

CHROM. 4461

BEEINFLUSSUNG DER REMISSIONSMESSUNG AN DÜNNSCHICHT-
CHROMATOGRAMMEN DURCH ARBEITSTECHNISCHE FAKTORENII. MITT. WAHL DER METHODE, BESCHAFFENHEIT DER STATIONÄREN
PHASE UND APPLIKATION DER SUBSTANZEN*

H. JORK

*Institut für Pharmahognosie und Analytische Phytochemie der Universität des Saarlandes***, 66 Saarbrücken 11 (B.R.D.)

SUMMARY

Influence of chromatographic factors on remission measurements on thin-layer chromatograms. Part I. Choice of the method, properties of the stationary phase and application of substances

Some introductory remarks are made concerning the choice of the determination method, and different methods are compared. Chromatographic factors affecting the spectrophotometric evaluation of thin-layer chromatograms are discussed. In connection with this, the layer thickness of the stationary phase, the grain-size distribution and the pore diameter of the adsorbent were investigated. In trace analyses using a stationary phase consisting of thin layers of finely granulated adsorbents having a small pore diameter, sensitivity can be increased by a factor of 10. It was found that there was no relationship between the direction in which the layer had been applied on the plates and that in which chromatography or measurement was carried out.

The manner of applying the solutions to be examined is also discussed, and the advantages of applying the solution as streaks or round spots, respectively, are pointed out. For this purpose the polarity of the standard and test solutions should be considered so that no disturbances due to formation of zones differing in area will occur. To obtain calibration curves according to the Kubelka-Munk equation, the ratio of the measured area to the zone area should be kept constant.

EINLEITUNG

Seit mehr als fünf Jahren gewinnt die quantitative Direktauswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen im analytischen Einsatzbereich der Methode an

* I. Mitt., *Intern. Symp. Chromatog., Electrophorèse, IV, Bruxelles, 1966*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1968, p. 227.

** Direktor: Prof. Dr. EGON STAHL.

Interesse^{5,8}. Untersuchungen haben gezeigt, dass zur Erfassung von Mikrogramm-Mengen zumeist direkte Bestimmungsmethoden eingesetzt werden müssen^{13,15} und dass unter diesen die photometrischen Verfahren günstig zu beurteilen sind. Entsprechend der Geräteausstattung und der Messmethode werden die densitometrischen Bestimmungsmethoden von den spektralphotometrischen Verfahren abgegliedert¹⁰. Eine weitere Unterteilung in Transmissions- und Reflexionsmessungen* ist zweckdienlich.

Als Mass für die Reproduzierbarkeit der spektralphotometrischen Auswertung wird in der Literatur zumeist eine relative Standardabweichung angegeben, die um $s = \pm 5\%$ liegt^{9,10,21}. Nur vereinzelt wurden diese Grenzen für zufällige Fehler nicht erreicht⁶. Der Grund hierfür kann in der Auswahl der Untersuchungsmethode oder in der Vorbereitung der Chromatogramme liegen.

AUSWAHL DER UNTERSUCHUNGSMETHODE

Jede analytische Messmethode kann nur dann sinnvoll angewandt werden, wenn die Schwerpunkte und Grenzen des Arbeitsbereiches bekannt sind. Das gilt in verstärktem Masse für mikroanalytische Verfahren. So ist z.B. die Verwendung von Densitometern auf den sichtbaren Spektralbereich beschränkt. Alle nicht-farbigen Substanzen müssen in messbare Hilfssubstanzen überführt werden. Die damit verbundene Problematik wurde des öfteren diskutiert^{1,10,22}.

Ebenfalls im sichtbaren Wellenlängenbereich arbeiten die Fluorimeter. Das nach der Anregung mit kurzwelliger Strahlung emittierte Licht wird—zumeist unzerlegt—zwischen $\lambda = 400$ und 800 nm gemessen⁷. Es lassen sich nur fluoreszierende Substanzen bestimmen.

Ein Spezialfall dieser Methode ist die Auswertung fluoreszenzmindernder Verbindungen auf fluoreszierenden stationären Phasen. Durch einen substanzbezogenen Filtereffekt wird die Primärstrahlung geschwächt, so dass die optische Dichte der Sekundärstrahlung an den mit Substanz beladenen Chromatogrammbereichen gegenüber der Umgebung verringert ist. Es handelt sich also hierbei um eine indirekte Absorptionsmessung, die mit Fluorimetern ausgeführt werden kann (vergl. Lit. 27). Die Empfindlichkeit der Methode wird durch den im Lambert-Beer'schen Gesetz definierten Absorptionskoeffizienten der chromatographierten Verbindung bestimmt, so dass die Nachweisgrenzen bei entsprechenden Messungen zumeist bei $1-3 \mu\text{g}$ liegen.

Eine Erweiterung des Messbereiches und eine Steigerung der Messempfindlichkeit wurde durch die Einführung des Chromatogramm-Spektralphotometers** erreicht. Mit diesem universell ausgestatteten Gerät können nicht nur Messungen im sichtbaren sondern auch im ultravioletten Spektralbereich durchgeführt werden²⁰. Zur Auswertung dient im Gegensatz zu den Densitometern eine substanzspezifische monochromatische Strahlung. Hierdurch kann die Messempfindlichkeit bedeutend erhöht werden. Es lassen sich Absorptionsvorgänge und Fluoreszenzerscheinungen direkt bestimmen, und zwar im Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm^{10,20}. Lediglich Verbindungen, die hier nicht absorbieren bzw. fluoreszieren (z.B. Terpen-Derivate und Triglyceride) können nicht direkt gemessen werden. Es ist eine Überführung in messbare Hilfssub-

* Wird nur die diffus reflektierte Strahlung bestimmt, so spricht man von Remissionsmessungen.

