

CHROM. 6931

PHOTOMETRIE VON DÜNNSCHICHTPLATTEN MIT SICHTBAREM UND INFRAROT LICHT DURCH LEUCHTDIODEN

M. WENZEL

Biochemische Abteilung, Pharmazeutisches Institut, Freie Universität Berlin, D 1 Berlin-Dahlem (B.R.D.)

(Eingegangen am 2. Juli 1973)

SUMMARY

Photometric evaluation of thin layers by visual and infrared light diode emitters

The densitometric evaluation of dyes on thin layers without the use of a monochromator and filter and without darkening the chromatogram is possible using a photometer equipped with light-emitting diodes of the gallium-arsenide type. A linear relationship between extinction and concentration of the dye was demonstrated. Irregularities in the thickness of the coating material of the thin layers can be detected and compensated by double-beam measurement with infrared-emitting diodes.

EINLEITUNG

Die quantitative Direktauswertung chromatographisch getrennter Substanzen ist sowohl durch Radioaktivitätsmessungen^{1,2} als auch mit Hilfe photometrischer Methoden möglich³. Die photometrische Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen kann durch Transmissions- oder durch Reflexionsmessung erfolgen. Für beide Methoden werden Vor- und Nachteile angegeben^{4–7}. In beiden Fällen können die Lichtstreuung durch das Trägermaterial und besonders die Inhomogenität der Dünnschicht erhebliche Messfehler verursachen⁷.

Ausserdem führt der Einfall von Nebenlicht zu weiteren Messfehlern, weil Nebenlicht nicht nur direkt sondern auch durch Lichtleitung in der Glasplatte den Messort erreichen kann. Vermeidbar ist dieser Fehler nur bei rigorösem Ausschluss von Nebenlicht. Dies ist aber gerade bei Dünnschichtplatten —wegen der leichten mechanischen Zerstorbarkeit— schwieriger als bei festen Messproben oder bei Papierchromatogrammen.

Die folgende Arbeit zeigt Wege auf, wie durch den Ersatz üblicher Lichtquellen durch Leuchtdioden derartige Fehler vermindert werden können.

MATERIAL UND METHODEN

Aufbau eines Photometers mit Leuchtdioden

Fast alle Photometer verwenden als Lichtquellen Strahler, die Gleichlicht aussenden. Da die Verstärkung von Wechselspannungssignalen wesentlich einfacher ist als die Verstärkung von Gleichspannung, wird bei vielen Photometern das primär

ausgesandte Gleichlicht durch mechanische Zerhacker (Chopper) in Wechsellicht transformiert.

Wesentlich einfacher ist die Erzeugung von Wechsellicht durch Leuchtdioden. Beim Betrieb mit Wechselspannungsgeneratoren senden Leuchtdioden Wechsellicht entsprechender Frequenz aus. Diese Lichtquellen haben für die Photometrie den weiteren Vorteil, dass sie Licht nur eines eng begrenzten Spektralbereiches aussenden. Durch die Wahl des Emissionsmaximums der benutzten Leuchtdiode kann man sich dennoch dem Absorptionsmaximum der zu analysierenden Substanz anpassen, spart aber Monochromatoren oder Filter. Ausserdem lässt sich mit Leuchtdioden relativ

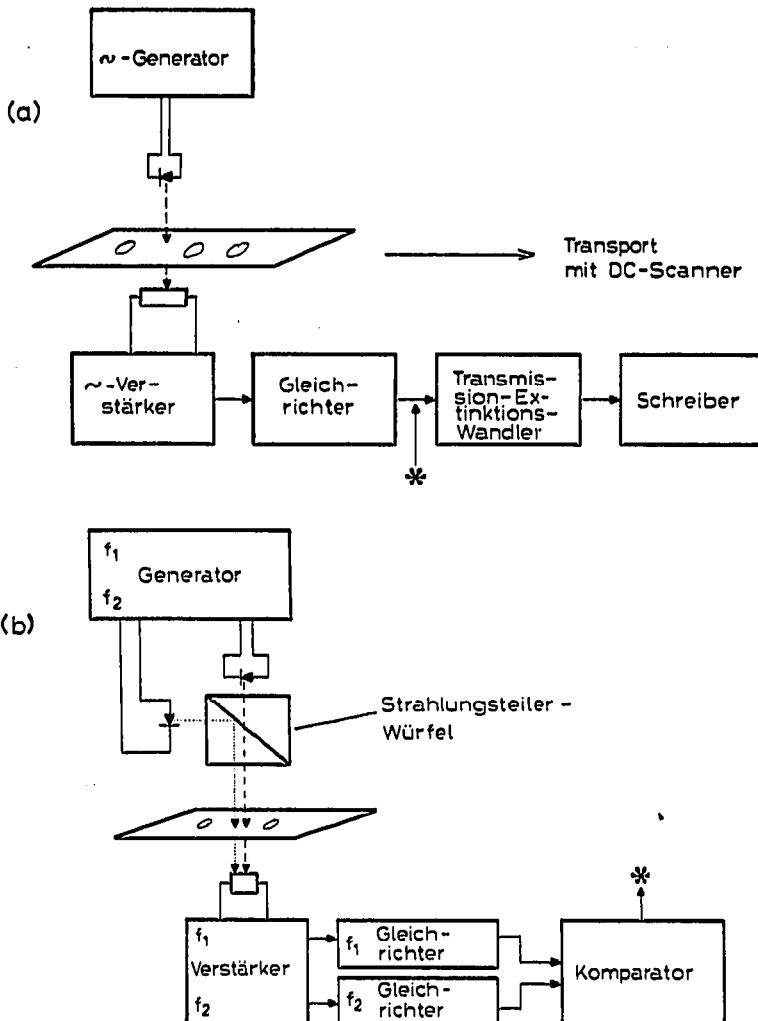


Fig. 1. Schema über den Aufbau eines Photometers mit Leuchtdioden. (a) Normale Arbeitsweise. (b) Arbeitsweise bei Doppelstrahlmessungen zur Kompensation von Schichtdickenänderungen. Eine Leuchtdiode mit Emissionsmaximum im sichtbaren Licht wird mit der Frequenz f_1 betrieben, die Leuchtdiode für infrarot Licht mit der Frequenz f_2 .

leicht eine erhebliche Fehlerquelle der photometrischen Direktmessung auf Dünnschichtplatten beherrschen: die Inhomogenität der Dünnschicht.

