

CHROM. 6266

ZUR STANDARDISIERUNG DER DIREKTEN SPEKTROPHOTOMETRISCHEN
AUSWERTUNG VON CHROMATOGRAMMENIII. DIE BEDEUTUNG EINES LINEAREN DETEKTORSYSTEMS FÜR
DIE QUANTITATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

L. R. TREIBER* UND B. ÖRTENGREN

Astra Läkemedel AB, Abteilung für Analytische Chemie, 151 85 Södertälje (Schweden)

R. LINDSTEN

AMLAB AB, Box 54, 149 01 Nynäshamn (Schweden)

UND

T. ÖRTEGREN

Zeiss Svenska AB, Box 40114, 103 43 Stockholm (Schweden)

(Eingegangen am 29. Juni 1972)

SUMMARY

Standardisation of the direct spectrophotometric quantitative analysis of chromatograms. III. A linear detector system for quantitative thin-layer chromatography and its importance

A linear detector system for the *in situ* quantitative evaluation of chromatograms has been constructed. The investigations showed that two-dimensional integration was superior to the one-dimensional measuring technique. Correlation coefficients of above 0.9979 (two-dimensional) and 0.9788 (one-dimensional) have been obtained for a wide concentration range. For the same measuring processes the standard deviations of the slopes were $\leq 2.3\%$ and $\leq 7.4\%$, respectively. Possible applications for this measuring technique are discussed.

EINLEITUNG

In zwei früheren Arbeiten^{1,2} wurden die Vorteile der gleichzeitigen Berücksichtigung der Lambert-Beer- und Kubelka-Munk-Funktion bei der direkten spektrophotometrischen Auswertung von Chromatogrammen behandelt. Man konnte folgende Rückschlüsse ziehen: (1) für lichtdurchlässige Messobjekte gelang es, die unspezifischen Schwankungen der Basislinie, die aus der Inhomogenität der Adsorbentschicht herrühren, praktisch vollständig zu beseitigen¹; (2) die quantitative Auswertung von realen Messobjekten (die also weder ideal homogen noch ideal in-

* Gegenwärtige Adresse: 801 Olin Building, Case Institute of Technology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44 106, U.S.A.

homogen sind) kann zweckmässig mit Hilfe einer neuen Funktion² behandelt werden, die die beiden klassischen Gesetze der Photometrie (Lambert-Beer-Funktion bzw. Kubelka-Munk-Theorie) umfasst und auch für die herkömmlichen Messprobleme gültig ist.

Die obigen Resultate stellen einen Teil der allgemeinen Entwicklung dar, die im Gebiet der Separationstechnik an dünnen Schichten (Papier- und Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese) während der letzten Zeit erfolgte.

Da die chromatographische Auftrennung meistens eine Vorbereitung zur quantitativen Analyse ist, lag es auf der Hand Möglichkeiten zu suchen, die isolierten Substanzen *in situ* auf dem Chromatogramm zu bestimmen. Man kann heute feststellen dass für die direkte quantitative Auswertung von Chromatogrammen mehrere geeignete Gerätetypen erhältlich sind³.

Die meisten Konstruktionen erlauben die qualitativen und quantitativen Aussagen an Hand der charakteristischen Lichtabsorption oder -emission der aufgetrennten Substanzen im UV und sichtbaren Wellenlängenbereich. Nur in vereinzelt Fällen findet man andere Systeme, wie Leitfähigkeitsdetektor⁴ oder Infrarotreflexionsspektroskopie⁵.

Neulich erschienen Berichte über weitere Möglichkeiten, die sich durch die Behandlung von Messwerten mit Hilfe der Computertechnik bieten^{6,7}.

Auch die chemische Methodologie nimmt Rücksicht auf die heutige Lage der Apparatentechnik. Es werden mehr und mehr solche Reagenzien empfohlen, die mit den zu untersuchenden Substanzen in Bildung von farbigen oder fluoreszierenden Derivaten eingehen. Auf die Analogie zur Einführung von isotopenmarkierten Gruppen in die Moleküle, wurde neulich die Bezeichnung "fluorigenic labelling"⁸ verwendet. Auch die Möglichkeiten der photometrischen Markierung wurden systematisch untersucht und u.a. für Oxosteroide^{9,10}, Östrogene¹¹, Alkohole, Thiole, Amine und Aminosäureester¹² gut bewährte Bestimmungsmethoden empfohlen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse und Erfahrungen mitgeteilt, die die *in situ* Untersuchungen von Chromatogrammen wesentlich vereinfachen und weitere Entwicklungswege eröffnen dürften.