** Hersteller: Firma Carl Zeiss, 7082 Oberkochen/Württ., B.R.D.

stanzen notwendig, die mit den gleichen Schwierigkeiten verbunden ist, wie sie für die Densitometrie bekannt sind^{1,16}.

Zur Auswertung werden für Absorptionsmessungen 0.5 bis 5 μg Substanz benötigt, während bei Fluoreszenzmessungen bereits 5 bis 500 ng ausreichen. Es handelt sich hierbei also um ein Auswerteverfahren des mikroanalytischen Arbeitsbereiches, das auch nur hier eingesetzt werden sollte!

Diese Überlegungen zeigen, dass auch der Vorbereitung einer Analyse grösste Aufmerksamkeit gewidmet werden muss. Da weder in Betriebsanleitungen der Geräte noch in der Literatur hierauf näher eingegangen wird, sollen im folgenden einige Faktoren besprochen werden, die die Direktauswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen beeinflussen, mit der eigentlichen Messung jedoch nichts zu tun haben.

WAHL UND BESCHAFFENHEIT DER STATIONÄREN PHASE

Direkte Absorptions- und Fluoreszenzmessungen sind grundsätzlich auf allen in der Chromatographie gebräuchlichen Sorptionsmitteln durchführbar. Auch Imprägnierungen, mit Ausnahme grösserer Silbernitrat-Mengen, stören die Auswertung zumeist nicht.

Schichtdicke und Messwert

Die unter Standardbedingungen hergestellten stationären Phasen sind bezüglich ihrer Schichtdicke von 250 μm für spektralphotometrische Remissionsmessungen zumeist gut geeignet (vergl. Fig. 1). Bei gleicher Auftragemenge von Sudanrot G, Thebain und Coffein steigt der Messwert auf Grund der räumlichen Substanzverteilung

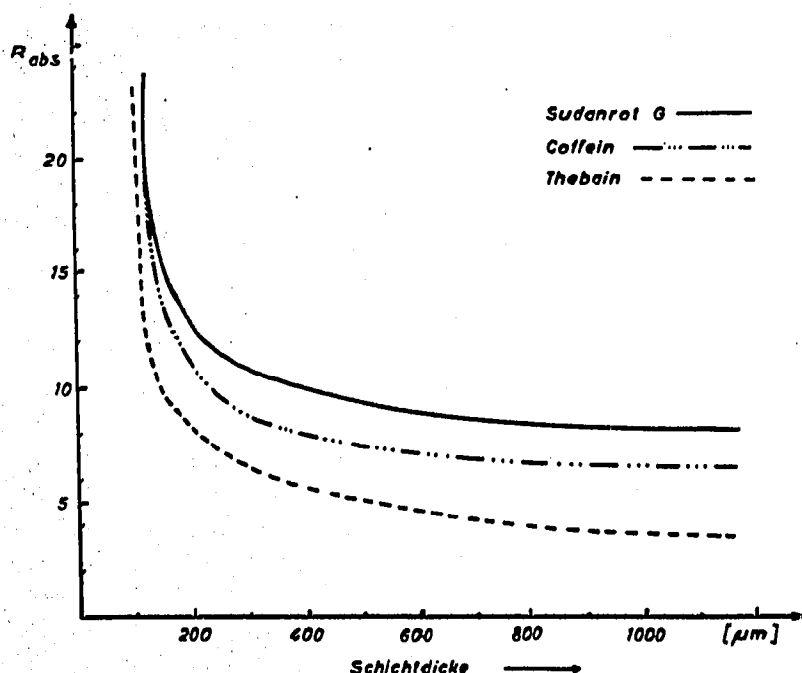


Fig. 1. Messwerte des Sudanrots G (—), Coffeins (— · · —) und Thebains (— — —) in Abhängigkeit von der Schichtdicke der stationären Phase.

lung mit fallender Schichtdicke an und erreicht unterhalb von $250\ \mu\text{m}$ ein Maximum. Hieraus ergeben sich für die Praxis drei Folgerungen, auf die näher eingegangen werden soll.

Schichtdickendifferenzen

Durch den steilen Anstieg der Messwerte zu dünnen Schichten hin lässt sich vermuten, dass in diesem Bereich geringe Schichtdicken-Unterschiede zu grösseren Differenzen der Messergebnisse führen. Wie aus früheren Untersuchungen hervorgeht¹², liegt die relative Standardabweichung für den zufälligen Schichtdickenfehler der gleichen DC-Platte zwischen $s = \pm 3$ und 9% . Für die Remissionsmessungen ergibt sich hieraus ein zufälliger Fehler von $s = \pm 1$ bis 2.5% . Diese Angaben beziehen sich auf $20 \times 20\ \text{cm}$ grosse Platten. Da der Messwert in der Praxis auf die Umgebung eines Chromatogrammflckes bezogen wird, und nicht auf ferner liegende Bereiche, verringert sich dieser zufällige Fehler beträchtlich. Das gilt sowohl für selbsthergestellte Schichten als auch für fabrikmässig vorgefertigte DC-Platten oder -folien.

