidiertes Aluminium mit Kupferkristallen¹⁰.

VARIATION DER STATIONÄREN PHASE

Wir haben ferner eine Reihe von Platten verschiedener chemischer Zusammensetzung und verschiedener Präparation in Bezug auf ihre Eignung für die TFC untersucht. Neben den Aufdampfschichten aus In_2O_3 wurden auch solche aus Wismut- und Zinnoxid⁴, aber auch durch bekannte chemische Verfahren hergestellte Schichten farbloser Oxide (AgO , MgO , Al_2O_3) untersucht¹⁰. Die Aufsteigegeschwindigkeit an den $2.5\text{-}\mu$ In_2O_3 -Schichten beträgt für Methanol etwa 5 mm in 2 min, auf den MgO Schichten steigen die meisten Flüssigkeiten in derselben Zeit 20 mm und auf einer durch anodische Oxidation erzeugten Aluminiumschicht, auf der galvanisch kleine Kupferkristalle von etwa $10\ \mu$ Grösse abgeschieden worden waren (Fig. 8), konnten

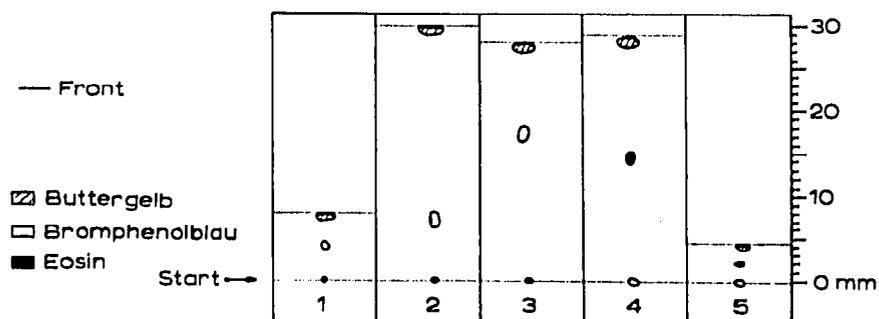


Fig. 9. Trennungen an anodisch oxidierten Aluminium-Folien¹⁰.

Platte 1: oxidiert in Oxalsäure, ohne Cu-Kristalle; Laufzeit, 3 min; Fliessmittel, Methanol. Platte 2: oxidiert in Schwefelsäure, Cu elektrolytisch in Kristallform abgeschieden; Laufzeit, 3 min; Fliessmittel, Methanol. Platte 3: oxidiert in Oxalsäure, Cu elektrolytisch in Kristallform abgeschieden; Laufzeit, 3 min; Fliessmittel, Methanol. Platte 4: oxidiert in Oxalsäure, Cu elektrolytisch in Kristallform abgeschieden; Laufzeit, 3 min; Fliessmittel, Äthylacetat + 2% Essigsäure. Platte 5: oxidiert in Oxalsäure, Cu elektrolytisch in Kristallform abgeschieden; Laufzeit, 10 sec; Fliessmittel, Äthylacetat + 2% Essigsäure. Probenmenge: 10^{-8} g.

sogar Steighöhen von 10 cm in 2 min erreicht werden. Doch ist die Steighöhe nicht unbedingt ein Kriterium für die Güte der Platte. Ändert sich z.B. die Dicke des Flüssigkeitsfilmes, so wird auch die effektive Diffusion grösser. Die Platte soll ausserdem die folgenden Eigenschaften besitzen: gute, aber nicht zu gute Adsorption für die zu untersuchenden Substanzen, an allen Stellen möglichst gleichmässige Dicke und Körnung, sowie gute Haftfähigkeit auf der Unterlage. Wünschenswert ist auch die Regenerierbarkeit. Wenn man alle diese Eigenschaften in Betracht zieht, so haben sich bisher die In_2O_3 -Schichten*, mit denen wir die Untersuchungen begannen, als die besten erwiesen.

QUALITATIVER UND QUANTITATIVER NACHWEIS

Farbstoffe sind sichtbar und daher am leichtesten nachzuweisen. Man wird zunächst eine Identifizierung durch den R_F -Wert versuchen. In einigen genauer untersuchten Fällen konnten wir diesen Wert auf $\pm 5\%$ mit einem mittleren Fehler des

* Diese Schichten wurden von der Firma Balzers A.G., Liechtenstein, zunächst für andere Zwecke entwickelt und uns von Herrn Dr. TH. KRAUS als besonders geeignet vorgeschlagen.