APPARATUR UND MATERIAL

Die Untersuchungen wurden mit einem modifizierten Zeiss-Chromatogrammspektralphotometer^{1,2} (C. Zeiss, D-7082 Oberkochen, B.R.D.) durchgeführt. Zur Ausrüstung gehörte ein elektronischer Integrator (Infotronics Model CRS-204, Infotronics Corp., 2475 Broadway, Boulder, Colo. 80302, U.S.A.), ein Potentiometer-schreiber (Servogor F, Typ RE 54I, Goerz Electro GmbH, A-1101 Wien, Postfach 204, Österreich) und ein Digitalrechner (Addo-X, Facit AB, Fack, S-597 00 Ätvidaberg, Schweden).

Homogentisinsäure (pulum, $\geq 97\%$) wurde von Fluka AG, CH-9470 Buchs S.G., Schweiz, bezogen. Die anderen Chemikalien wurden durch die E. Merck AG, D-61 Darmstadt, B.R.D., geliefert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Prinzipbeschreibung des Analogumwandlers²

Der Konstruktion lag die früher beschriebene Formel I zu Grunde (in der originalen Arbeit¹ als Formel 7 aufgeführt):

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

U_m = Konstante; maximale Spannung bei $c = 0$

$U_{x,T}$ bzw. $U_{x,R}$ = aktuelle Spannungen bei $c \neq 0$ gemessen

K_T und K_R = Konstanten

Mit Hilfe der Lichtintensitäten wurde dieselbe Formel mehr allgemein ausgedrückt (Lit. 2):

$$K_x \cdot c = K_R \cdot \left(\frac{I_0}{I_x} + \frac{I_x}{I_0} - 2\right) + K_T \cdot \ln \frac{I_0}{I_x} \quad (2)$$

K_x , K_R und K_T sind Konstanten wenn nur die Konzentration der lichtabsorbierenden Substanz (c) geändert wird. Dabei ist I_0 eine konstante Lichtintensität (bei $c = 0$). I_x -Lichtintensität wird durch die aktuelle Konzentration c bestimmt.

Das Licht ist monochromatisch, sein Einfallswinkel auf die Ebene der Adsorbentschicht, der Abstand der Lichtquelle vom Messobjekt, sowie die Lage der Photozelle im Verhältnis zum Spaltbild ist unverändert. Die Schichtdicke und Struktur des Mediums sind statistisch konstant. Letztere Bedingungen können bei Separation an dünnen Schichten im allgemeinen leicht erfüllt werden. Nähere Erläuterungen sind aus den zitierten Arbeiten^{1,2} zu entnehmen.

Die schematische Ausführung des Funktionswandlers kann man aus der Fig. 1 ersehen.

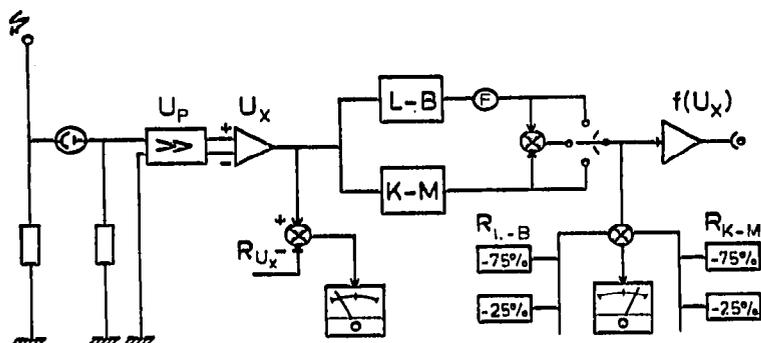


Fig. 1. Prinzipschema des Analogumwandlers. Die Ausgangsspannung des Photometers (U_p) wird durch einen Vorverstärker ($0 \geq U_x \geq U_{m,A}$) normiert. Die Berechnung der Spannung U_x erfolgt parallel durch je einen Umwandler gemäss der Lambert-Beer-Gleichung (L-B) bzw. Kubelka-Munk-Theorie (K-M). Das K_T/K_R -Verhältnis wird durch den Potentiometer (F) eingestellt. Die beiden Funktionen sind auch einzeln zu erhalten. Die umgewandelte Spannung, $f(U_x)$, erscheint an dem Ausgangsverstärker. R_{U_x} , R_{L-B} und R_{K-M} sind Referenzspannungen und erlauben die Kontrolle des Umwandlers mit Hilfe von Differentialvoltmetern.

