

CHROM. 5489

## ZUR STANDARDISIERUNG DER DIREKTEN SPEKTROPHOTOMETRISCHEN AUSWERTUNG VON CHROMATOGRAMMEN

## I. SIMULTANE TRANSMISSIONS- UND REMISSIONSMESSUNGEN

L. R. TREIBER\*, R. NORDBERG UND S. LINDSTEDT

*Institut für Klinische Chemie der Universität Göteborg, Sahlgrenska Sjukhuset, 413 45 Göteborg (Schweden)*

UND

P. STÖLLNBERGER

*C. Zeiss Zweigniederlassung, Sonnenstrasse 19, 8000 München (B.R.D.)*

(Eingegangen am 9. März 1971)

## SUMMARY

*Standardisation of the direct spectrophotometric quantitative analysis of chromatograms. I. Simultaneous transmittance and reflectance measurements*

An improved method for the direct spectrophotometric evaluation of thin-layer chromatograms is described. The simultaneous transmittance and reflectance measurement on the same track results in a constant baseline. The advantages of this new method are as follows: increased sensitivity and reproducibility, a linear relationship between the recorded peaks and the amounts present. The possibilities of further technical development and its significance for the research are discussed.

## EINFÜHRUNG

Die verschiedenen chromatographischen Trennverfahren stellen heute die methodischen Voraussetzungen der chemischen und biochemischen Mikroanalyse, sowohl bei der routinemässigen als auch der wissenschaftlichen Arbeit dar. Das Ziel der chromatographischen Aufarbeitung ist gewöhnlich die qualitative und meistens auch die quantitative Erfassung der Komponenten.

Die Auswahl der geeigneten Technik hängt immer von den physikochemischen Eigenschaften der zu analysierenden Substanzen ab. So bezweifelt heutzutage niemand, dass für Substanzen, die selbst flüchtig und beständig sind, oder sich mit gut kontrollierbaren Reaktionen in temperaturstabile, flüchtige und für die Verbindung charakteristische Derivate überführen lassen, eine universale Standardmethode zur Verfügung steht: die Gaschromatographie. Sie ermöglicht — analog zur automatisierten Säulenchromatographie — die quantitative Messung der einzelnen Fraktionen während der Auftrennung. Man kann wohl behaupten, dass die "direkte Auswertung" von Gas- und Säulenchromatogrammen eine gut ausgearbeitete und in der Praxis hervorragend bewährte Arbeitsmethode ist. Viel umstrittener ist die analoge Arbeitsweise für die Papier- und Dünnschichtchromatographie. Dass Densito-

\* Gegenwärtige Adresse: Astra AB, AFC, Abteilung für Analytische Chemie, 15 185 Södertälze, Schweden.

meter nicht ausreichend quantitativ arbeiten<sup>1</sup>, ist in vielen Fällen darauf zurückzuführen, dass die Anfärbungsreaktion — die wohl im Reagenzglas brauchbare Resultate zu liefern vermag — auf dem entwickelten Chromatogramm unkontrollierbar abläuft. Mit Veränderungen des Adsorbents muss bei Anwendung von Sprayreagenzien ebenfalls immer gerechnet werden. Die letztgenannte Fehlerquelle konnte durch die während der letzten Jahre entwickelten Zweistrahngeräte (Chromoscan, Fa. Joyce, Loebel & Co., Ltd., Princesway, Team Valley, Gateshead 11, Great Britain; Schoeffel SD 3000, Schoeffel Instrument Co., Westwood, N.J., U.S.A.) einigermaßen ausgeglichen werden. Trotz mathematischer Schwierigkeiten und einer Reproduzierbarkeit, die schlechter ist, als diejenige der herkömmlichen Photometrie, zeigt die Densitometrie\* eine stark zunehmende Tendenz. Hohe Empfindlichkeit und grosser Zeitgewinn kennzeichnen diese Messmethode. Ihre Zuverlässigkeit wurde stets verbessert und besitzt in vielen Fällen ausreichende Sicherheit, da die gewöhnliche Photometrie durch die Aufarbeitung von Chromatogrammen ebenfalls mit Fehlerquellen (Elutionsverluste, Zerstörungsprozesse u.s.w.) behaftet ist.

#### APPARATUR UND MATERIAL

Die Untersuchungen wurden mit einem Vitatron-Densitometer (Modell VFD 500, Vitatron, Dieren, Die Niederlande), Schoeffel-Densitometer (Modell SD 3000, Schoeffel Instrument Co., Westwood, N.J., V.S.A.) und Zeiss-Chromatogrammspektralphotometer (Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., D.R.D.) durchgeführt.