TABELLE II

REPRODUZIERBARKEIT DER R_F -WERTE FÜR BROMPHENOLBLAU AN INDIUMOXID BEI VARIATION DER SCHICHTDICKE UND DES FLIESSMITTELS⁴

Fliessmittel:

A = Methanol.

B = Methanol-Acetonitril-Methylenchlorid-NH₃ (10:10:10:0.1).

C = Methanol-Acetonitril-NH₃ (10:10:0.2).

D = Methanol-Acetonitril (1:1).

Schichtdicke (μ)	κ ($\text{cm}^2\text{min}^{-1}$)	Fliessmittel	R_F -Wert	Abweichung (%)
0.6	0.55	A	0.70-0.75	
2	0.5	A	0.70-0.75	
2.5	0.08	A	0.65	
2.5	0.05	B	0.62	± 10
2.5	0.1	C	0.65	
2.5	0.08	D	0.70	
1.4	0.55	A Kein Einfluss der r.F.	0.69-0.77 10 Messpunkte	± 5
1.4	0.55	A Kein Einfluss der Temperatur zwischen 0 und 50°	0.60-0.67 10 Messpunkte	± 5

Mittelwertes von 1.6% reproduzieren⁴. Tabelle II zeigt die R_F -Werte für Bromphenolblau an In_2O_3 , wobei als Fliessmittel Methanol, zuweilen mit Zusatz anderer Lösungsmittel verwendet wurde. Innerhalb eines Streufehlers von 10% sind die R_F -Werte nicht von den Zusätzen abhängig. Das ist natürlich nicht generell der Fall. Starke Abhängigkeit der R_F -Werte von der Zusammensetzung des Lösungsmittels fanden wir bei der Trennung von Farbstoffen an Aluminiumoxid (Fig. 9)¹⁰. Hier kann man durch Variation des Lösungsmittels zuweilen auch die Reihenfolge umkehren. Das Chromatogramm auf der letzten Platte der Fig. 9 wurde in 10 sec erhalten.

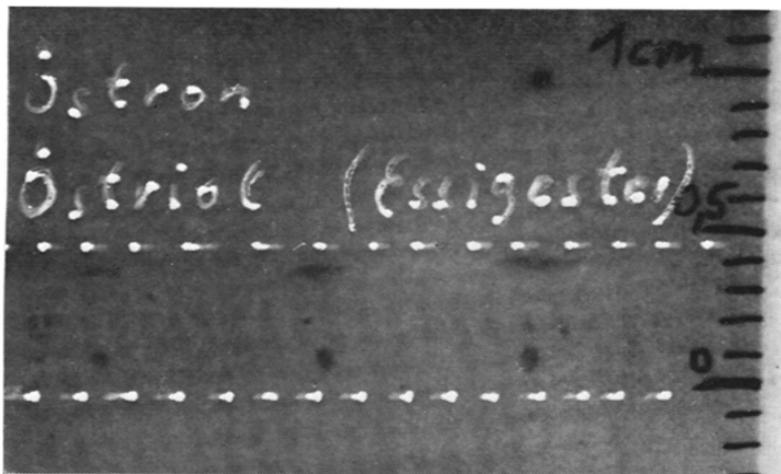


Fig. 10. Trennung zweier Östrogene, des Östrons und Östriols an In_2O_3 . Nachweis mit Ferrichlorid-Ferricyanid Reagens. Fliessmittel: Essigester. Laufzeit: 2 min. Probenmenge: 1 ng⁴.