Statistische Untersuchung des Analogumwandlers

Vorbereitung der Dünnschichtplatten. Die Platten für Testosteron (Testo) und Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon (T-2,4-DNPH) wurden in abs. Äthanol aufsteigend chromatographiert und anschliessend bei $105-110^\circ$ während 1 Std. aktiviert.

Die Platten für Homogentisinsäure (HGS) wurden in 2 N Salzsäure aufsteigend chromatographiert, dann bei $120-125^\circ$ während 1 Std. aktiviert.

Dünnschichtchromatographie. Es wurde dieselbe chromatographische Technik verwendet, wie früher veröffentlicht^{1,2}. Die auf der oben beschriebenen Weise vorbereiteten Fertigplatten aus Kieselgel G (Schichtdicke: 0.25 mm) wurden auf 17-mm

TABELLE I

ZUSAMMENSTELLUNG ÜBER DIE STATISTISCHEN UNTERSUCHUNGEN VON KALIBRATIONS-KURVEN

Abkürzungen: $U_{m,A}$ = korrigierte maximale Spannung des Analogumwandlers; U_m = maximale Spannung des Photometers; b, a = die der Formel $Y = a + b \cdot X$ entsprechenden Größen; r = Korrelationskoeffizient; $\pm s_b$ = Standardabweichung der Regressionskoeffizienten; T-2,4-DNPH = Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon; Testo = Testosteron; HGS = Homogentisinsäure; Sim = Simultanmessung; R = Remissionsmessung; T = Transmissionsmessung; P = Punktförmiges Spaltbild (Durchmesser in mm); S = Strichförmiges Spaltbild (Länge in mm).

Nr.	Versuchsbedingungen				Statistische Angaben der Kalibrationskurven					
	Substanz	System	Wellenlänge (nm)	Technik	Blende (mm)	$U_{m,A}$	b (mm ² /μg)	a (mm ²)	r	$\pm s_b$ (mm ² /μg; %)
1	T-2,4-DNPH	I	385	Sim	P (1)	U_m	196	-13	0.9980	4.4; 2.2
2	T-2,4-DNPH	II	385	Sim	P (1)	U_m	200	-15	0.9979	4.6; 2.3
3	Testo	I	252.5	R	P (1)	U_m	38.2	-1.8	0.9996	0.5; 1.2
4	T-2,4-DNPH	I	385	Sim	S (14)	U_m	71	-2.3	0.9991	1.1; 1.5
5	T-2,4-DNPH	II	385	Sim	S (14)	U_m	60	-12	0.9986	1.4; 1.9
6	T-2,4-DNPH	II	385	T	S (14)	U_m	144	-78	0.9948	8.6; 5.9
7	T-2,4-DNPH	II	385	R	S (14)	U_m	47.5	-20	0.9967	1.4; 2.9
8	Testo	I	252.5	R	S (14)	U_m	12.8	-0.12	0.9988	0.25; 2.0
9	T-2,4-DNPH	I	385	Sim	S (14)	U_m	59.7	4.3	0.9899	3.0; 5.1
10	T-2,4-DNPH	I	385	Sim	S (10)	U_m	97	0.3	0.9969	2.7; 2.8
11	T-2,4-DNPH	I	385	Sim	S (8)	U_m	150	-4.3	0.9949	5.3; 3.6
12	T-2,4-DNPH	II	385	Sim	S (14)	U_m	92	3.1	0.9962	2.9; 3.1
13	T-2,4-DNPH	II	385	Sim	S (10)	U_m	138	-2.1	0.9977	3.3; 2.5
14	T-2,4-DNPH	II	385	Sim	S (8)	U_m	220	-11.2	0.9884	12.0; 5.4
15	T-2,4-DNPH	I	385	Sim	S (14)	$0.9 \cdot U_m$	102	-1.7	0.9824	6.9; 6.7
16	T-2,4-DNPH	II	385	Sim	S (14)	$0.9 \cdot U_m$	77	2.0	0.9937	3.1; 4.0
17	T-2,4-DNPH	I	385	R	S (14)	U_m	39	3.5	0.9788	2.8; 7.4
18	T-2,4-DNPH	I	385	R	S (10)	U_m	55	3.0	0.9932	2.3; 4.2
19	T-2,4-DNPH	I	385	R	S (8)	U_m	71	1.6	0.9984	1.4; 2.0
20	T-2,4-DNPH	II	385	R	S (14)	U_m	68	3.2	0.9899	3.5; 5.1
21	T-2,4-DNPH	II	385	R	S (10)	U_m	103	1.0	0.9965	3.1; 3.0
22	T-2,4-DNPH	II	385	R	S (8)	U_m	136	-1.6	0.9985	2.7; 2.0
23	Testo	I	252.5	R	S (14)	$0.9 \cdot U_m$	24	-0.2	0.9996	0.24; 1.0
24	HGS	III	290	R	S (14)	U_m	60	-3.8	0.9967	2.0; 3.3
25	HGS	III	355	R	S (14)	U_m	77	-2.0	0.9979	2.5; 3.3

