

CHROM. 6702

BEEINFLUSSUNG DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHEN REMISSIONSMESSUNG DURCH ARBEITSTECHNISCHE FAKTOREN

III. SIMULTANMESSUNG UND IHRE EINFLUSSFAKTOREN

H. JORK

Universität des Saarlandes, Fachbereich 15, 1 Pharmakognosie und Analytische Phytochemie, 66 Saarbrücken 11 (B.R.D.)

SUMMARY

The influence on reflectance measurements of thin-layer chromatograms by technical factors. III. Factors influencing simultaneous measurements

Spectrophotometric reflectance measurements are often used for the direct determination of thin-layer chromatograms. Since the scattering behaviour of the stationary phase varies as a result of different layer thickness, particle size and packing density, disturbances occur in the baseline pattern in the visible range of the spectrum. Smoothing of the background is possible when the influencing factors are known. This is achieved by simultaneous detection of the reflected and transmitted radiation and by compensation corrections of the reflectance curve. As a result of this simultaneous measurement the detection limit will be improved by a factor of 10 to 100, so that nanogram-amounts can also be unambiguously detected both qualitatively and quantitatively. The reproducibility of the total analysis is in the nanogram-range about $s = 5-7\%$. Calibration curves through the zero point are obtained.

EINLEITUNG

Zur quantitativen Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen haben sich die spektralphotometrischen Messmethoden durchgesetzt. Vorteilhaft hat sich dabei erwiesen, dass das Ausschaben, Eluieren und Einstellen der Messlösung entfällt, wie es bei den indirekten Auswerteverfahren notwendig ist. Damit werden auch die Fehlermöglichkeiten der Transfertechniken ausgeschlossen. Die benötigten Substanzmengen liegen im Gegensatz zu Küvettenmessungen im Mikrogramm-Bereich, so dass die Direktauswertung absorbierender oder fluoreszierender Substanzonen für die Metabolitenforschung, die Spurenanalyse in Kontroll-Laboratorien, die Umweltforschung usw. interessant ist. Bewährt haben sich Remissionsmessungen im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich bis zu $\lambda = 200 \text{ nm}^{1,2}$. Sie werden weniger stark durch Schichtdickenunterschiede beeinflusst als Transmissionsmessungen^{3,4}. Dennoch treten speziell bei der Auswertung im sichtbaren Spektralgebiet Störungen aufgrund unterschiedlicher Streueigenschaften der Schicht auf.

Zur Behebung werden Zweistrahl-Messungen^{5,10,12,13,26} bzw. Bestimmungen, die nach dem "double-wavelength"-Prinzip arbeiten, empfohlen¹⁴. Geeigneter erscheinen jedoch Simultanmessungen, weil sie am gleichen Ort mit der gleichen Wellenlänge ausgeführt werden^{15,16}. Die Nachweisgrenze wird deutlich verbessert. Dadurch kann die Direktauswertung farbiger Substanzen in den Nanogramm-Bereich verlagert werden.

STÖRUNGSMÖGLICHKEITEN BEI DER DIREKTAUSWERTUNG

Als Grenzgesetz für Messungen an lichtstreuenden Medien gilt die Kubelka-Munk Funktion (1)^{17,18}:

$$\frac{(1 - R)^2}{2R} = \frac{k}{s} \quad (1)$$

$$k = \frac{a}{V} \cdot \varepsilon = a \cdot \frac{\varepsilon}{F \cdot d} \quad (1a)$$

$$\frac{(1 - R)^2}{2R} = \frac{\varepsilon}{F \cdot d \cdot s} \cdot a \quad (2)$$

Darin bedeuten:

R = absoluter Remissionsgrad der Untersuchungssubstanz;

s = Streukoeffizient;

k = Absorptionskoeffizient;

a = aufgetragene Substanzmenge;

V = Schichtvolumen von a ;

F = Zonenfläche auf dem Chromatogramm;

d = Schichtdicke der stationären Phase;

ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient.

Nach Gleichung 2 ist die chromatographierte Substanzmenge a der remittierten Messstrahlung direkt proportional, wenn die Fleckfläche F , die Schichtdicke d , der Streukoeffizient s und der Extinktionskoeffizient ε konstant sind. Dabei wird vorausgesetzt, dass keine eingestrahlte Energie durch die stationäre Phase hindurchtritt und so der Remissionsmessung verloren geht.