Weitere Hilfsausrüstung: Elektronischer Integrator (Hewlett-Packard, Modell 3370 A), registrierender Spektralphotometer Zeiss DMR 21. Verwendet wurden selbstbeschichtete Dünnschichtplatten aus aktiviertem Kieselgel G (Fa. E. Merck AG., Darmstadt). Als Modellsubstanzen dienten: 17 $\beta$ -Hydroxy-4-androsten-3-on-2,4-dinitrophenylhydrazon (Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon = "Testo-2,4-DNPH";  $\lambda_{\max.} = 385$  nm), 3 $\beta$ -Hydroxy-5-androsten-17-on-2,4-dinitrophenylhydrazon (Dehydroepiandrosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon = "DHEA-2,4-DNPH";  $\lambda_{\max.} = 365$  nm) und Sudanrot für die Chromatographie (C.I. 26100;  $\lambda_{\max.} = 515$  nm). Vor der Verwendung wurden alle Substanzen auf chromatographische und spektrophotometrische Reinheit geprüft.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Zur Untersuchung des Messverfahrens wurden solche Modellsubstanzen ausgewählt, die bei einer bestimmten Wellenlänge innerhalb des Spektralbereiches der Geräte ein Absorptionsmaximum haben. Die Dünnschichtplatten wurden aus Kieselgel G mit Hilfe einer Quickfit Beschichtungsausrüstung hergestellt. Schichtdicke: 0.25 mm. Die Experimente wurden mit maximaler Spaltlänge von 14 mm vorgenommen. Dementsprechend teilte man die Platten mit dünnen Linien in 17 mm breite Spuren auf. Darnit war bezweckt die zu chromatographierenden Substanzen, welche punktförmig aus einer Standardlösung auf die Dünnschichtplatte aufgetragen wurden, innerhalb der durch die Spaltlänge bestimmten Grenzen zu halten. Durch Ermittlung der Basislinie<sup>2</sup> vor der chromatographischer Trennung konnte man selbst Substanz-

\* Die Bezeichnung "Densitometrie" wird für die Direktauswertung von Chromatogrammen allgemein benutzt.

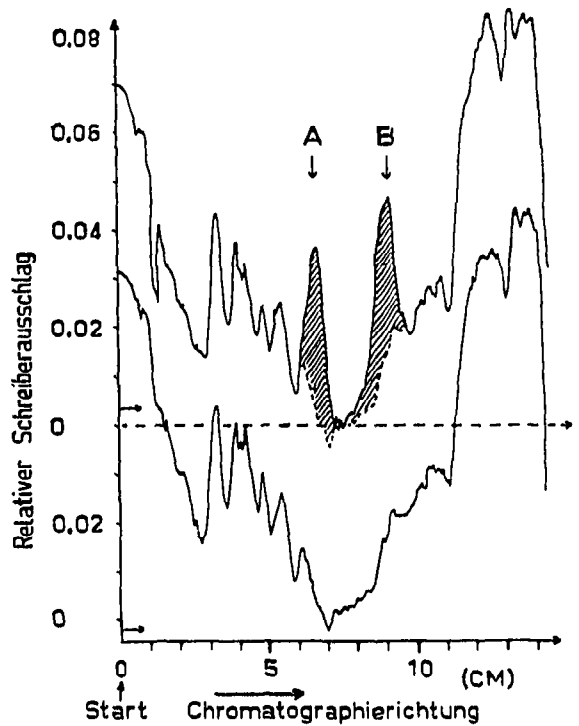
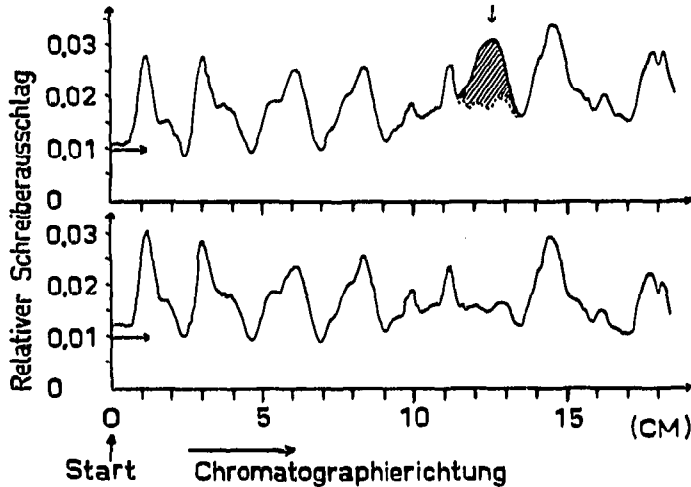


Fig. 1. Transmissionsmessung mit Einstrahlprinzip. Densitogramm von 50 ng Testosteron (als Testo-2,4-DNPH) mit der zugehörigen Basislinie. Die Aufnahme erfolgte mit dem Vitatron-Densitometer.

Fig. 2. Transmissionsmessung mit Einstrahlprinzip. Unten die entsprechende Basislinie. A = 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Überschuss; B = 50 ng Testosteron (als Testo-2,4-DNPH). Die Aufnahme erfolgte mit dem Schoeffel-Densitometer.

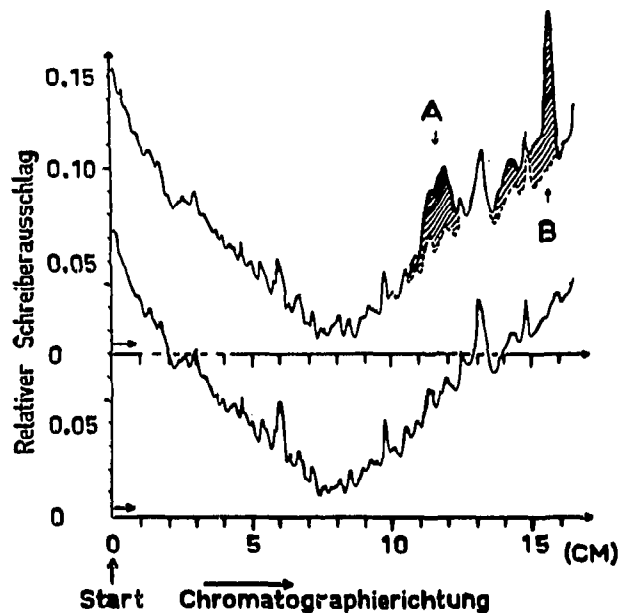
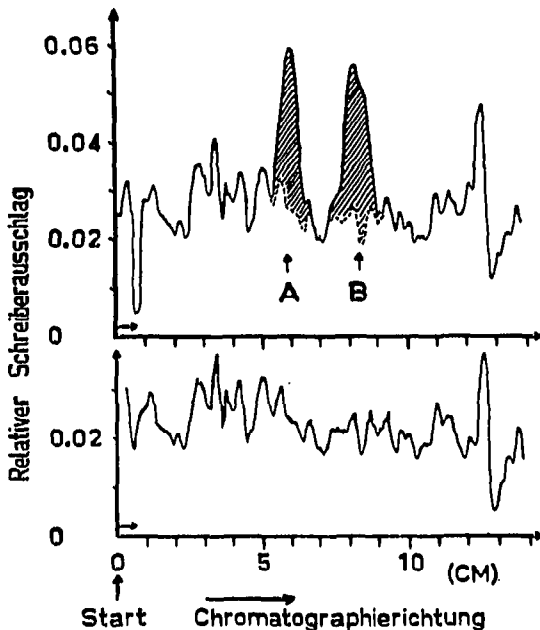