breite Bahnen aufgeteilt. Die Modellsubstanzen wurden dann aufgetragen und in einem der folgenden Lösungsmittelsystemen chromatographiert: Chloroform-Dioxan (94:6) (I), Benzol-Äthylacetat (4:1) (II) und Äthylacetat-Aceton (3:2) (III).

Quantitative Auswertung der Chromatogramme. Testosteron und Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon wurden nur bei den aus Tabelle I ersichtlichen Wellenlängen ermittelt. Homogentisinsäure wurde auch erst bei ihrer Eigenabsorption (290 nm) gemessen. Anschliessend liess man die Platte über Nacht in Ammoniakgas-Luft-Gemisch stehen, wobei durch Oxydation braungelbe Flecke mit maximaler Absorption bei 355 nm entstanden. Die Messung wurde bei dieser Wellenlänge wiederholt.

Zweidimensionale Messungen^{2,6,13,14}. Mit Hilfe einer Stichblende wurde ein punktförmiges Lichtbild mit einem Durchmesser von 1 mm hergestellt. Der Objektisch wurde in der Y-Richtung mit konstanter Geschwindigkeit bewegt. Der Spurenwechsel in der X-Richtung erfolgte manuell an substanzfreien Stellen oberhalb und unterhalb des Farbflecks. Die Abstände in der X-Richtung betragen jedesmal 2.0 mm. Fig. 2 zeigt das Messverfahren (a) sowie die typischen Ortskurven (b) der zweidimensionalen Integrierung in der direkten Umgebung der Substanzflecke.