Einfluss der Teilchengrösse

Die zweite Aussage, die auf Grund des Kurvenverlaufes in Fig. 1 gemacht werden kann, bezieht sich auf Spurenanalysen. Zur Untersuchung kleinster Substanzmengen sollte eine möglichst dünne stationäre Phase eingesetzt werden, weil hier der Messwert entsprechend gross ist. Dieser Interpretation sind jedoch dadurch Grenzen gesetzt, dass die Teilchengrösse der zumeist verwendeten Sorbentien im Durchmesser um $50\ \mu\text{m}$ liegt. Sinkt die Dicke der Trennschicht unter $150\ \mu\text{m}$ ab, so tritt zu viel Lichtenergie durch die stationäre Phase¹⁸ hindurch und entgeht so der Auswertung. Es wird nur noch ein Teil der Lichtenergie remittiert. Die Messungen

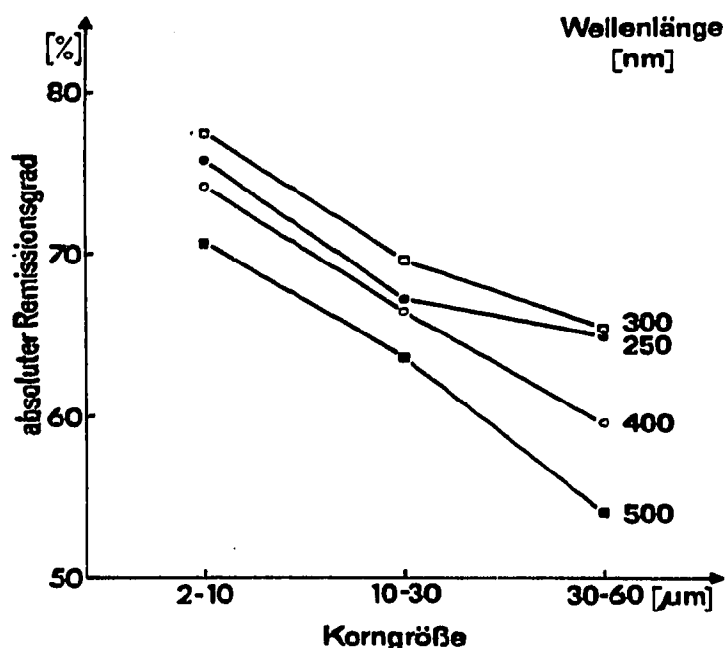


Fig. 2. Änderung des absoluten Remissionsgrades in Abhängigkeit von der Korngrössenverteilung und der Messwellenlänge bei einer Schichtdicke von $170\ \mu\text{m}$.

können nicht nach den für die Remission gültigen Gesetzen ausgewertet werden.

Abhilfe lässt sich durch die Verwendung feiner körniger Sorbentien schaffen. Fig. 2 zeigt, dass sich der absolute Remissionsgrad bei gleicher Schichtdicke mit abnehmender Korngrösse erhöht. Die Anzahl der Reflexionsvorgänge wird vergrössert. Schon mit unbewaffnetem Auge lässt sich erkennen, dass eine 100 μm dicke Kieselgel-Schicht aus einer feinkörnigen stationären Phase (Teilchendurchmesser 2–10 μm) weisser aussieht als eine doppelt so dicke, grober körnige Kieselgel HR-Schicht.

Einfluss der Porenweite

Zu analogen Ergebnissen wie bei der Korngrössenverteilung führen Untersuchungen des Porengrösseneinflusses. Wird der Remissionsgrad an Kieselgelen gleicher Korngrösse und Schichtdicke, jedoch unterschiedlich grosser Zylinderporen-Durchmesser bestimmt, so nimmt der Messwert zur kleineren Porenweite hin zu. Sorbentien mit Poren von 20 Å Durchmesser remittieren stärker die eingestrahlte Energie als solche mit 50–70 Å.

ANWENDUNG AUF DIE PRAXIS

Die erwähnten Effekte einer Messwerterhöhung durch Verkleinerung der Korngrösse und der Porenweite lassen sich zur Steigerung der Messempfindlichkeit heranziehen. Stehen für die Auswertung nur kleine Substanzmengen zur Verfügung, so sollten feinkörnige und engporige Sorbentien als stationäre Phasen verwandt werden. Die Schichtdicke lässt sich dann ohne grössere Störungen auf 100 μm verringern. Gegenüber 250 μm dicken Schichten muss sich bei gleicher Auftragemenge aus Gründen der räumlichen Substanzverteilung auf den dünneren Trennschichten relativ mehr Substanz an der Oberfläche befinden und somit zur Messung gelangen.

Diesem Effekt einer Empfindlichkeitssteigerung überlagert sich noch ein zweiter. Auf Grund der vermehrten Reflexionsvorgänge wird die als Film auf den Partikelchen der Trennschicht vorhandene Substanz häufiger durchstrahlt als bei grober körnigen und weiter porigen Sorbentien. Folglich vergrössert sich der Messwert für die substanzspezifische Absorption bzw. Emission. Dieser Effekt entspricht einer Schichtdickenvergrösserung bei Küvettenmessungen.