Nach Fig. 1 ist diese Forderung im ultravioletten Spektralbereich hinreichend erfüllt. Im sichtbaren Spektralgebiet muss dagegen mit Störungen gerechnet werden. Da sich die Schichtdicke, die Korngrößenverteilung und die Packungsdichte der stationären Phase örtlich ändern^{11,19}, ist auch der Energieverlust durch Transmission örtlich unterschiedlich. Folglich kann auch der Basislinienverlauf bei einer Registrierung in diesem Spektralbereich nicht störungsfrei sein. Die Fehler, die aufgrund des unterschiedlichen Streuverhaltens der stationären Phase auftreten, lassen sich durch Simultanmessungen beheben.

PRINZIP DER SIMULTANMESSUNG

Bei der Registrierung einer substanzfreien Chromatogrammbahn fällt auf, dass die Remissionskurve (R -Kurve) und die Transmissionskurve (T -Kurve) *gegen-sinnig* verlaufen^{1,16}. Nimmt die Streuung der Messstrahlung aufgrund einer grösseren

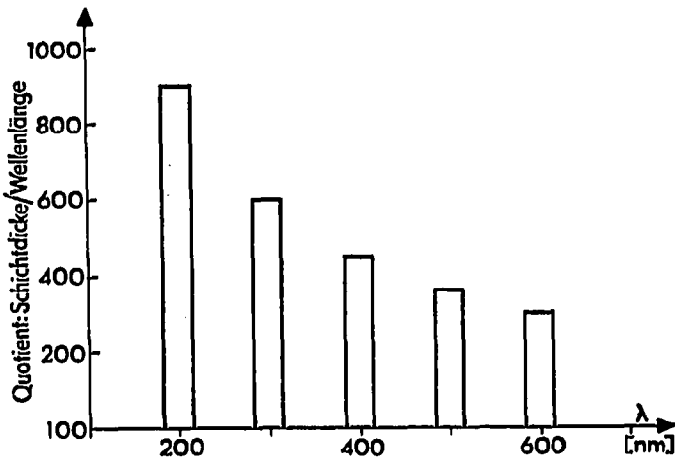


Fig. 1. Spektrale Abhängigkeit des Quotienten Schichtdicke/Wellenlänge für eine $180 \mu\text{m}$ dicke Kieselgel-Schicht.

Schichtdicke oder Packungsdichte der Sorbenspartikelchen zu (Fig. 2), so vergrößert sich der Remissionsgrad, während der transmittierte Strahlungsanteil abnimmt und umgekehrt.

Dagegen ändern sich sowohl Remissions- als auch Transmissionssignal in *gleichem* Sinne wenn die Änderung durch Absorption oder auch Fluoreszenz der zu messenden Substanz verursacht wird. Arbeitet man gleichzeitig mit je einem Empfänger im *R*- und *T*-Kanal (Simultanmessung), so addieren sich die "Substanzsignale", während sich die "Untergrundsignale" z. T. aufheben. Eine vollständige Kompensation wird erhalten, wenn das Spannungsverhältnis F_R/F_T aus dem *R*- und *T*-Kanal optimal gewählt wird (Fig. 3).

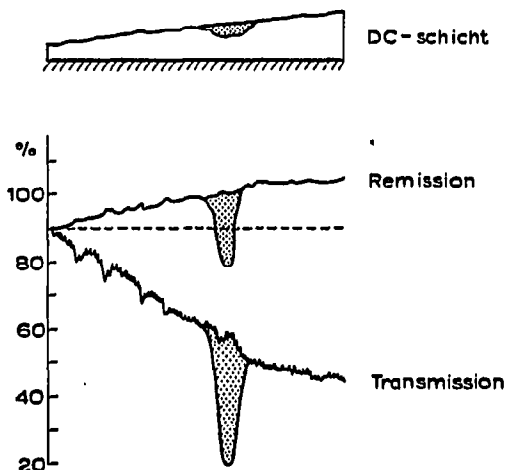


Fig. 2. Schematische Darstellung der Simultanmessung; Einzelheiten s. Text.