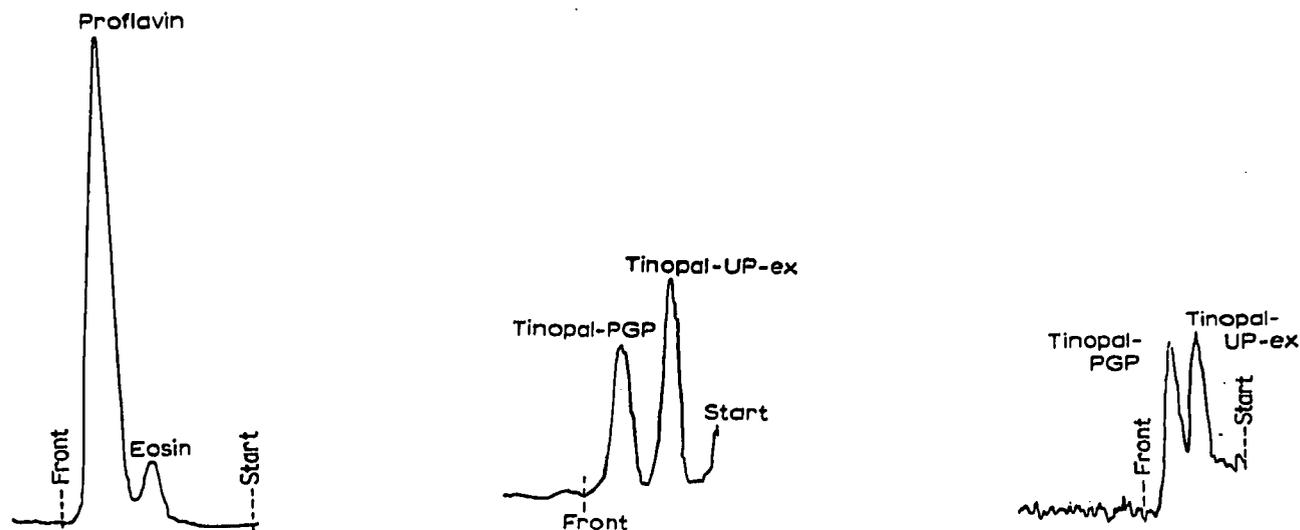


Fig. 11. Chromatogramm aufgenommen mit dem Zeissgerät¹¹. Trennung von Eosin und Proflavin an In_2O_3 . Fließmittel: Methanol-Acetonitril- NH_3 (25:25:5). Laufzeit: 3 min. Probenmenge: $2 \cdot 10^{-9}$ g.

Fig. 12. Chromatogramm aufgenommen mit dem Zeissgerät¹¹. Trennung von Tinopalen. Fließmittel: Methanol. Laufzeit: 3 min. Probenmenge: $2 \cdot 10^{-10}$ g. Am Start blieb eine Verunreinigung zurück.

Fig. 13. Chromatogramm aufgenommen mit dem Zeissgerät¹¹. Trennung von Tinopalen an In_2O_3 . Fließmittel: Methanol. Laufzeit: 3 min. Probenmenge: $4 \cdot 10^{-11}$ g. Schwankungen der Nulllinie durch Untergrundrauschen der Photozelle bedingt.

Farblose Substanzen müssen natürlich für die Erkennung sichtbar gemacht werden. Man kann hier meist nicht dieselben Reagenzien verwenden wie bei der TLC, da die Schicht gegen chemische Einflüsse empfindlicher ist und da bei den sehr geringen Substanzmengen die Anfärbung viel schwächer herauskommt. Doch gelang uns z.B. der Nachweis von Östrogenen und Aminosäuren nach den üblichen Methoden⁴. Fig. 10 zeigt eine Trennung von Östriol und Östron. Dabei konnte die Nachweisgrenze gegenüber der normalen TLC bei Anwendung derselben Anfärbemethode von $0.2 \mu\text{g}$ auf 0.2 ng , also um drei Zehnerpotenzen erniedrigt werden.

Zum Nachweis fluoreszierender Substanzen hatten wir ein Chromatogrammspektralphotometer der Firma Zeiss zur Verfügung. In Fig. 11 und 12 sind Chromatogramme von solchen Stoffen bei Aufgaben im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-10} g wiedergegeben¹³. In einigen Fällen gelang auch die Überführung nicht fluoreszierender Stoffe in fluoreszierende¹¹. Stoffe, die nur im gelösten Zustand fluoreszieren, kann man durch Besprühen mit Glycerin zur Fluoreszenz bringen¹⁰.