Bei diesen Überlegungen sollte jedoch auch bedacht werden, dass sich durch die Veränderung des chromatographischen Systems die Trenneigenschaften der stationären Phase verschieben²³. Durch die Verringerung der Teilchengrösse und Porenweite verkleinert sich z.B. der hR_F -Wert, so dass u.U. polarere Fließmittel zur Trennung benutzt werden müssen als bei den üblicherweise verwandten Sorbentien. Auch die Grösse der Chromatogrammzonen ändert sich. Dass dieser Effekt die Spektrenaufnahme auf dem Chromatogramm nicht störend beeinflusst, zeigt Fig. 3. Die Lage der Absorptionsbanden ist bei allen drei Remissionsspektren die gleiche. Es findet lediglich eine geringe Verschiebung der Intensitätsverteilung der einzelnen Banden zueinander statt, ein Effekt, der auf einer Änderung des Streukoeffizienten in Abhängigkeit von der Porenweite und Wellenlänge zurückzuführen ist.

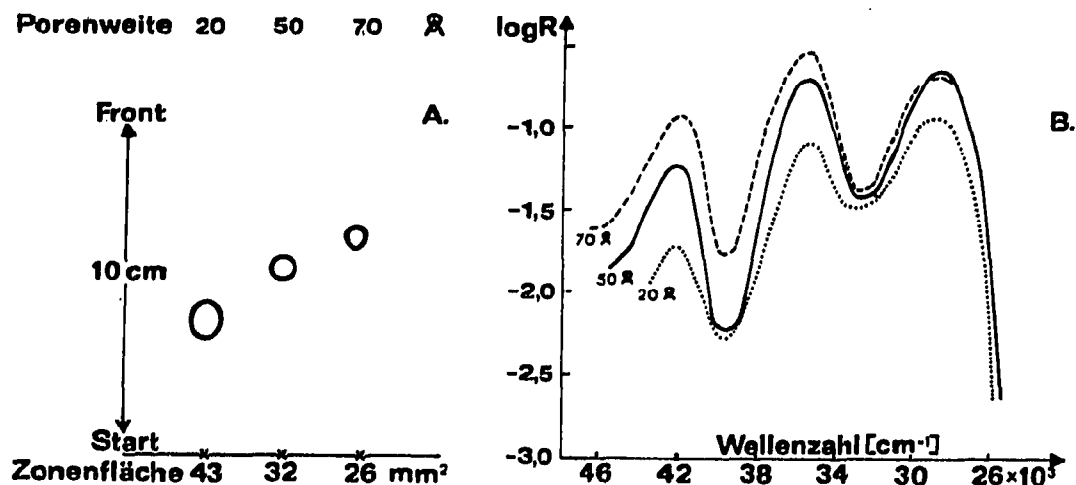


Fig. 3. Einfluss der Porengrösse des Kieselgels auf die Verteilung des 2,3,5-Trimethoxybenzaldehyds im Chromatogramm (A) und den Remissionspektren-Verlauf der Substanz (B).

CHROMATOGRAPHIER- UND MESSRICHTUNG

Beim praktischen Arbeiten stellt sich zuweilen die Frage, ob in der Streichrichtung der Chromatogramme entwickelt werden soll oder quer dazu. Entsprechende Untersuchungen haben ergeben, dass beim Vorliegen einer homogenen Sorptionschicht die Chromatographier-Richtung für die Ausbildung der Fleckform keine wesentliche Rolle spielt.

Auch für die Reflexionsmessungen gibt es keine Vorzugsrichtung¹⁰. Die entsprechend ausgeführten goniophotometrischen Messungen ergaben im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmende Kurven, die von dem Beschichtungsvorgang der Trägerplatten/-folien unabhängig sind. Die polierte Oberfläche der meisten Trägermaterialien stört oberhalb einer Schichtdicke von etwa 80 μm das Messergebnis nicht.

APPLIKATION DER UNTERSUCHUNGSLÖSUNG

Üblicherweise dienen zur Dosierung kleiner Flüssigkeitsmengen Pipetten oder Mikrospritzen. Die Auftragung des Untersuchungsgutes kann band- oder punktförmig erfolgen. Eine generelle Entscheidung, welche Form zur quantitativen Auswertung die günstigste ist, kann z.Zt. noch nicht getroffen werden.

Kreisförmige Startzonen werden immer dann gewählt, wenn die zur Verfügung stehende Substanzmenge bzw. die Lösungsvolumina gering sind. Solche Startzonen besitzen allerdings den Nachteil, dass nach der Entwicklung häufig die Trennschärfe schlechter ist als bei Chromatogramm-Bändern²⁵. Die Konzentration pro Flächeneinheit ändert sich zweidimensional und die Zonengrösse nimmt bei unvorsichtiger Auftragung mit der Substanzmenge zu, ein Effekt, der bei quantitativen Arbeiten nicht erwünscht ist.

Beim strichförmigen Auftragen treten diese Störungen in weit geringerem Masse auf¹⁷. Nur an den seitlichen Enden der Bänder ist ein zweidimensionaler Abfall der Substanzmenge pro Fläche zu beobachten. Im mittleren Bereich liegt bei auto-

matisch aufgetragenen Zonenbändern eine homogene Verteilung längs der Hauptachse vor, so dass nur senkrecht dazu eine Konzentrationsänderung auftritt. Um eine exakte Messung durchführen zu können, müssen die Zonenprofile nach der Chromatographie geradlinig und parallel zueinander verlaufen.