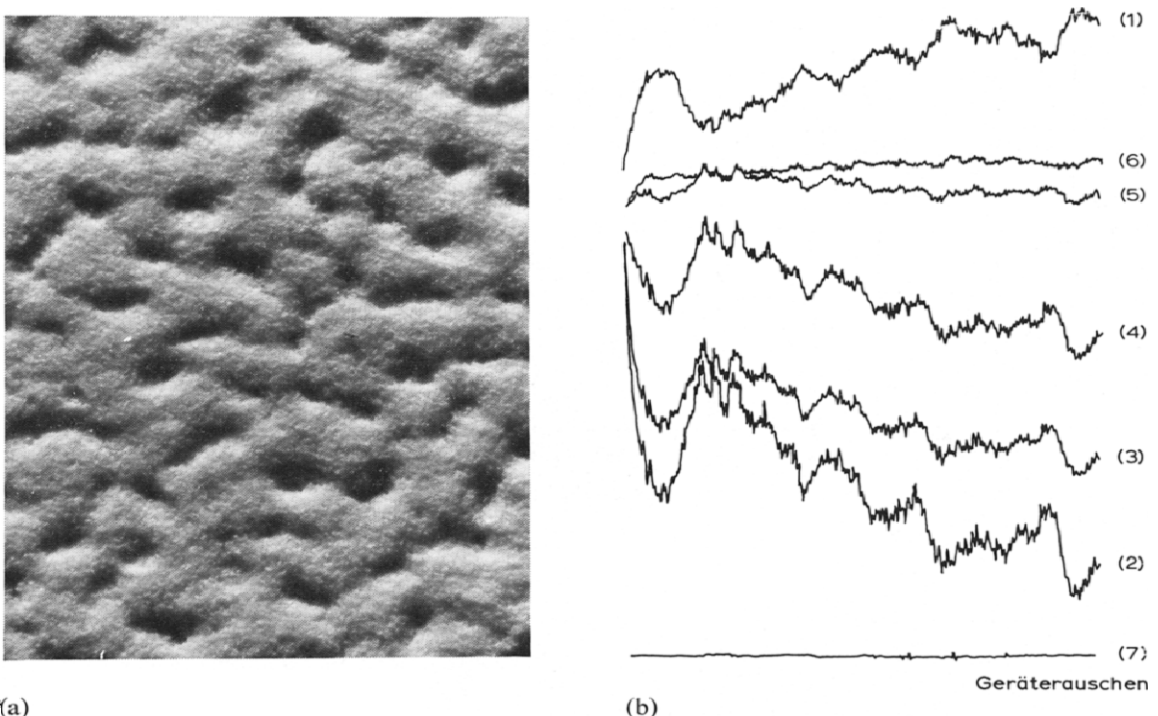


Fig. 3. Registrierung einer 180 μm dicken Kieselgel-Schicht in Remission, Transmission und simultaner Messanordnung; Messwellenlänge 500 nm. (a) Mikroaufnahme einer schlecht gestrichenen Kieselgel-Schicht; Vergrößerung 10-fach. (b) Absorptions-Ortskurven der gleichen Chromatogrammbahn. 1, Remissionskurve; 2, Transmissionskurve; 3, simultane Registrierungen $F_R/F_T = 100/75$; 4, $F_R/F_T = 100/50$; 5, $F_R/F_T = 100/33$; 6, $F_R/F_T = 100/25$; 7, Geräterauschen bei $F_R/F_T = 100/25$.

EINFLUSSGRÖSSEN

Wellenlängenabhängigkeit

Der Streukoeffizient s ist von der Wellenlänge und der Teilchengröße des Sorbens abhängig²⁰. Ändert sich die Messwellenlänge, so ändert sich auch das Streuverhalten der Schicht und damit das optimale F_R/F_T -Verhältnis. Im Bereich zwischen 700 und 450 nm ist diese Änderung vernachlässigbar gering. Je nach Hersteller, Charge und Schichtdicke liegt der empirisch gefundene F_R/F_T -Wert zwischen 2.5 und 3.5. Unterhalb von $\lambda = 450$ nm wird eine optimale Korrektur der R -Kurve mit geringeren F_T -Werten erreicht. Ab $\lambda = 350$ nm ist wegen der steigenden Absorption der stationären Phase eine Basislinienkorrektur nicht mehr notwendig.

Zu den gleichen Ergebnissen führten Untersuchungen mit Kieselguhr- und Polyamid-Schichten (Fig. 4). Bei Cellulose als stationärer Phase ist der Kurvenverlauf flacher, bei Aluminiumoxid-Schichten steiler.