Fig. 3. Dieselbe Probe, wie Fig. 2. Die Aufnahme erfolgte mit Doppelstrahlprinzip mit Schoeffel-Densitometer. Unten: die entsprechende Basislinie.

Fig. 4. Transmissionsmessung mit Einstrahlprinzip. Unten: die entsprechende Basislinie. A = 50 ng Testosteron (als Testo-2,4-DNPH); B = unpolares Reaktionsnebenprodukt. Die Aufnahme erfolgte mit dem Zeiss-Chromatogrammspektrophotometer.

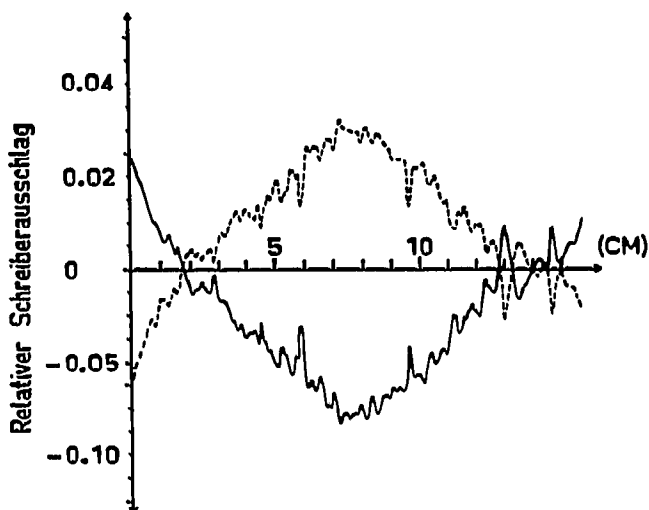
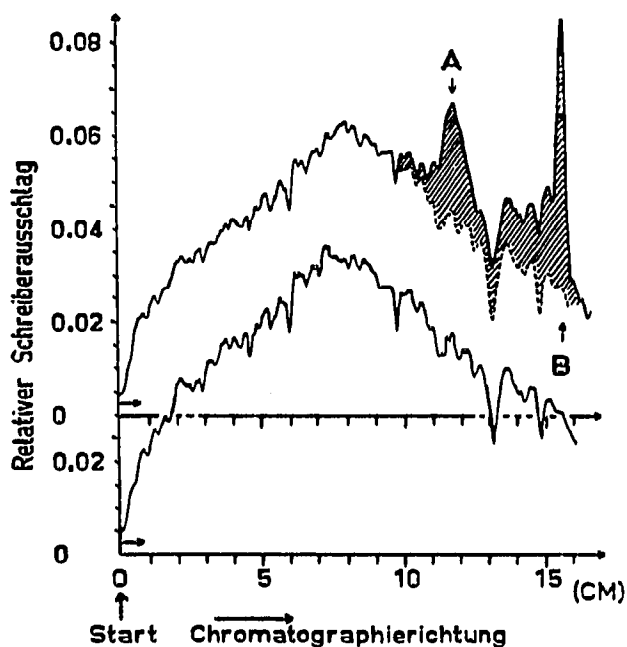


Fig. 5. Dieselbe Probe wie Fig. 4. mit Remissionsmessung.

Fig. 6. Basislinien der Trans- (unten) und Remissionsmessung (oben). Vgl.: Fig. 4 und 5.

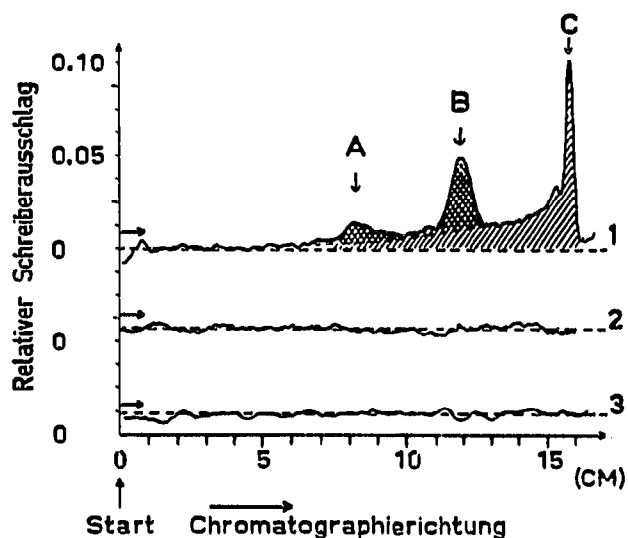
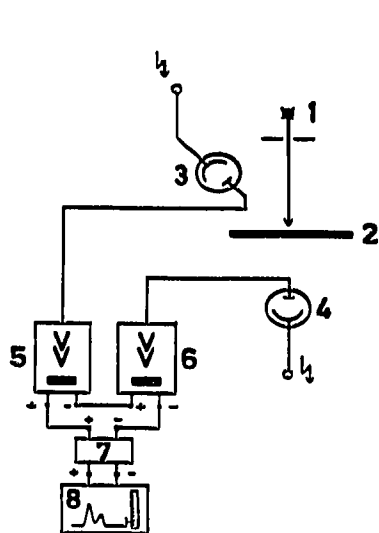