Bandförmiges Auftragen

Während bei elektrophoretischen Arbeiten ein strichförmiges Auftragen üblich ist, liegen bei papier- und dünn-schicht-chromatographischen Arbeiten zumeist runde Startzonen vor. Der Grund ist vermutlich darin zu suchen, dass es nur wenige Geräte gibt, mit denen kleinste Flüssigkeitsmengen automatisch und reproduzierbar bandförmig aufgetragen werden können^{2,20,28}.

In diesem Zusammenhang wird häufig der sogenannte Autoliner nach STAHL* benutzt^{3,25}. Es ist eine mit Gasdruck betriebene, elektronisch gesteuerte Dosierapparatur, die aus einem feststehenden Pipettenteil und einem schrittlartig sich bewegendem Auflagetisch für DC-Platten besteht. Eine Zusammenstellung der wichtigsten Kennzahlen im Hinblick auf die Einsatzmöglichkeiten des Gerätes bei der quantitativen Direktauswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen gibt die Tabelle I.

Beim quantitativen Arbeiten auf Dünnschicht-Chromatogrammen hat sich die strichförmige Auftragung bisher nicht einführen lassen. Auf 20 cm breiten DC-Platten

TABELLE I

ZUSAMMENSTELLUNG DER WICHTIGSTEN KENNZAHLEN ZUM AUTOLINER NACH STAHL

(1) *Kennzeichnung der Pipetten*

Volumen (ml)	0.1	1.0	5.0
Skaleneinteilung (μ l)	1.0	10.0	100.0
Ablesbarkeit (μ l)	0.5	5.0	30.0

(2) *Reproduzierbarkeit der Volumendosierung (0.35 atm, 0.10 mm Kanüldurchmesser)*

Volumen (ml)	0.05	0.05	0.04
Rel. Standardabweichung (%)	1.1	1.8	1.4
Anzahl der Messungen	5	7	9

(3) *Reproduzierbarkeit der Druckeinstellung (0.35 atm)*

Rel. Standardabweichung (%)	3.5	1.5	3.9
Anzahl der Messungen	8	11	9

(4) *Reproduzierbarkeit des DC-Platten-Vorschubs*

Fahrdauer (sec)	4.9	7.4	9.0
Rel. Standardabweichung (%)	1.5	0.9	0.6
Anzahl der Messungen	12	9	10

(5) *Totvolumen des Magnetventils*

Prototyp: 1.2 ml; Seriengerät: 1.3 ml

(6) *Reproduzierbarkeit des gemessenen Remissionsgrades*

(a) Gleicher Bandbereich			
Rel. Standardabweichung (%)	0.07	0.05	0.09
Anzahl der Messungen	12	8	13
(b) Benachbarte Bandbereiche			
Rel. Standardabweichung (%)	0.6	0.7	0.8
Anzahl der Messungen	9	9	9

* Hersteller: Fa. C. Desaga, 69 Heidelberg, Maasstrasse.

können nur fünf bis sechs Startbänder aufgetragen werden. Hiervon sind drei bis vier für Eichwerte bestimmt, sofern nicht mit einem inneren Standard gearbeitet wird, so dass nur ein bis zwei Proben pro Chromatogramm quantitativ gemessen werden können.

Werden 40 cm lange DC-Platten eingesetzt, so stört zuweilen die verlängerte Auftragszeit. Auch ist von der Chromatographie her nicht immer ein paralleler Zonenverlauf zu erreichen, so dass sich die Reproduzierbarkeit verschlechtert. Es soll darum im Vergleich zu diesen Ergebnissen nachfolgend auf die punkt- bzw. kreisförmige Auftragung der Startzonen eingegangen werden.

Punkt förmiges Auftragen

Von den zahlreichen Pipettentypen und Mikrospritzen eignen sich die Mikrometer-Kolbenspritzen am besten zur punktförmigen Applikation von Lösungen. Entsprechende Untersuchungen haben gezeigt, dass eine gute Reproduzierbarkeit der Auftragung erreicht wird¹¹, wenn auf die in Fig. 4 kenntlich gemachten Faktoren geachtet wird.

(a) Der Anschliff der 15 mm kurzen, in den Glaskörper einzementierten Kanüle soll für Sorptionsschichten der Standarddicke 20–25° betragen. Er soll möglichst nicht "bogig" verlaufen. Kanülen mit Meissel- oder Lanzenspitze bzw. Pic-Indol Kanülen bieten ebenfalls keine Vorteile. Ein rechtwinkliger Anschliff der 0.10 mm weiten Kanüle führt leicht zu einem Verstopfen der Austrittsöffnung.