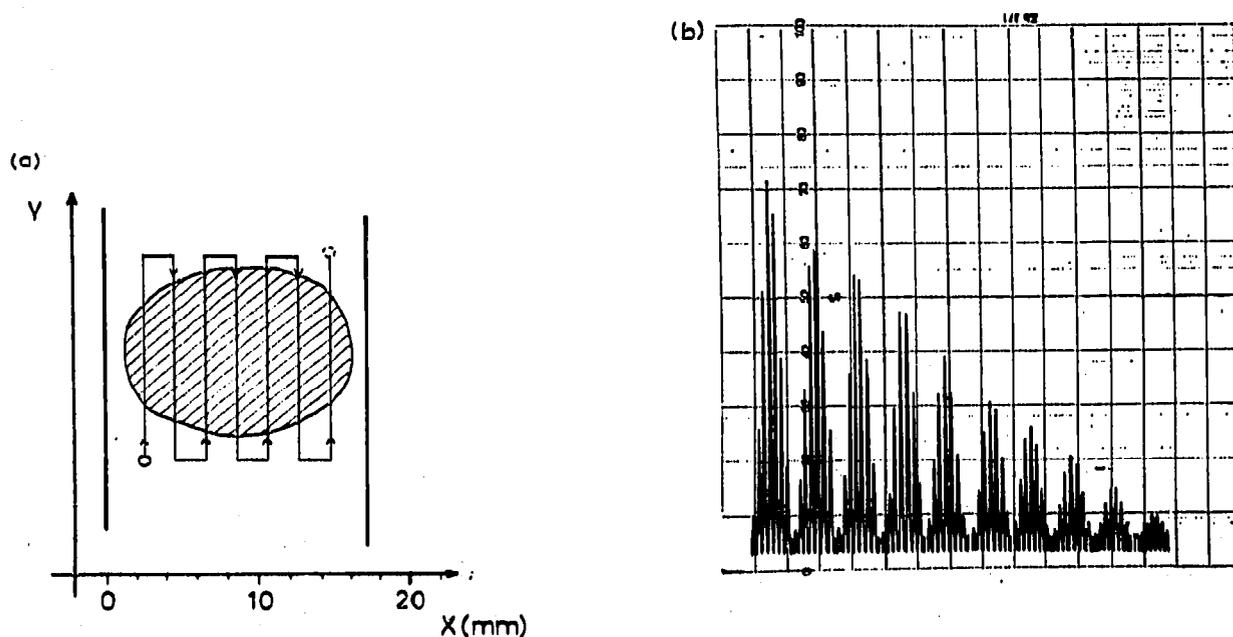


Fig. 2. (a) Zur zweidimensionalen Integrierung. Die schematische Darstellung zeigt den Weg des punktförmigen Spaltes über den chromatographischen Fleck. Nach jedem Abtasten in der Y-Richtung erfolgt eine Integrierung. Die einzelnen Integrale werden zum Schluss addiert. (b) Ortskurven der zweidimensionalen Messung einer Substanzserie: 1–10 μg Testosteron als 2,4-Dinitrophenylhydrazon im Lösungsmittelsystem (I). Geschwindigkeit des Objektisches: 30 mm/min. bzw. – 30 mm/min. Schreibergeschwindigkeit: 3 mm/min. Messverfahren: Simultantechnik (vgl. Tabelle I).

Eindimensionale Messungen. Mit Hilfe von Stichblenden wurden strichförmige Spaltbilder erhalten. Die Dimensionen des Spaltes konnten in der X-Richtung stufenweise, in der Y-Richtung kontinuierlich geändert werden. Die Messungen erfolgten in der Y-Richtung, wie es aus der Fig. 3 schematisch ersichtlich ist (a). Die Ortskurven (b) zeigen nur die direkte Umgebung der chromatographischen Zonen.