Schichtdickenabhängigkeit

Bei den in Fig. 4 dargestellten Kurven wurden Dünnschichtchromatographie (DC)-Platten zur Messung eingesetzt, wie sie üblicherweise zur Chromatographie verwandt werden. Die Schichtdicke des Sorbens war unterschiedlich. Da dickere

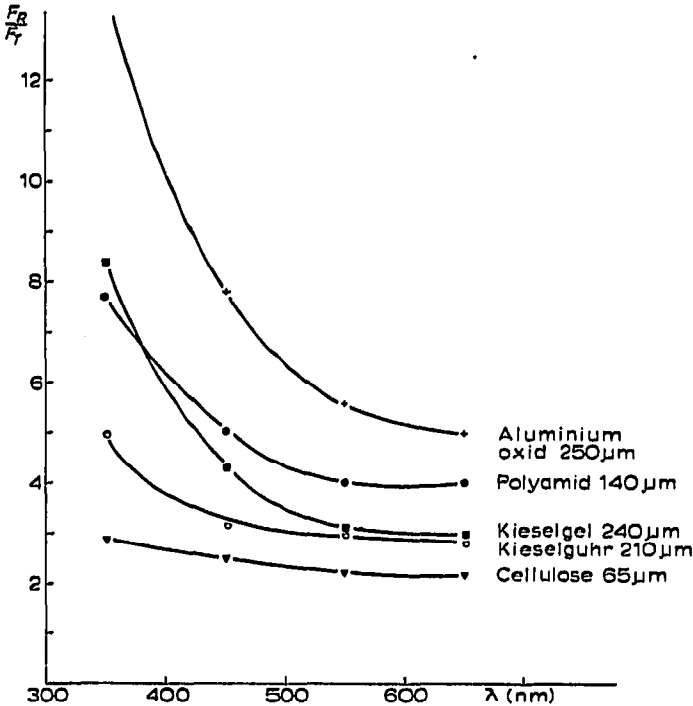


Fig. 4. Abhängigkeit des für die Basislinienglättung optimalen F_R/F_T -Wertes von der Messwellenlänge bei 5 verschiedenen stationären Phasen.

Schichten ein homogeneres Streuverhalten für die Messstrahlung besitzen als dünnere, werden zur Basislinienkorrektur kleinere F_T -Werte benötigt als bei dünneren stationären Phasen. Der Zahlenwert des Quotienten F_R/F_T ist hier grösser (z. B. 5 statt 3).

Bei Schichtdickendifferenzen von $\pm 10\%$ ist die Änderung der F_R/F_T -Werte in einem Wellenlängenbereich zwischen 700 und 450 nm unerheblich. Das bedeutet, dass eine optimale Basislinienglättung mit einem konstanten F_R/F_T -Wert erreicht wird. Bei kürzerwelliger Messstrahlung nimmt der Einfluss der Schichtdicke zunächst zu. Unter $\lambda = 400$ nm steigt dann die Absorption der Schicht so an, dass ein Einfluss der Schichtdicke ab $\lambda = 350$ nm nicht mehr festgestellt werden kann und damit eine Korrektur überflüssig wird. Fig. 5 zeigt die entsprechenden Kurvenzüge für Kieselgel-Schichten.

Korngrößenabhängigkeit

Zur Untersuchung des Korngrösseneinflusses wurden gleich dicke DC-Platten ($d = 160\text{--}170 \mu\text{m}$) mit unterschiedlicher Partikelgrösse hergestellt. Nach Fig. 6 liegt der F_R/F_T -Wert für feinkörnigere Kieselgelschichten (Korngrösse $10\text{--}30 \mu\text{m}$) deutlich höher als für stationäre Phasen, die sich aus $30\text{--}60 \mu\text{m}$ grossen Partikelchen aufbauen. Bei geringerer Korngrösse tritt weniger Strahlungsenergie durch die DC-Platte hindurch. Infolgedessen sind die Störungen, die auf Differenzen im Streuverhalten zurückzuführen sind, geringer. Die zur Basislinienkorrektur eingesetzte "Gegenspannung" kann also kleiner sein.