(b) Für eine gute Reproduzierbarkeit der Auftragung ist weiterhin wichtig,

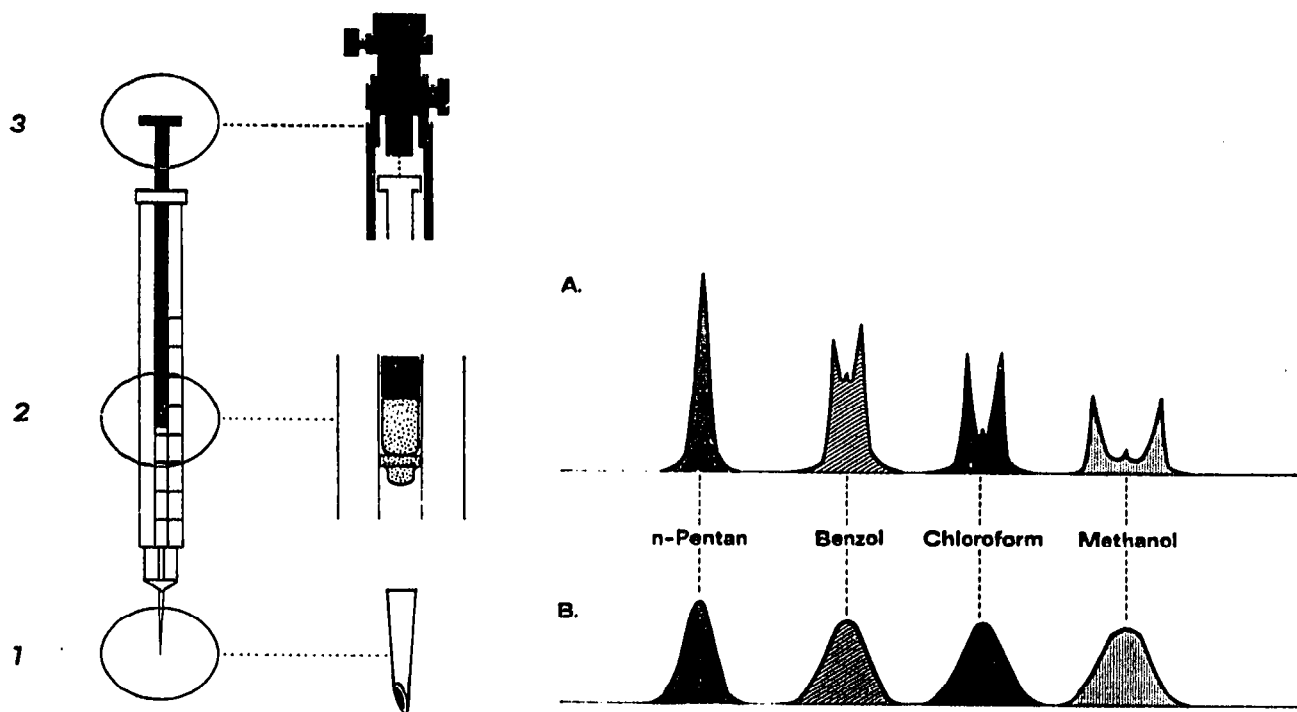


Fig. 4. Konstruktive Verbesserungsvorschläge zu handelsüblichen Kolbenspritzen, die zu einer Erhöhung der Präzision bei der Volumendosierung führen (Einzelheiten s. Text).

Fig. 5. Absorptions-Orts-Kurven, die das Zonenprofil von je 4.7 μg Petersilienapiol in Abhängigkeit vom Lösungsmittel darstellen. (A) Substanzverteilung im Startzonenbereich. (B) Verteilungsprofil nach der Chromatographie in Benzol p.a.

dass bei Kolbenspritzen keine Flüssigkeit zwischen Kolben und äusseren Spritzenkörper hochgedrückt werden kann. Entsprechend angebrachte Teflon-Dichtungen sorgen wie bei gasdichten Spritzen für eine exakte Passform.

(c) Damit auch beim senkrechten Auftragen spezifisch schwerer Flüssigkeiten, wie beispielsweise Chloroform, der Kontakt zwischen Kolbenknopf und Mikrometerspindel gewährleistet ist, empfiehlt sich die Verwendung einer Magnetkopplung zwischen beiden Teilen. Auf dem Kolbenknopf wird ein Eisenplättchen aufgeklebt, das durch die magnetisch gemachte Mikrometerspindel angezogen wird. Behelfsweise lässt sich auch ein guter Kontakt mit handelsüblichen Klebemitteln erreichen.

Mit einer so ausgerüsteten nachgeichteten Mikrometerspritze lassen sich Auftragungen durchführen, deren relative Standardabweichung bei einem Volumen von $10.0 \mu\text{l} s = \pm 0.6\%$ beträgt.

STARTZONENPROFIL UND LÖSUNGSMITTEL

Bei vorgegebener stationärer Phase und Probe hängt die Substanzverteilung in der Startzonenregion nur noch von dem Lösungsmittel ab, das zur Auftragung verwendet wird²⁴. Ist dieses unpolar—bezogen auf das Untersuchungsgut—oder löst sich die Substanz schlecht darin, so lagern sich die Moleküle der Verbindung in unmittelbarer Nähe der Auftragestelle ab. Je polarer die Auftragleistung gewählt wird, desto weiter wird die Verbindung radial nach aussen transportiert. Es kommt bekanntermassen zur Ausbildung von Ringchromatogrammen (vergl. Fig. 5). Hieraus resultieren für die praktischen Arbeiten folgende Ergebnisse.

(1) Die Substanzverteilung in der Startzone wird nicht durch die Grösse des "nassen" Auftrageflecks bestimmt. Wird dieser beispielsweise mit 5 mm im Durchmesser konstant gehalten, so ist der effektive Radius der Substanzzone bei Methanol als Lösungsmittel grösser als bei *n*-Pentan.

(2) Um eine gute Reproduzierbarkeit bei der Auftragung zu erhalten, werden am besten polare Lösungsmittel eingesetzt. In der Nähe der Kanülenspitze befinden sich dann nur wenige Moleküle der Untersuchungssubstanz, die bei einem unsachgemässen Abheben der Mikrometerspritze von der Schicht mit entfernt werden könnten.