Fig. 7. Schaltschema zur Messung mit getrennter Erfassung und Verstärkung der Signale von Trans- und Remission. 1 = Lichtquelle; 2 = Messobjekt; 3 = Photomultiplikator von Remission; 4 = Photomultiplikator von Transmission; 5 = Verstärker der Remissionsseite; 6 = Verstärker der Transmissionsseite; 7 = Spreizungszusatz zur Kompensierung der Ausgangsspannung; 8 = Schreiber.

Fig. 8. Dieselbe Probe wie Fig. 4 und 5. Die Aufnahme erfolgte mit Simultanmessung von Trans- und Remission. Aufnahme 1: A = 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Überschuss; B = 50 ng Testosteron (als Testo-2,4-DNPH); C = unpolares Reaktionsnebenprodukt. Die Schwanzbildung kommt deutlich zum Vorschein. Aufnahme 2: Basislinie der Simultanmessung. Aufnahme 3: Eigenstabilität des gesamten Systems.

mengen ermitteln, deren Absorption sich in der Grössenordnung der unspezifischen Basislinienschwankungen bewegten. Wie aus den Fig. 1–5 zu ersehen ist, ermöglicht die Subtraktion der vorher registrierten Basislinie eine sichere Erkennung der substanzspezifischen Absorption, unabhängig vom Messprinzip und Gerät. Dadurch wird die Nachweisgrenze beträchtlich herabgesetzt. Eingehende Untersuchungen wurden dann mit dem Zeiss-Chromatogrammspektralphotometer vorgenommen, welches die grösste Vielseitigkeit aufwies. Vergleichende Untersuchungen in Trans- und Remission haben gezeigt, dass die Basislinien einer strengen Gesetzmässigkeit unterworfen sind. Bei entsprechender Einstellung der Verstärkungsverhältnisse verhalten sie sich wie Spiegelbilder zueinander (Fig. 6); gleichzeitig sind Signale, die durch Absorption einer Substanz erzeugt werden, gleichgerichtet (Fig. 4 und 5). Diese Erkenntnis war Anlass zur Durchführung von Simultanmessungen in Trans- und Remission. Bei entsprechender Einstellung der Empfindlichkeiten der Empfänger — die von Fall zu Fall etwas variieren kann — erreichte man, dass bei getrennter Erfassung beider Signale durch Serienschaltung die Basislinienschwankungen eliminiert wurden. Fig. 7 zeigt die Schaltung schematisch. In der Tat überschreiten die Schwankungen kaum die durch Eigenstabilität des gesamten Systems gestellten Grenzen (Fig. 8).

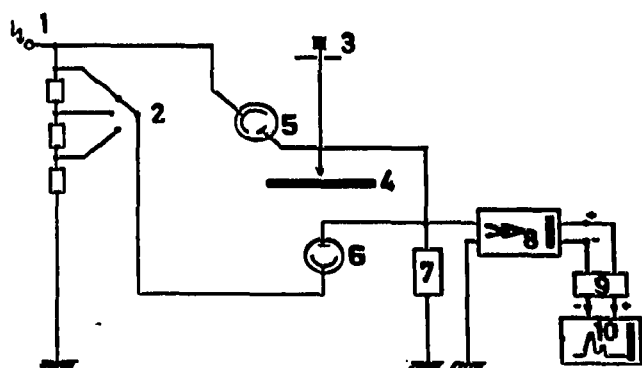


Fig. 9. Schaltschema zur Zusammenführung der Signale vor der Verstärkereinheit. 1 = Gemeinsame Hochspannungsversorgung; 2 = Schalter zur Einstellung des optimalen Transmissions- und Remissionsverhältnisses; 3 = Lichtquelle; 4 = Messobjekt; 5 = Photomultiplikator der Remissionsseite; 6 = Photomultiplikator der Transmissionsseite; 7 = Der gemeinsame Arbeitswiderstand; 8 = Verstärker; 9 = Spreizungszusatz zur Kompensierung der Ausgangsspannung; 10 = Schreiber.

Es bedeutet keine prinzipielle Änderung die Signale vor der Verstärkereinheit zusammenzuführen (Fig. 9). Das  $R/T$ -Verhältnis kann mit einem Spannungsteiler optimiert werden. Da die Untergrundschwankungen eliminiert wurden, konnten bei den Modellsubstanzen ohne Schwierigkeiten Messungen bis zu 10 ng durchgeführt werden. An einigen Beispielen wurde die Funktion des modifizierten Systems geprüft. Aus einer Testo-2,4-DNPH Standardlösung wurden bekannte Mengen zwecks Ermittlung der Kalibrationskurve auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Nach Entwicklung des Chromatogramms bestimmte man die Ortskurven. Die direkte Integrierung erfolgte mit dem elektronischen Integrator. Die näherungsweise Integrierung führte man manuell durch, indem die registrierten Ortskurven in Sequenzen von 1 mm aufgeteilt wurden. Für jede Sequenz rechnete man den mV-Wert an Hand der aktuellen Formel um und summierte sie (siehe später).