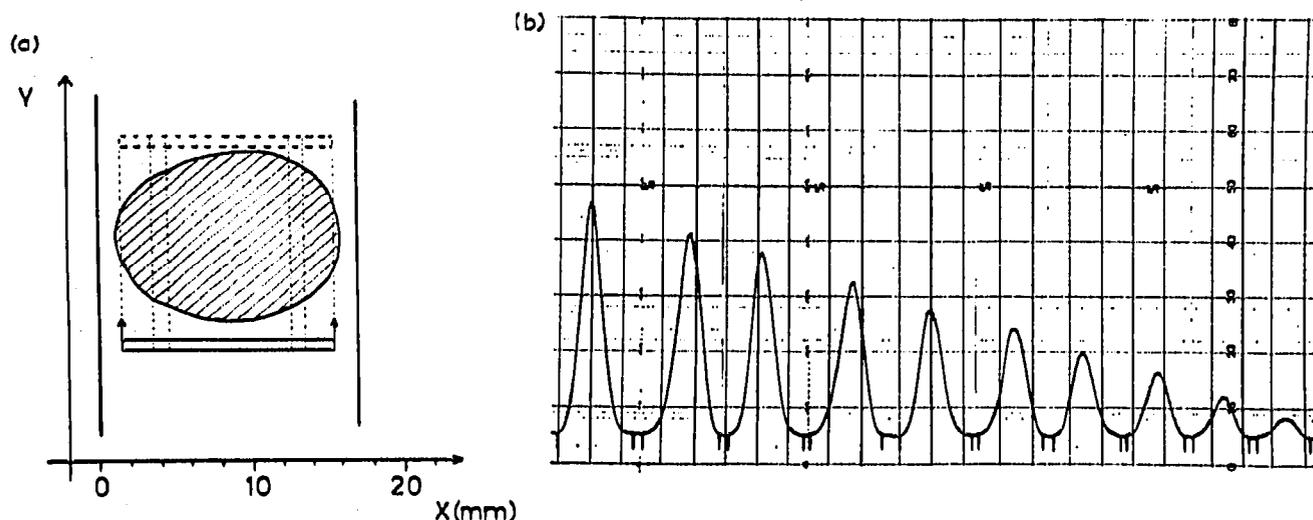


Fig. 3. (a) Zur Integrierung mit einem strichförmigen Spaltbild. (b) Ortskurven der eindimensionalen Messung einer Substanzserie; siehe Fig. 2b. Geschwindigkeit des Objektisches: 30 mm/min. Schreibergeschwindigkeit: 30 mm/min. Messverfahren: Simultantechnik.

Die Messungen bezogen sich auf einen Konzentrationsbereich von 1–15 μg . Die Kalibrationskurven wurden bereits in einer präliminären Mitteilung² veröffentlicht.

Die Tabelle I zeigt, wie die Variierung der Bedingungen die Kalibrationskurven beeinflusst. Die Prüfung der Resultate erfolgte durch statistische Berechnungen der Standardserien. Es wurden folgende Grössen untersucht: a und b in der allgemeinen Formel $Y = a + b \cdot X$, sowie Korrelationskoeffizient (r) und die Standardabweichung der Regressionskoeffizienten ($\pm s_b$). Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate (Tabelle I).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Aussagekraft der Untersuchungen

Bei der Beurteilung der Zuverlässigkeit eines Gerätes ist es äusserst wichtig darauf zu achten, dass chemisch-methodische Fehler ausgeschlossen werden. Es wurde in den früheren Arbeiten gezeigt, dass Substanzen, die eigene Lichtabsorption haben, für die Prüfung von Densitometern besonders geeignet sind^{1,2}.

Die Oxosteroid-2,4-dinitrophenylhydrazone haben sich für die quantitative Bestimmung von Steroidhormonen hinlänglich bewährt^{9,10}. Es handelt sich bei denen um wohldefinierte Verbindungen. An Hand ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften¹⁵ ist es verständlich, dass ihre chromatographische Auftrennung leicht und ihre quantitative photometrische Ermittlung zuverlässig und empfindlich durchgeführt werden kann.

Es lagen auch weitere Gründe vor, warum eben Testosteron als eine der Modellsubstanzen ausgewählt wurde: man konnte leicht die durch eine Reaktion erfolgte Veränderung der Lage des Absorptionsmaximums untersuchen, genauso wie bei Homogentisinsäure. Durch solche spezifische Farbreaktionen, die quantitativ ablaufen, können sehr wertvolle Informationen erhalten werden.

Testosteron-2,4-dinitrophenylhydrazon war ein dankbares Modell auch bei Untersuchungen des Einflusses der Fleckenform. Die Auftrennung der Fraktion in syn-

und anti-Isomere^{10, 16} im System II ergab eine hervorragende Möglichkeit zur Untersuchung des Funktionstransformators.

Um die durch ungleichmässige Verteilung der chromatographierten Substanz verursachten Fehler auszuschliessen, wurde die Prüfung des Umwandlers mit zweidimensionaler Integrierung eingeleitet. Die Grösse des Spaltbildes (Durchmesser = 1 mm) war im Verhältnis zu den Dimensionen der chromatographischen Zonen zu vernachlässigen. Über die zufriedenstellenden statistischen Werte (Tabelle I, Versuchs-Nr. 1, 2 und 3) hinaus konnte man zeigen, dass die Reproduzierbarkeit auch zwischen zwei Platten und bei extrem unterschiedlichen Fleckenformen hervorragend ist (Tabelle I, Versuchs-Nr. 1 und 2).

Eine automatische Gerätekombination ist zur Zeit leider nicht erhältlich, die die zweidimensionalen Messungen unter obigen Bedingungen ermöglichen könnte. Es war daher sehr wichtig die Bedingungen den zumindest vorübergehend üblichen Spaltinstrumenten anzupassen. Die Tabelle I zeigt eine Zusammenstellung über die Untersuchungen.