(3) Eine weitere Konsequenz ergibt sich für die Herstellung von Eich- und Untersuchungslösungen. Da bei der quantitativen Direktauswertung konstant grosse Fleckflächen gefordert werden¹⁰, müssen die Eich- und Untersuchungslösungen in ihrer Polarität einander entsprechen. Diese Voraussetzung ist am einfachsten dadurch zu erreichen, dass für beide Lösungen das gleiche Lösungsmittel verwendet wird. Treten dennoch Differenzen zur Untersuchungslösung auf, so müssen bei quantitativen Untersuchungen der Eichlösung weitere Komponenten zugesetzt werden.

Als ein Beispiel möge die Bestimmung des Dibucain-Hydrochlorids in Injektionslösungen gelten (Fig. 6). Ausser weiteren Wirkstoffen enthalten die Ampullen etwa 30% 1,2-Propylenglykol. Wird der Eichlösung dieser Lösungsvermittler nicht zugegeben, so resultieren Messwerte, die um 20% zu hoch liegen. Nach Zugabe von 1,2-Propylenglykol nähert sich das Ergebnis dem theoretischen Wert, der erst nach vollständiger Abstimmung der Lösungen aufeinander erreicht werden kann.

(4) Verantwortlich für diese Messwertdifferenzen ist eine Störung des Flächenverhältnisses: Chromatogrammzone / Messöffnung des Auswertegerätes. Nach dem

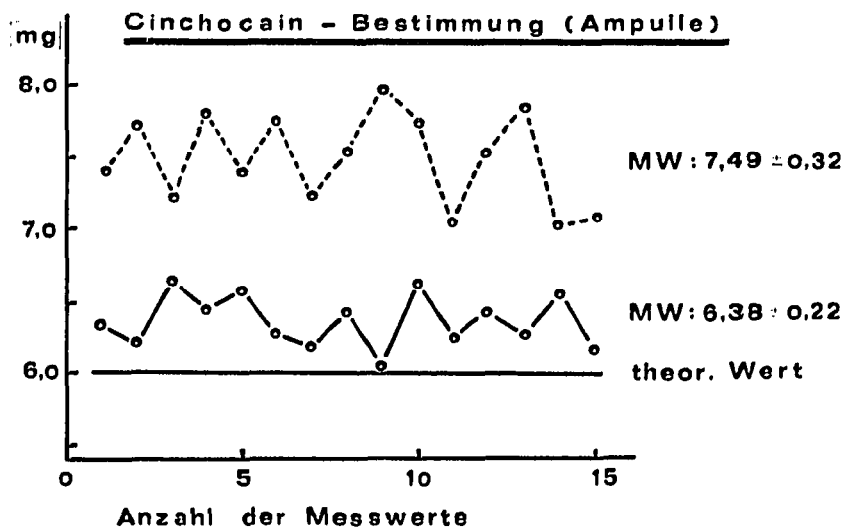


Fig. 6. Bestimmung des Dibucain-Hydrochlorids in Abhängigkeit von der Substanzverteilung im Chromatogramm (Einzelheiten s. Text).

Auftragen mit gleicher Startzonengröße liefert eine in Benzol gelöste Substanz nach der Entwicklung eine kleinere Chromatogrammzone als die gleiche Auftragemenge einer entsprechenden Methanollösung. Dies zeigt auch die Fig. 7. Auf Einzelheiten wird in einer späteren Mitteilung näher eingegangen.

APPLIKATION DER EICHLÖSUNG

Wiederholt wurde festgestellt, dass für quantitative Untersuchungen die Zonenfläche konstant gehalten werden soll. Dies ist beim Auftragen der Eichlösung am besten dadurch zu erreichen, dass jeweils gleiche Volumina einer entsprechend gewählten

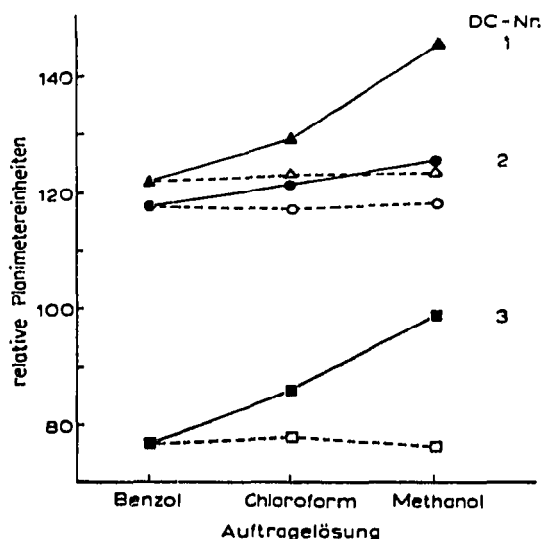


Fig. 7. Änderung des Messwertes bei der Coffeinbestimmung in Abhängigkeit von der Auftragelösung und Messfläche. Wird die Messöffnung konstant gross gehalten, so resultieren bei drei verschiedenen Dünnschicht-Chromatogrammen die Messwerte der durchgezogenen Kurven. Bei Angleich der Messöffnung an die Größe des Chromatogrammflckes (konstantes Flächenverhältnis) ergeben sich die gestrichelt verbundenen Werte.