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Auswahl der Modellssubstanzen wurden Eigenschaften wie Eigenabsorption, chemische Stabilität und Kontrollierbarkeit während des Experimentes besonders berücksichtigt. Dieses Prinzip erwies sich bereits früher als sehr brauchbar<sup>3-9</sup>. Man musste ihm auch diesmal den Vorzug gegenüber derartigen Farbreaktionen, wie die Bildung von "Chromogenen" nur mit grössten Schwierigkeiten zu kontrollieren ist, geben. Mechanische Veränderungen der Adsorbentschicht wurden ebenfalls vermieden. Der elektronische Integrator und der registrierende Spektralphotometer sorgten für eine Genauigkeit von  $\pm 5\%$  während der gesamten Untersuchung.

Unter diesen Versuchsbedingungen war es möglich die Eigenschaften der einzelnen Geräteanordnungen unabhängig von chemisch-methodischen Fehlern zu studieren. Die Experimente zeigten, dass die Störung der von der Adsorbentstruktur herrührenden Schwankungen praktisch genommen vollständig auszuschalten ist. Wenn man die Vorgänge in der Adsorbentschicht etwas näher betrachtet (Fig. 10),

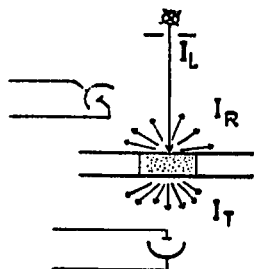


Fig. 10. Schematische Darstellung zur theoretischen Betrachtung der Simultanmessung. Weitere Erläuterungen sind im Text enthalten.

so ist dies durchaus verständlich und gleichzeitig Erklärung dafür, warum es möglich ist die wellenlängenunspezifischen Signale bei Simultanmessung zu eliminieren, wobei wellenlängenspezifische Absorption relativ verstärkt erscheint. Folgende Abschätzung möge dies verdeutlichen. Es gilt:

$$I_R + I_T + I_{S,abs.} = k \cdot I_L - C_1 = \text{Const.}^{10} \quad (1)$$

wobei

$I_L$  = einfallende konstante Strahlung aus der Lichtquelle,

$I_R$  = remittierte Strahlung,

$I_T$  = transmittierte Strahlung,

$I_{S,abs.}$  = durch die chromatographierte Substanz absorbierte Strahlung,

$I_{P,abs.}$  = durch die Platte absorbierte Strahlung (als konstant angenommen:

$C_1$ ), und

$k < 1$ , da die gestreute Strahlung innerhalb eines begrenzten Raumwinkels erfasst wird.

Bei Fehlen einer Substanz ( $I_{S,abs.} = 0$ ) wird (1):

$$I_R + I_T = \text{Const.} \quad (2)$$

woraus ersichtlich ist, dass sich  $I_R$  und  $I_T$  gegensinnig ändern (Kompensation von Schwankungen der Basislinie). Gelangt eine chromatographierte Substanz in den

Strahlengang, so zeigt (1) die gleichsinnige Änderung von  $I_R$  und  $I_T$  ( $I_{S,abs.} \neq 0$ ) (Fig. 4 und 5).

Diese experimentelle Tatsache ist ausschlaggebend bei der mathematischen Behandlung von Messproblemen. Wir haben gesehen, dass das Verhalten der reinen Adsorbentschicht dem Gesetz des Energieerhaltes entspricht (2). Es ist auch leicht einzusehen, dass die Gegenwart einer absorbierenden Substanz nur die Intensität der remittierten ( $I_R$ ) und durchgelassenen ( $I_T$ ) Strahlung zu verändern vermag, da die anderen Grössen konstant gehalten werden. Da unsere Informationen von Messungen der remittierten und durchgelassenen Strahlung stammen, dürfen wir zunächst auf die entsprechenden Gesetzmässigkeiten zurückgreifen. Mit anderen Worten: die Gesetze der Photometrie (Lambert-Beer) sowie die der Reflexionsspektroskopie (Kubelka-Munk) für Chromatographie sollten für unser System gleichzeitig gültig sein.

Zunächst wollen wir den Fall untersuchen, bei dem die Voraussetzungen des Lambert-Beerschen Gesetzes erfüllt werden:

$$K_T \cdot C = \ln \frac{K_1 \cdot I_L}{I_T} \quad (3)$$

wobei  $K_T$  Materialkonstanten zusammenfasst. Der Anteil der gesamten Lichtenergie, welcher an den substanzfreien Stellen des Messobjektes durchdringt, sei  $K_1 \cdot I_L$ .  $I_T$  ist die durch die absorbierende Substanz (Konzentration =  $C$ ) geschwächte Lichtintensität. Die Lichtstärke erscheint an den Polen des Verstärkers als Spannung:

$$\begin{aligned} K_1 \cdot I_L &= U_m \\ I_T &= U_m - U_{x,T} \end{aligned}$$

$U_m$  ist die maximale Spannung (bei grösster Lichtstärke = ohne Absorption). Diese Spannung wird durch Lichtabsorption geschwächt. Die  $U_m - U_{x,T}$  verminderte Spannung ist der  $I_T$  Lichtintensität direkt proportional.  $U_{x,T}$  ist die aktuelle Spannung. In diesem Fall können wir (3) umschreiben:

$$K_T \cdot C = \ln \frac{U_m}{U_m - U_{x,T}} \quad (4)$$

Mit einer ähnlicher Überlegung können wir auch den Fall beschreiben, bei dem die Voraussetzungen der Kubelka-Munk Theorie erfüllt werden<sup>11</sup>:

$$\begin{aligned} \varepsilon \cdot \frac{2.3}{S} \cdot C &= K_R \cdot C = \frac{(1 - R)^2}{2R} \\ K_R \cdot C &= \frac{1}{2} \left( \frac{1}{R} + R \right) - 1 \end{aligned} \quad (5)$$

wobei  $R$  den relativen Remissionsgrad darstellt:  $R = \Phi_x / \Phi_P$  ( $\Phi_x$  = Remissionsvermögen, geschwächt durch die Lichtabsorption einer Substanz und  $\Phi_P$  = Remissionsvermögen der substanzfreien Stellen des Messobjektes) und  $K_R$  die Materialkonstanten zusammenfasst.