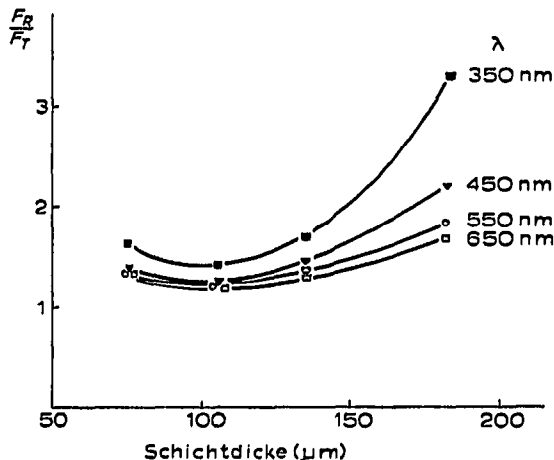


Fig. 5. Spektrale Abhängigkeit des F_R/F_T -Wertes von der Schichtdicke der stationären Phase.

QUANTITATIVE MESSUNGEN

Zur Registrierung der Chromatogrammzonen wird bei Verwendung des Simultanansatzes* das als optimal erkannte F_R/F_T -Verhältnis eingestellt. Damit wird die durch Streuung verursachte Untergrundstruktur eliminiert. Damit wird auch eine Ordinaten spreizung bei der Registrierung von Nanogramm-Mengen sinnvoll. Auf diese Weise lässt sich eine weitere Optimierung der Nachweisgrenze um etwa ein bis zwei Zehnerpotenzen erreichen. Diese Ordinaten spreizung kann ebenfalls mit Hilfe des Spreizungszusatzes durch Umschaltung des Schreiber messbereichs vorgenommen werden.

Bei zehnmaliger Registrierung der gleichen Chromatogrammzone (Sudanrot G, 40 ng; Peakfläche, 5300 mm²; Schreibervollausschlag, 2 mV) war die erreichte Reproduzierbarkeit besser als $s = \pm 1.6\%$. Da die Fehler von der Volumendosierung

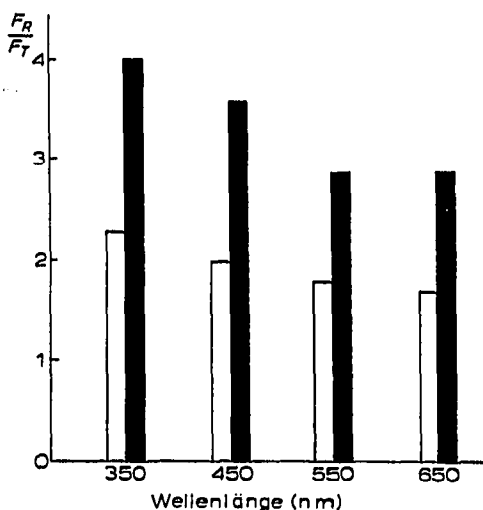


Fig. 6. Spektrale Abhängigkeit des F_R/F_T -Wertes von der Korngröße: ■, 10-30 µm; □, 30-60 µm.

* Hersteller: Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, B.R.D.

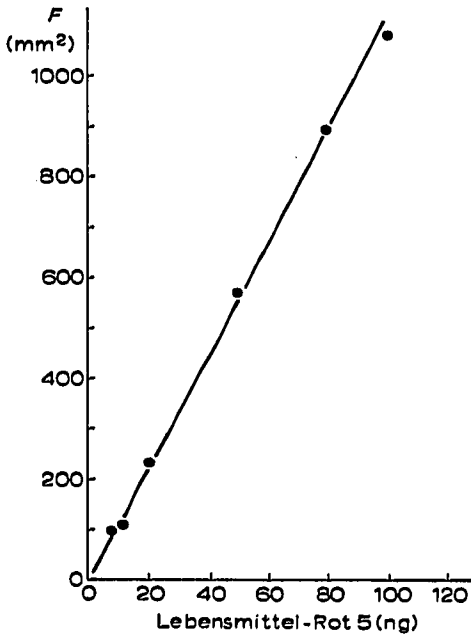


Fig. 7. Eichgerade zur Bestimmung des Lebensmittel-Rot 5 in Fruchtbonbons.

und der chromatographischen Entwicklung die gleichen bleiben wie bei den bisherigen Untersuchungen^{10,11,21-25}, liegt die Reproduzierbarkeit der Gesamtauswertung für Nanogramm-Mengen bei $s = \pm 5-7\%$.