Wir haben auch die in der TLC viel verwendete Methode der Fluoreszenzlöschung auf einer fluoreszierenden Platte ausprobiert. Hier war das Problem die Herstellung der Platte. Es gelang, eine Aluminiumoxidplatte durch Verwendung eines Oxalsäure-Chromsäuregemisches für die anodische Oxidation so zu präparieren, dass sie eine genügend starke Fluoreszenz zeigte¹⁰. Fig. 13 bringt einen weiteren Versuch mit fluoreszierenden Substanzen, bei dem es gelang, in den Bereich von 10^{-11} g vorzustossen¹¹. Noch kleinere Stoffmengen kann man nachweisen, wenn sie radioaktive Elemente enthalten, entweder in Folge von Markierung oder von Aktivierung mit Neutronenbeschuss. Diese Methode kommt vor allem für den Nachweis anorga-

nischer Stoffe in Frage. Auf diese Weise haben wir z.B. Anionen des Phosphors und Schwefels getrennt¹². Den Beweis, welche Zone dem Phosphor und welche dem Schwefel zuzuschreiben ist, kann man dadurch erbringen, dass man einen zweiten photographischen Film über den ersten legt. Die vom Schwefel ausgehende Strahlung wird dann absorbiert und es erscheint auf dem Film nur mehr der Phosphor. Die Nachweisgrenze liegt bei diesen Versuchen bei 10^{-17} g.

DANK

Wir danken dem Petrol Research Fund der American Chemical Society für teilweise Unterstützung dieser Untersuchungen und der Firma Balzers A.G., Liechtenstein, für die Überlassung der Indiumoxidschichten.

ZUSAMMENFASSUNG

Flüssigkeitsfilme, die durch Spreitung einer Flüssigkeit auf einer Oberfläche entstehen, können als mobile Phase für chromatographische Trennungen verwendet werden. Mit dieser Methode kann man bereits in 10–100 sec sehr gute Trennungen schwer flüchtiger Substanzen erzielen. Es eignen sich hierfür besonders Oberflächen, die bei elektronenmikroskopischer Aufnahme im μ -Bereich eine Mikrorauigkeit zeigen. Dies trifft z.B. bei Aufdampfschichten von Indiumoxid zu, an denen auch die Abhängigkeit der Steighöhe von der Zeit beim Spreitvorgang bestimmt wurde. Die Änderung des Abstandes zwischen Startlinie und Front folgt bei nicht zu hohen Steighöhen (bis 2.5 cm) einem Zeitgesetz minus erster Ordnung. Der Geschwindigkeitskoeffizient κ steigt annähernd umgekehrt mit der Schichtdicke. Die Dicke der verwendeten Aufdampfschicht lag zwischen 0.6 und 3.6 μ . Es werden Beispiele gegeben für Trennungen von Indikatorfarbstoffen, Östrogenen und fluoreszierenden Stoffen. Die letzteren lassen sich mit Hilfe eines Zeiss-Spektralphotometers noch im Bereich von 10^{-11} g nachweisen. Bei den Östrogenen konnten $2 \cdot 10^{-10}$ g bei der Aufgabe in einer Verdünnung von 1 zu 10^6 nachgewiesen werden. Auch geätzte und nachträglich galvanisch oxidierte Al-Schichten eignen sich für scharfe und schnelle Trennungen von Farbstoffen. Mit Hilfe der Autoradiographie konnten ca. 10^{-14} g radioaktiver Schwefel und 10^{-10} g radioaktiver Phosphor als Sulfat bzw. Phosphat nachgewiesen werden.

LITERATUR

- 1 E. CREMER UND H. NAU, *Naturwiss.*, 55 (1968) 651.
- 2 E. CREMER, TH. KRAUS UND H. NAU, *Z. Anal. Chem.*, 245 (1969) 37.
- 3 L. REIMER, *Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1967, S. 347.
- 4 E. CREMER UND H. NAU, unveröffentlichte Messungen.
- 5 S. TURINA, Z. ŠOLJIĆ UND V. MARJANOVIĆ, *J. Chromatog.*, 39 (1969) 81.
- 6 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962, S. 100.
- 7 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962, S. 109.
- 8 E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 294.
- 9 K. L. WOLF, *Physik und Chemie der Grenzflächen*, 1. Bd., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1957, S. 238.

10 E. CREMER UND F. DEUTSCHER, unveröffentlichte Messungen.

11 E. CREMER UND P. FILL, unveröffentlichte Messungen.

12 E. CREMER UND E. SEIDL, *Chromatographia*, 3 (1970) 17.

DISCUSSION

SZÉKELY: Wie oft kann eine Dünnfilm-Platte regeneriert werden?