Das reflektierte Licht erscheint wiederum als Spannung und zwar  $\Phi_P = K_2 \cdot I_L = U_m$ , entsprechend dem maximalen Anteil der Gesamtenergie. Zieht man die ak-

tuelle Spannung ( $U_{x,R}$ ) von der maximalen Spannung ab, so erhält man eine dem geschwächten remittierten Lichtstrom proportionale Grösse:

$$\Phi_x = I_R = U_m - U_{x,R}$$

Den relativen Remissionsgrad können wir also mit Hilfe der gemessenen Spannungen ausdrücken:

$$R = \frac{U_m - U_{x,R}}{U_m}$$

anschliessend in (5) einsetzen. Nach einer einfachen Ableitung erhält man:

$$K_R \cdot C = \frac{1}{2} \left( \frac{U_m}{U_m - U_{x,R}} - \frac{U_{x,R}}{U_m} - 1 \right) \quad (6)$$

Vorangehende Überlegungen haben sich experimentell trotz zahlreicher Vernachlässigungen und Vereinfachungen als richtig erwiesen. Die Summe von (4) und (6) ergänzt mit einem konstanten Faktor ergibt zwischen Konzentrationen und Signalgrössen eine lineare Funktion (Fig. 11). Der Faktor  $1/3$  wurde durch Messungen ermittelt und entspricht dem Verstärkungsverhältnis zwischen Trans- und Remissionsignalen:

$$\left( \frac{K_T}{3} + K_R \right) \cdot C = \frac{1}{3} \ln \frac{U_m}{U_m - U_{x,T}} + \frac{1}{2} \left( \frac{U_m}{U_m - U_{x,R}} - \frac{U_{x,R}}{U_m} - 1 \right) \quad (7)$$

bzw. für die praktische Anwendung die integrale Form:

$$\left( \frac{K_T}{3} + K_R \right) \int C \cdot dl = \frac{1}{3} \int \ln \frac{U_m}{U_m - U_{x,T}} dl + \frac{1}{2} \int \left( \frac{U_m}{U_m - U_{x,R}} - \frac{U_{x,R}}{U_m} - 1 \right) dl \quad (8)$$

wobei sämtliche Veränderlichen ( $C$ ,  $U_{x,T}$  und  $U_{x,R}$ ) jeweils eine Funktion des Ortes ( $l$ ) sind.

Unter optimalen Versuchsbedingungen sollte man die Lichtintensität an

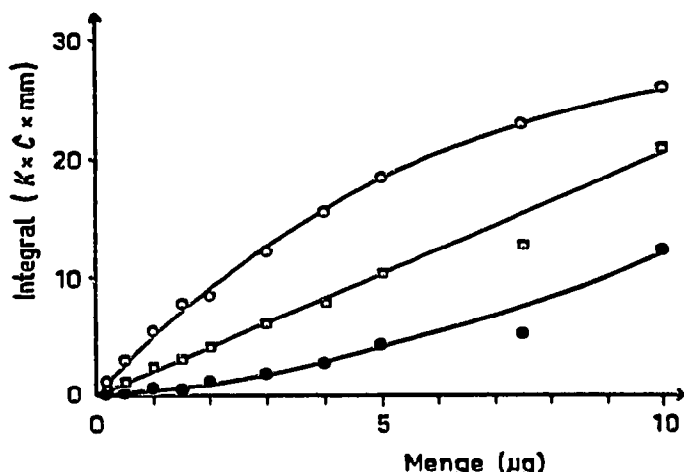


Fig. 11. Standardkurven von Testosteron (als Testo-2,4-DNPH). Ermittelt durch näherungsweise Integrierung mittels der Formel (4):  $\circ-\circ$  ( $K = K_T$ ) und (6):  $\bullet-\bullet$  ( $K = K_R$ ). Die errechnete Standardkurve durch Addierung von  $1/3$  (4) und (6):  $\square-\square$  ( $K = 1/3 K_T + K_R$ ).



beiden Seiten des Messobjektes erfassen, mit Hilfe des jeweils entsprechenden Transformators umwandeln und schliesslich addieren. Diese Versuchsanordnung könnte durch Ergänzung des aus der Fig. 7 ersichtlichen Schaltschemas aufgebaut werden. Da zur Zeit nur der Transmission-Extinktions-Transformator kommerziell zugänglich ist, müssen Serienuntersuchungen aufgeschoben werden. Die manuell durchgeführte näherungsweise Integrierung bestätigte jedoch, dass die vorangehenden Überlegungen richtig sind (Fig. 11).