Unsere Ausrüstung liefert auch mit strichförmigem Spaltbild zufriedenstellende Resultate, wenn (1) die Auftragung der Proben mit der gleichen Lösungsmittelmenge erfolgt hat, wodurch die Grösse und Form der Flecke nahezu konstant ist¹⁷, (2) die Messungen mit Hilfe der Remissions- oder Simultantechnik durchgeführt werden und (3) die Länge des Spaltbildes den Dimensionen der Flecke angepasst wird.

Die ungleichmässige Verteilung der chromatographierten Substanz in der Ebene der Schicht verursacht eine scheinbare Verringerung der Konstante I_0 . Dieser Effect kann durch die richtige Wahl der Stichblende oder der maximalen Spannung des Umwandlers ($U_{m,A} = f \cdot U_m$, korrigierte maximale Spannung) teilweise kompensiert werden (Tabelle I).

An dieser Stelle soll betont werden, dass diese Modifizierungen nur vorübergehende Notmassnahmen sein sollten und sie können die Überlegenheit der zweidimensionalen Integrierung nicht in Frage stellen.

Methodologische Gesichtspunkte

Es dürfte nachträglich als Überraschung gelten, dass sich Methoden mit isopenmarkierten Reagenzien früher und schneller verbreitet haben, als solche, die mit der erheblich billigeren und einfacheren fluorimetrischen oder photometrischen Markierung arbeiten. Ausser der etwas grösseren Empfindlichkeit bieten die isopenmarkierten Reagenzien überhaupt keine Vorteile den stabilen farbigen Derivaten gegenüber. Wenn es auf die Spezifität und Kontrollierbarkeit angeht, so ist die photometrische Markierung häufig zuverlässiger: man sieht die Fraktionen auf dem Chromatogramm z.B. Bei isopenmarkierten Reagenzien erhalten sämtliche Derivate eine einzige Strahlungsenergie, diejenige des Isotopes, während bei photometrischer Markierung die Möglichkeit besteht strukturspezifische Lichtabsorption und chromatographische Eigenschaften zu bekommen^{9, 10, 18}, um nur die wichtigsten methodologischen Vorteile zu erwähnen.

Wirtschaftliche Faktoren spielen beim Vergleichen ebenfalls eine wichtige Rolle: die Photometer sind in der Regel billiger und vielseitiger als Instrumente für Messung der Radioaktivität.

Es ist zu erwarten, dass das lineare Detektorsystem für die Direktauswertung von Chromatogrammen die methodische Weiterentwicklung in der klinischen Chemie,

Pharmakologie und der allgemeinen chromatographischen Technik beschleunigen wird. Es werden papier- und dünnschichtchromatographische Methoden für die Diagnostizierung von metabolischen Krankheiten^{16,18} vorgeschlagen, die heute teilweise nur qualitativ oder halbquantitativ sind. Eine quantitative Modifikation derartiger "Screening Tests" dürften die Massenspektrometer¹⁹ an Hand ihrer grossen Kapazität im selben Gebiet effektiv entlasten, einerseits. Andererseits, die Möglichkeiten für bescheiden ausgerüstete Laboratorien würden gesichert, die "Chromogen"- oder "Spot"-Methoden mit den unvergleichbar zuverlässigeren und leistungsfähigeren chromatographischen Verfahren zu ersetzen.

Weitere Entwicklungsarbeit

Obwohl unser Instrument zufriedenstellende Resultate lieferte, erscheint es möglich, ja sogar notwendig die mit der zweidimensionalen Integrierung gesammelten Erfahrungen zur Weiterentwicklung der vorhandenen Auswertungsmethode auszunützen.

Wir beschäftigen uns zur Zeit mit folgenden Fragestellungen: (1) Mit Hilfe von Lichtleitern²⁰ wird ein Zusatzgerät gebaut, was jedem beliebigen Photometertyp anschliessbar sein wird. Der Objektisch wird das zweidimensionale Abtasten von Messobjekten ermöglichen, wodurch die chromatographische Freiheit und Übertragbarkeit von Eichkurven von einer Platte auf die andere gesichert werden kann. Durch Verwendung von Doppelstrahlphotometer wird man in der Lage sein Absorptionsspektren direkt auf Chromatogrammen einfach aufzunehmen. (2) Die unter Ausführung befindliche Konstruktion wird uns erlauben, durch Verwendung von Computern vollautomatische Analysen durchzuführen. Ein ähnliches System ist bereits für mikroskopische Untersuchungen erhältlich²¹.