Verdünnungsreihe aufgetragen werden. Für die Praxis bedeutet diese Vorgehensweise einen grossen Zeit- und Arbeitsaufwand. Abgesehen von der Erstellung der Verdünnungsreihe muss die Auftragespritze nach jedem Arbeitsgang gereinigt, getrocknet und neu gefüllt werden, bevor sie wieder in die Halterung eingeklemmt wird und die Auftragung erneut beginnen kann. Es wurde darum untersucht, wie der Eichkurvenverlauf ausfällt, wenn von der eingestellten Eichlösung unterschiedliche Volumina aufgetragen werden. Die zahlreichen Messungen ergaben, dass bei vorsichtigem Arbeiten gleich grosse Startzonen resultieren können. Zum Abdunsten des Lösungsmittels kann während der Auftragung ein Ventilator oder eine heizbare Unterlage benutzt werden, sofern das Untersuchungsgut nicht beeinträchtigt wird. Der zufällige Fehler der Auftragung bleibt bei der Applikation unterschiedlich grosser Volumina der gleiche wie bei der Verwendung einer Verdünnungsreihe. Es verringert sich allerdings der Messbereich um 10–20%. Im Extremfall resultieren keine Eichgeraden sondern Kurven. Da die äusseren Arbeitsbedingungen nicht konstant gehalten werden, wird der Bereich der Kubelka–Munk Funktion eingeschränkt.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die freundliche Bereitstellung von Personal- und Sachmitteln, Fräulein INGE HÖGL für die zuverlässige und gewissenhafte Mithilfe bei den Messungen bestens gedankt.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einführenden Bemerkungen zur Wahl des Bestimmungsverfahrens und zur Abgrenzung der Methoden gegeneinander, wird auf Einflussfaktoren bei der spektralphotometrischen Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen eingegangen, die von der Chromatographie her die Messung beeinflussen können. Es werden insbesondere die Schichtdicke der stationären Phase, die Korngrössenverteilung und die Porenweite des Sorptionsmittels untersucht. Durch das Arbeiten auf dünnen stationären Phasen aus feinkörnigen und engporigen Sorbentien lässt sich bei Spurenanalysen eine Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 10 erreichen. Es kann keine Beziehung zwischen der Streichrichtung der DC-Platten und der Chromatographie- bzw. Messrichtung festgestellt werden.

Es wird weiterhin die Applikation der Untersuchungslösungen besprochen, und auf die Vorteile der band- bzw. punktförmigen Auftragung hingewiesen. Dabei sollen die Eich- und Untersuchungslösungen in ihrer Polarität aufeinander abgestimmt sein, damit keine Störungen durch unterschiedlich grosse Zonenausbildung auftreten. Die Relation von Messfläche zu Zonenfläche muss konstant gehalten werden, damit nach der Kubelka–Munk Funktion Eichgeraden resultieren.

LITERATUR

- 1 I. E. BUSH, *Methods Biochem. Anal.*, 11 (1963).
- 2 P. J. CURTIS, *Chem. Ind. (London)*, (1966) 247.
- 3 E. DUMONT, *Dissertation*, Saarbrücken, 1968.
- 4 J. W. FAIRBAIRN, in E. J. SHELLARD, (Herausgeber), *Quantitative Paper and Thin-layer Chromatography*, Academic Press, London, New York, 1968, S. 1.
- 5 H. GÄNSHIRT, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 133.

- 6 W. HUBER, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 378.
- 7 D. JÄNCHEN UND G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 391.
- 8 H. JORK, *J. Pharm. Belg.*, (1963) 213.
- 9 H. JORK, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 17.
- 10 H. JORK, *Cosmo Pharma*, 3 (1967) 33.
- 11 H. JORK, in E. J. SHELLARD (Herausgeber), *Quantitative Paper and Thin-layer Chromatography*, Academic Press, London, New York, 1968, S. 79.
- 12 H. JORK, *Pharma International*, 4 Nr. 1 (1968) 11.
- 13 H. JORK, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 297.
- 14 H. JORK, *Chimia*, 23, Nr. 1 (1969) 17.
- 15 H. JORK, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 310.
- 16 H. JORK, *Habilitationsschrift*, Saarbrücken, 1969.
- 17 R. KLAUS, *J. Chromatog.*, 40 (1969) 235.
- 18 G. KORTÜM, *Reflexionsspektroskopie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1969.
- 19 E. MUTSCHLER, K. KRAUS UND H. ROCHELMMEYER, *J. Chromatog.*, 40 (1969) 244.
- 20 S. SAMUELS, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 751.
- 21 N. SEILER UND H. MÖLLER, *Chromatographia*, 2 (1969) 273, 319.
- 22 E. J. SHELLARD (Herausgeber), *Quantitative Paper and Thin-layer Chromatography*, Academic Press, London, New York, 1968 S. 51.
- 23 E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 294.
- 24 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
- 25 E. STAHL UND E. DUMONT, *J. Chromatog.*, 39 (1969) 157.
- 26 E. STAHL UND H. JORK, in *C. Zeiss: 75 Jahre optische Messinstrumente*, Zeiss & Co., Aalen/Württ., 1968, S. 60.
- 27 W. TAUSCH, *Chimia*, 23, Nr. 1 (1969) 17.
- 28 F. A. VANDENHEUVEL, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 102.
- 29 *Druckschrift 50—657/K-d*, C. Zeiss, Oberkochen, Württ.

J. Chromatog., 48 (1970) 372–383

SECTION VII

IDENTIFICATION OF INORGANIC COMPOUNDS