Zur Aufstellung einer Eichgeraden werden die Peakflächen der registrierten Chromatogrammzonen zu den Auftragemengen in Beziehung gesetzt. Fig. 7 zeigt die Eichgerade zur Bestimmung von Lebensmittel-Rot 5 in Fruchtbonbons.

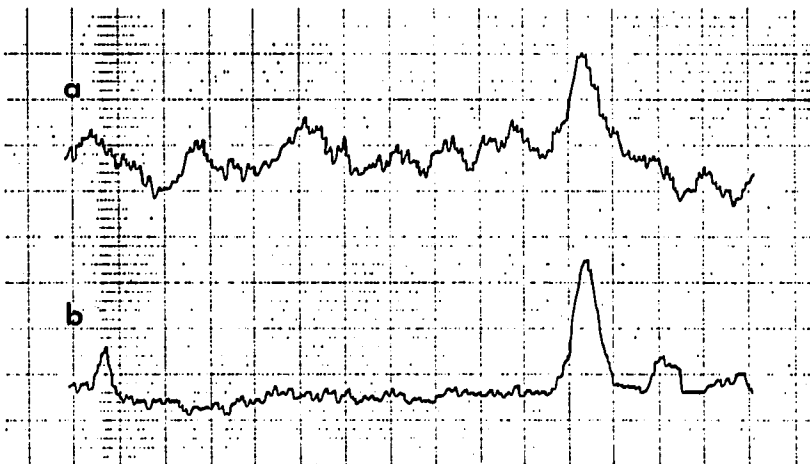


Fig. 8. Vergleichende Registrierung einer Sudanrot G-Zone (20 ng): (a) bisher mögliche Remissionsmessung; (b) simultan aufgenommene Absorptions-Ortskurve; Ordinatenstreuung: 10-fach; Wellenlänge: 500 nm; Verstärkung des Photostroms: 90-fach.

APPARATIVE AUSRÜSTUNG

Zur Messung wurde das Zeiss Chromatogramm Spektralphotometer verwendet, das bereits für Remissions- und Transmissionsmessungen ausgelegt ist. Zusätzlich wurde ein zweiter Photomultiplier und der neu entwickelte Simultanansatz benötigt, in dem das Faktorenverhältnis der Spannungen aus dem *R*- und *T*-Kanal innerhalb bestimmter Grenzen stufenlos eingestellt werden kann. Die Signale beider Kanäle werden zusammengeführt und als ein gemeinsames Endsignal dem Anzeigergerät zugeleitet und in gewohnter Weise weiter verarbeitet.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Bei den bisherigen Remissions- und Transmissionsmessungen an Dünnschichtchromatogrammen traten im sichtbaren Spektralbereich dadurch Störungen auf, dass die Schichtdicke oder Packungsdichte nicht homogen waren¹⁹ und sich infolgedessen die Streueigenschaften der stationären Phase in Abhängigkeit vom Ort änderten. Diese Störungen lassen sich durch simultane Remissions- und Transmissionsmessungen bei gleicher Wellenlänge und am gleichen Ort beseitigen. Das Verfahren bietet wesentliche Vorteile gegenüber anderen Versuchen der Eliminierung der genannten Störungen, z.B. durch Zweistrahl- oder Zweiwellenlängen-Messungen. Mit dem *Zweistrahlverfahren* wurden Mess- und Vergleichssignal an verschiedenen Orten der Schicht gemessen. Um Störungen, die durch Streueffekte verursacht sind, zu eliminieren, ist aber Voraussetzung, dass an beiden Orten die gleiche Störung auftritt. Dies ist oft nicht der Fall. Eine Basislinienglättung ist dann nicht möglich. Beim *Zweiwellenlängenverfahren* wurden Mess- und Vergleichssignal am gleichen Ort gemessen. Voraussetzung für eine Basislinienkorrektur ist, dass die Messwellenlänge im Absorptionsmaximum der zu untersuchenden Verbindung, die Vergleichswellenlänge aber ausserhalb des Absorptionsbereiches liegen muss. Da die Absorptionsbanden der adsorbierten Substanzen verhältnismässig breit sind, liegen die beiden Messwellenlängen 50 bis 100 nm auseinander. Unstimmigkeiten bei der Kompensation der Untergrundstruktur treten in diesem Fall dadurch auf, dass das Streuverhalten der Schicht, die Empfindlichkeit des Empfängers, die Verstärkung des Photostromes usw. für beide Messwellenlängen verschieden sind. Ausserdem müssen bei dieser Art der Messung jeweils zwei Wellenlängen für jede zu messende Substanz vor der eigentlichen Messung festgelegt werden.