Es ist von praktischem und wirtschaftlichem Interesse, das durch die Fig. 9 dargestellte System mit einem Transformator auszustatten, welcher dann die Linearisierung der Substanzmenge-Signalgrösse-Funktion ermöglicht. Zur Herstellung eines zuverlässigen Transformators benötigt man jedoch entweder die besagte mathematische Funktion, oder zumindest eine experimentell ermittelte Skala. Mit Beibehaltung der Grundformel (8) wurden empirische Funktionen ausprobiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis zwischen Trans- und Remissionskurven

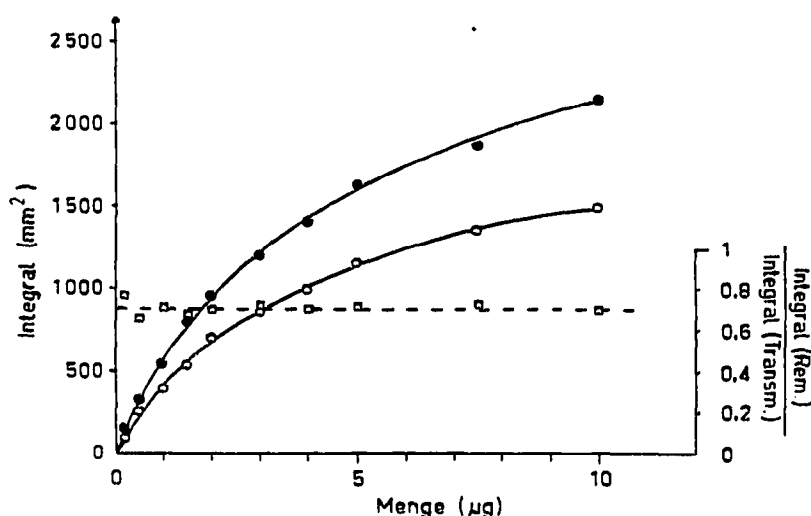


Fig. 12. Standardkurve von Testosteron (als Testo-2,4-DNPH) bei Transmissionsmessung (●—●), Remissionsmessung (○—○) und der Quotient von Remissions- und Transmissionskurven,  $R/T$  (□—□).

nahezu konstant und unabhängig von der Substanzmenge ist (Fig. 12). Tatsächlich, musste die Formel (8) nur mit einem konstanten Faktor ( $f$ ) ergänzt werden, um eine lineare Standardkurve zu erhalten:

$$K_{T,R} \int C \cdot dl = \frac{1}{3} \int \ln \frac{U_m}{U_m - f \cdot U_{x,T,R}} \cdot dl + \frac{1}{2} \int \left( \frac{U_m}{U_m - U_{x,T,R}} - \frac{U_{x,T,R}}{U_m} - 1 \right) \cdot dl \quad (9)$$

Die Grössen entsprechen denen der Formel (8). Diese wurden jedoch durch Simultanmessung erhalten. Die näherungsweise durchgeführte Integrierung ergab eine lineare Standardkurve bei  $f = 0.7$ . Dieser Wert wurde durch Ausprobung mehrerer Faktoren (Fig. 13) experimentell ermittelt und stimmt mit dem Verhältnis zwischen Trans- und Remissionskurven überein. Die Zuverlässigkeit der Formel (9) zeigt am besten ein Vergleich zwischen zwei Standardkurven, die nach Chromatographie in zwei verschiedenen Systemen erhalten wurden. Die direkte Integrierung der Ortskurven ergab erwartungsgemäss sehr unterschiedliche Standardkurven (Fig. 14), da

die Form der Substanzflecke extrem unterschiedlich war. Durch näherungsweise Integrierung nach Umrechnung der einzelnen 1 mm breiten Sequenzen erhielt man zwei nahezu gleiche lineare Standardkurven (Fig. 15). Experimente mit anderen hier nicht aufgeführten Substanzen ergaben ähnliche Resultate.

Es sind Untersuchungen mit automatischem Transformator in Vorbereitung, wodurch Serienuntersuchungen schnell und zuverlässig vorgenommen werden können. Nur eine eingehende Prüfung kann entscheiden, ob eine Konstruktion mit zwei oder mit einem Transformator zum Ziele führt. Es wäre ja sonst wegen des grossen mathematischen Aufwandes unmöglich, die Vorteile des neuen Systems vollständig auszu-

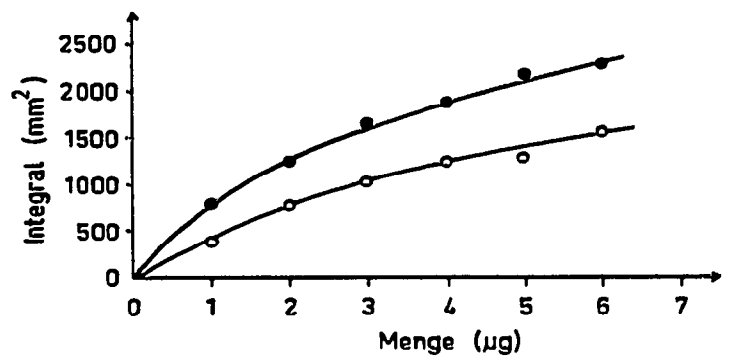
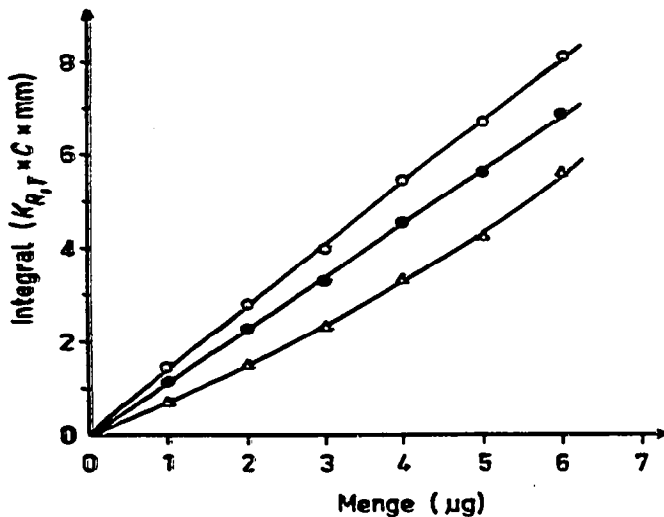


Fig. 13. Standardkurven von Testosteron (als Testo-2,4-DNPH) berechnet durch näherungsweise Integrierung der Formel (9).  $\Delta$ — $\Delta$ ,  $f = 0.3$ ;  $\bullet$ — $\bullet$ ,  $f = 0.7$ ;  $\circ$ — $\circ$ ,  $f = 1$ .