Für unsere Messobjekte fanden wir, dass eine gute Linearität erreicht wurde, wenn wir $K_T = 1$ und $K_R = 3$ gewählt hatten. Durch eine einfache Modifizierung des Funktionstransformators wird die Möglichkeit bestehen, nach richtiger Wahl der Konstanten K_T und K_R beliebige photometrische Messungen durchzuführen. In idealen Fällen hat man ja Aufgaben, die mit Hilfe der Lambert-Beer-Gleichung oder der Kubelka-Munk-Funktion gelöst werden können.

Die geplante Konstruktion sollte vor allem für ein der Gaschromatographie unzugängliches Gebiet geeignet sein. Mit anderen Worten: Substanzen, die Temperaturempfindlich sind oder sich nicht in flüchtige Derivate überführen lassen, dürften mit Hilfe der quantitativen Chromatographie an dünnen Schichten mit Erfolg direkt analysiert werden.

Über die im Gange befindlichen und geplanten Experimente wird in einer späteren Arbeit berichtet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein lineares Detektorsystem für die *in situ* quantitative Auswertung von Chromatogrammen konstruiert. Die Untersuchungen zeigen die Überlegenheit der zweidimensionalen Integrierung gegenüber der durch Spaltinstrumente ermöglichten eindimensionalen Messtechnik. Innerhalb eines breiten Konzentrationsbereiches wurden Korrelationskoeffizienten von über 0.9979 (zweidimensionale Integrierung) bzw. 0.9788 (eindimensionale Integrierung) erhalten. Für die selben Mess-

verfahren betrug die Standardabweichung der Regressionskoeffizienten $\leq 2.3\%$ bzw. $\leq 7.4\%$. Die Anwendbarkeit und Entwicklungsmöglichkeiten der vorliegenden Messmethodik werden diskutiert.

LITERATUR

- 1 L. R. TREIBER, R. NORDBERG, S. LINDSTEDT UND P. STÖLLNBERGER, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 211.
- 2 L. R. TREIBER, *J. Chromatogr.*, 69 (1972) 399.
- 3 P. F. LOTT UND R. J. HURTUBISE, *J. Chem. Educ.*, 48 (1971) A481.
- 4 E. CREMER, TH. KRAUS UND H. NAU, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 245 (1969) 37.
- 5 K. BEYERMANN UND J. DIETZ, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 256 (1971) 349.
- 6 J. GOLDMAN UND R. R. GOODALL, *J. Chromatogr.*, 40 (1969) 345.
- 7 G. KYNAST, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 256 (1971) 20.
- 8 R. W. FREI UND J. F. LAWRENCE, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 174.
- 9 L. TREIBER UND G. W. OERTEL, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 5 (1967) 83.
- 10 L. R. TREIBER, *Clin. Chim. Acta*, 38 (1972) 171.
- 11 J. C. TOUCHSTONE, T. MURAWEC, M. KASPAROW UND A. K. BALIN, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 81.
- 12 W. H. NUTTING, R. A. JEWELL UND H. RAPOPORT, *J. Org. Chem.*, 35 (1970) 505.
- 13 R. W. FREI, *J. Chromatogr.*, 64 (1972) 285.
- 14 V. POLLAK UND A. A. BOULTON, *J. Chromatogr.*, 45 (1969) 200.
- 15 R. LIBERT UND R. DE HERTOIGH, *Anal. Biochem.*, 40 (1971) 351.
- 16 N. E. BRANDSTRUP UND L. R. TREIBER, *J. Steroid Biochem.*, 2 (1971) 133.
- 17 H. JORK, *J. Chromatogr.*, 48 (1970) 372.
- 18 A. STUBER, *Clin. Chim. Acta*, 36 (1972) 309.
- 19 E. JELLUM, O. STOKKE UND L. ELDJARN, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 27 (1971) 273.
- 20 H. KELLER, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 7 (1969) 501.
- 21 H.-G. ZIMMER, *Zeiss Inf.*, 17 (1970) 126.