CREMER: Wir haben sie bis zu zomal ohne wesentliche Beeinträchtigung der Güte regenerieren können. Bei vorsichtiger Behandlung geht es sicher noch öfter.

SZÉKELY: Wird die Fa. Balzers diese Dünnfilme kommerziell herstellen? Wenn ja, dann ungefähr wann?

CREMER: Ich bin gerne bereit, diese Frage an die Firma Balzers weiterzuleiten. Einzelne Platten sind sicher schon jetzt zu haben. Wir haben mehrmals Platten erhalten, um sie auf ihre Reproduzierbarkeit zu prüfen. Wir waren mit der Reproduzierbarkeit des R_F -Wertes sehr zufrieden.

DE ZEEUW: How do the polarities of the solvents to be used in TFC compare with the solvents to be used for the same components in TLC? I noticed that for lipophilic color dyes you used methanol in TFC, whereas in TLC benzene is often used, which represents a rather big difference in polarity.

NAU: Zur Trennung von Indikatorfarbstoffen wie Eosin-NH₄, Bromphenolblau, Phenolrot und Buttergelb kann Methanol oder Methanol mit Zusätzen von Acetonitril, Essigester, Methylenchlorid und eventuell etwas Ammoniak (vgl. Fig. 6) verwendet werden. Das Fliessmittel auf Indiumoxidschichten muss im allgemeinen etwas polarer sein, als es für dasselbe Beispiel in der TLC angewendet wird.

Interessant ist jedoch, dass für die Trennung von Östrogenen (Fig. 10) auf Indiumoxid-Schichten dieselben Fliessmittel wie in der TLC verwendet werden können. Bewährt haben sich hier vor allem Aceton und Aceton-Methanol Gemische sowie Essigester und Essigester-Acetonitril Gemische.

DE ZEEUW: What types of solvents have to be used in TFC to separate rather polar substances?

NAU: Zur Trennung sehr polarer Verbindungen wie Aminosäuren mussten in der TFC genau wie in der TLC sehr polare Fliessmittel herangezogen werden. Verwendet wurden z.B. Methanol und ein Gemisch von Methanol-Butanol-Eisessig (100:10:0.3).

DE ZEEUW: I noticed that in the reproducibility experiments under various relative humidities methanol was used as solvent. I may add that when using methanol as solvent in TLC, reproducibility can be observed over a wide range of relative humidity, *i.e.* 20–80%, as well. This is so because in the rather polar methanol system the influence of different relative humidities is very small.

It may be of interest also to examine benzene as solvent in TFC because here the different relative humidities may have a more distinct effect.

NAU: Es gilt die Regel, dass der Einfluss der relativen Feuchte (r.F.) auf den R_F -Wert umso geringer ist, je wasserähnlicher das Fliessmittel. Die r.F.-Werte wurden von uns in einer einfachen, selbstgebauten Klimatisierkammer zwischen 0 und 95% variiert. Dabei ergaben sich R_F -Werte für Bromphenolblau auf 1.4 μ -Indiumoxid-Schichten mit Methanol als Fliessmittel zwischen 0.69 und 0.77 ($\pm 6\%$). In diesen Experimenten konnte also nicht der Einfluss der r.F. auf den R_F -Wert de-

monstriert werden. Es zeigte sich jedoch, dass trotz der geringen Steighöhen der Probe bzw. der Front von nur einigen Millimetern die R_F -Werte relativ genau mit einer maximalen Abweichung von $\pm 5\%$ bestimmbar sind.

Mit Benzol als Fliessmittel wurde der Einfluss der r.F. auf den R_F -Wert, der sicher grösser sein wird als mit Methanol, nicht gemessen.

TURINA: As the spots are very small, the curves on the last Fig. do not represent the distribution of the substances on the spot. This would be only possible if a photometer with a very small slit were used. This slit must be about 50 times smaller than the observed spot.

CREMER: Bei uns ist der Spalt breiter als der Fleck. Wir haben keine Schlüsse auf die Verteilung gezogen, sondern nur auf die Menge. Die Chromatogramme sind nicht repräsentativ für die Güte der Trennung.

J. Chromatog., 48 (1970) 132-142