Fig. 14. Standardkurven von Testosteron (als Testo-2,4-DNPH) nach Chromatographie im System Chloroform-Dioxan (93:7) ( $\circ$ — $\circ$ ), bzw. Benzol-Äthylacetat (4:1) ( $\bullet$ — $\bullet$ ). Ermittelt durch direkte Integrierung der Ortskurven.

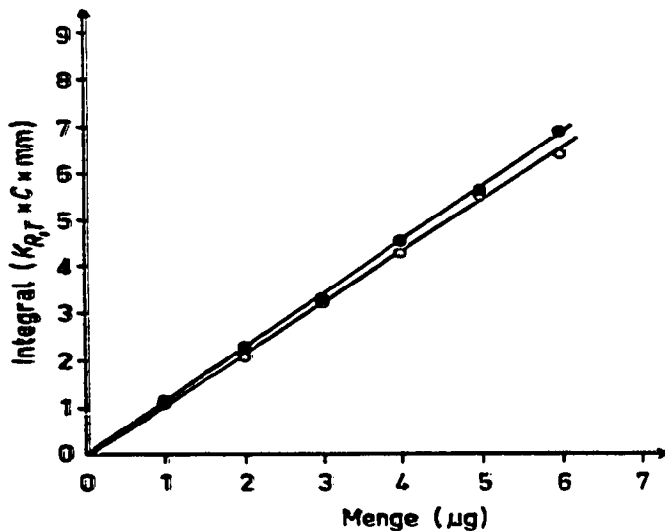


Fig. 15. Die Standardkurven der Fig. 14 wurden durch näherungsweise Integrierung der Formel (9) ermittelt, wobei für  $f = 0.7$  eingesetzt wurde.

nützen. Bei der endgültigen technischen Ausführung werden folgende weitere Möglichkeiten unter Ausprobung gezogen: Die integrale Erfassung des Lichtes an beiden Seiten des Messobjektes mit Hilfe je einer Photometerkugel oder einer faseroptischen Vorrichtung<sup>12</sup>. Diese Modifikationen dürften der elektronischen Stabilität und dadurch zur Erhöhung der Empfindlichkeit des Instrumentes erheblich beitragen. Über letztgenannte Untersuchungen wird an anderen Stellen berichtet werden.

## DANK

Zum Gelingen obiger Untersuchungen war die technische Hilfe vom Herrn Ing. U. KAROW (Zeiss-Svenska AB, Stockholm/Schweden) von grösster Wichtigkeit. Hiermit sei ihm herzlich gedankt. Herrn D. M. SCHOEFFEL (Schoeffel-Instrument-Corp., Westwood, N.J., V.S.A.) sowie Herrn Ing. F. BINDEFELD (Ingenjörfirma Hugo Tillquist, Vitatron-Representant, Solna, Schweden) danken wir sehr für die leihweise Überlassung von Ausrüstungen. Unser Dank gilt auch Herrn Dr. H. J. HÖFERT und Herrn Dr. W. TAUSCH für wertvolle Diskussionen und Ratschläge (beide Fa. Carl Zeiss, Oberkochen/Würt., B.R.D.).

## ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit wird eine verbesserte Methode für die direkte spektrophotometrische Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen beschrieben. Die simultanen Trans- und Remissionsmessungen auf der selben Spur ergeben eine konstante Basislinie. Die Vorteile dieses neuen Verfahrens sind: erhöhte Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit, lineare Funktion zwischen den registrierten Ortskurven und den chromatographierten Substanzmengen. Auch weitere technische und wissenschaftliche Entwicklungsmöglichkeiten wurden diskutiert.

## LITERATUR

- 1 G. GORBACH UND C. WEBER, *Z. Anal. Chem.*, 222 (1966) 236.
- 2 H. JORK, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 310.
- 3 A. H. NISHIKAWA, L. H. L. WU UND R. R. BECKER, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 354.
- 4 L. TREIBER, *Inaugural-Dissertation*, Universität des Saarlandes, Mainz, 1968.
- 5 L. TREIBER UND G. W. OERTEL, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 5 (1967) 83.
- 6 P. KNAPSTEIN, L. TREIBER UND J. C. TOUCHSTONE, *Steroids*, 11 (1968) 115.
- 7 L. TREIBER, P. KNAPSTEIN UND J. C. TOUCHSTONE, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 83.
- 8 D. MORSE UND B. L. HORECKER, *Anal. Biochem.*, 14 (1966) 420.
- 9 J. C. TOUCHSTONE, A. K. BALIN UND P. KNAPSTEIN, *Steroids*, 13 (1969) 109.
- 10 K. SHIBATA, *Methods Biochem. Anal.*, 7 (1959) 77.
- 11 H. GÄNSHIRT, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 143.
- 12 H. KELLER, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 7 (1969) 501.