Bei der Simultanmessung werden dagegen die Messergebnisse bei der gleichen Wellenlänge am gleichen Ort der DC-Platte und zwar in Transmission und Remission ermittelt. Dabei werden Peakflächen erhalten, die grösser sind als bei Remissionsmessungen allein. Die Untergrundstruktur der Basislinie ist deutlich verringert, so dass die Nachweisgrenze um den Faktor 10–100 gesenkt werden kann. Es können nun also auch quantitative Bestimmungen von Nanogramm-Mengen durchgeführt werden. Die erhaltenen Eichgeraden verlaufen durch den Nullpunkt, weil in diesem Mengenbereich die Peakfläche der Absorptions-Orts-Kurve in guter Näherung der Fläche der *k/s*-Kurve aus der Kubelka–Munk Funktion entspricht. Zur Flächenermittlung lassen sich besser als bisher Integratoren einsetzen, weil die Basislinienstruktur bis auf das minimale Geräterauschen verringert wurde (Fig. 9).

Die Glättung des Untergrundes wird von dem Spannungsverhältnis F_R/F_T

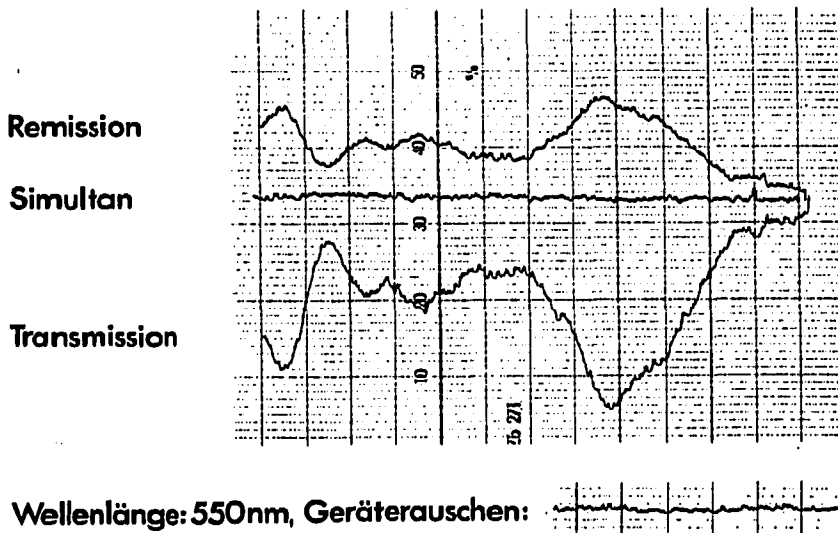


Fig. 9. Registrierung der Basislinienglättung durch Simultanmessung an einer $80 \mu\text{m}$ dicken Cellulose-Schicht. Faktorenverhältnis: $F_R/F_T = 100/45$; zweifache Ordinatenstreckung.

bestimmt. Dieser Quotient ist von der Schichtdicke, der Korngrösse (Porenweite) des Sorbens und der Messwellenlänge abhängig. Je grösser die Schichtdicke einer DC-Platte und je kleiner die Partikelgrösse des Sorbens ist, um so geringer ist der Transmissionsanteil der zur Basislinienkorrektur benötigt wird. Es ist darum zu begrüssen, dass einige Hersteller von Sorbentien das Korngrössenintervall ihrer Erzeugnisse verkleinert haben und für DC fast nur noch Schichtmaterialien empfehlen, deren Teilchengrösse zwischen 10 und $25 \mu\text{m}$ liegt.

Auch die Messwellenlänge spielt für die Grösse der Korrekturfaktoren eine Rolle. Im Bereich zwischen 700 und 450 nm ändert sich der Quotient nur minimal. Zu kürzeren Wellenlängen hin nehmen das Streuvermögen der Schicht und die Absorption so zu, dass immer weniger Strahlungsenergie in den Transmissionskanal eintritt. Damit entfällt für Wellenlängen unter 350 nm die Notwendigkeit einer Basislinienkorrektur.

Die Simultanmessung ist also ein Messprinzip, das ohne grösseren apparativen Aufwand dort eingesetzt werden kann, wo Messfehler aufgrund eines inkonstanten Streuverhaltens der stationären Phase auftreten. Durch die Glättung der Untergrundstruktur wird eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit und der quantitativen Auswertung erzielt, die über die bisherigen Möglichkeiten bei der Direktauswertung weit hinausgeht.

DANK

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen des SFB 52 "Analytik" durchgeführt und somit von der Deutschen Forschungsgemeinschaft grosszügig gefördert. Mein Dank gilt Fräulein Renate Klein für die gewissenhafte und zuverlässige Mitarbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen werden häufig spektralphotometrische Remissionsmessungen eingesetzt. Da das Streuverhalten der stationären Phase aufgrund unterschiedlicher Schichtdicke, Korngrösse und Packungsdichte wechselt, treten im sichtbaren Spektralbereich Störungen im Basislinienverlauf auf. Eine Glättung der Untergrundstruktur ist durch *gleichzeitige* Erfassung der zurückgestrahlten und hindurchgelassenen Messstrahlung und kompensierende Korrektur der Remissionskurve möglich. Durch diese Simultanmessung wird die Nachweisgrenze um den Faktor 10 bis 100 verbessert, so dass auch Nanogramm-Mengen eindeutig erkannt und quantitativ erfasst werden können. Die Reproduzierbarkeit der gesamten Analyse liegt im Nanogramm-Bereich bei $s = \pm 5-7\%$. Es werden Eichgeraden erhalten, die durch den Nullpunkt verlaufen.

LITERATUR

- 1 H. Jork, *Habilitationsschrift*, Saarbrücken, 1969.
- 2 W. Tausch, *Chimia*, 23 (1969) 46.
- 3 H. Jork, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 310.
- 4 W. Tausch, *Messtechnik*, (1972) 38.
- 5 G. M. Adams und T. L. Sallee, *J. Chromatogr.*, 54 (1971) 136.
- 6 P. Knapstein, L. Treiber und J. C. Touchstone, *Steroids*, 11 (1968) 915.
- 7 S. M. Lefar und A. D. Lewis, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 79A.
- 8 V. Novacek, *Amer. Lab.*, Dez. (1969) 27.
- 9 L. P. Fenzes und G. W. Oertel, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 322.
- 10 H. J. Petrowitz und S. Wagner, *Chem. Ztg.*, 95 (1971) 331.
- 11 V. Pollak und A. A. Boulton, *J. Chromatogr.*, 45 (1969) 200.
- 12 J. C. Touchstone, A. K. Balin, T. Murawec und M. Kasparow, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 443.
- 13 P. Knapstein und J. C. Touchstone, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 83.
- 14 Perkin-Elmer Co., *Instrum. News*, 21, No. 2 (1970) 8.
- 15 H. Jork, *Colloquium Spectroscopicum Internationale XVI, Heidelberg 1971, Symposiumsband; 5. Intern. Symposium f. Chromatographie, Karlsbad, 1972 (Vortrag); 20. Vortragstagung der Ges. f. Arzneipflanzenforschung, Helsinki, 1972; Deut. Apoth.-Ztg.*, 112 (1972).
- 16 L. R. Treiber, R. Nordberg, S. Lindstedt und P. Stöllnberger, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 211.
- 17 P. Kubelka und F. Munk, *Z. Techn. Phys.*, 12 (1931) 593.
- 18 P. Kubelka, *J. Opt. Soc. Amer.*, 38 (1948) 448, 1067.
- 19 H. Jork, *Pharma Int.*, 4 (1968) 11.
- 20 G. Kortüm, *Reflexionsspektroskopie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.
- 21 E. Eich, H. Geissler, E. Mutschler und W. Schunack, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 1895.
- 22 U. Hezel, *Z. Anal. Chem.*, (1973) im Druck.
- 23 H. Jork, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 17.
- 24 W. Schlemmer, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 121.
- 25 W. Schunack, E. Eich, E. Mutschler und H. Rochelmeyer, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 1756.
- 26 G. Backhaus, *GIT*, 17 (1973) 35.