Den prinzipiellen Aufbau des Photometers gibt Fig. 1 wieder. Der Lichtsender besteht aus einem Wechselspannungsgenerator für die Frequenzen 350 und 680 Hz, mit denen die Leuchtdioden betrieben wurden. Als Leuchtdioden (Galliumphosphid oder -arsenid) wurden verwendet:

- MV1, orange = 610 μm (Monsanto),
- SSL-3, grün = 539 μm (General Electric),
- MV 5040, rot = 660 μm (Monsanto),
- CQY 10, IR = 910 μm (Telefunken),
- SSL-5A, IR = 940 μm (General Electric).

Als Lichtempfänger dient ein Si-Photoelement (BPY 72, Telefunken). Das Signal wird einem selektiven Wechselspannungsverstärker für 350 und 680 Hz mit angegeschlossenem Messgleichrichter zugeführt. An den Gleichrichter ist ein Log-Verstärker mit Linienschreiber angeschlossen (Fig. 1). Bei diesem Verstärker-Schreiber-System konnten in üblicher Weise die Endpunkte für Extinktion=0 und Extinktion=1 festgelegt werden.

Die Linearität zwischen emittierter Lichtenergie (gemessen als Betriebsstrom der Leuchtdiode) und der Ausgangsspannung des Photoverstärkers wurde überprüft. Nach hier nicht wiedergegebenen Versuchen arbeitete der Verstärker über einen Bereich von mehreren Zehnerpotenzen linear.

Die Messobjekte (Dünnschichtplatte oder Celluloseacetat-Elektropherogramme) wurden mittels der Leuchtdiode durch einen Spalt von 10×0.7 mm beleuchtet. Um Streulicht abzufangen wurde ein weiterer Spalt von 10×0.7 mm hinter das Messobjekt vor das Si-Photoelement gesetzt.

Dünnschichtplatten

Für die Messungen wurden Fertigplatten (Kieselgel HF 0.25 mm; Merck, Darmstadt, B.R.D.) benutzt. Die Dünnschichtplatten wurden durch den optischen Teil des Photometers mit dem "Dünnschicht-Scanner" LB 2732 (Lab. Prof. Berthold, Wildbad, B.R.D.) mit der gleichen Vorschubgeschwindigkeit wie das Registrierpapier im Schreiber transportiert.

Herstellung der Eichwerte auf der Dünnschichtplatte

Die Eichung des Photometers wurde mit dem grünen Lebensmittelfarbstoff "1475 Pfefferminz-Grün" der Fa. Haarmann und Reimer (Holzminden, B.R.D.) durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe wurden auf die Dünnschichtplatten etwa alle 2 cm mittels eines Pinsels Farbstofflösungen genau gekannter Konzentrationen auf rechteckige Flächen von mindestens 10×30 mm aufgetragen. Hierbei wurde der Maximalwert der Extinktion bestimmt, die Maxima wurden nicht planimetriert.

Bei einem weiteren Versuch wurde die Farbstofflösung punktförmig (kreisförmiges Areal mit etwa 3–7 mm Durchmesser) mit einer Konstriktionspipette aufgetragen. In diesem Fall bestimmt man mit dem Photometer-Schreiber-System die Extinktion des gesamten Fleckes in Abhängigkeit vom Ort mit anschließender Planimetrie.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Photometrie auf Dünnschichtplatten mit Leuchtdioden

Für die Auswertung von Chromatogrammen mit Hilfe von modulierten Leuchtdioden wählten wir stets die Messung im durchfallenden Licht, da die Transmissionsmethode empfindlicher sein soll als die Remissionsmessung^{6,8}. Die Funktionstüchtigkeit der Anordnung wurde durch Eichkurven entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz mit zwei verschiedenen Methoden überprüft. Einmal wurden dazu auf Dünnschichtplatten Farblösungen steigender Konzentrationen aufgetragen und der Extinktionswert jedes Einzelflecks mit dem Leuchtdiodenphotometer gemessen. Fig. 2 gibt die gemessene Beziehung zwischen Maximalwert der Extinktion bei $670 \mu\text{m}$ und Farbstoffkonzentration in den Flecken wieder. Diese Eichkurve zeigt eine gute Linearität zwischen beiden Grössen und beweist damit die Anwendbarkeit für die photometrische Auswertung von Chromatogrammen.

In einem weiteren Versuch wurden steigende Mengen eines Farbstoffs auf einer Dünnschichtplatte mit Kieselgel aufgetragen und anschliessend die Extinktion der Platte kontinuierlich im durchfallenden Licht mit dem Schreiber registriert (Fig. 3). Unter der Annahme einer linearen Beziehung zwischen Extinktion und Farbstoffkonzentration wurden die einzelnen Maxima der Densitometerkurve gemäss Fig. 3a integriert. Das Integral wurde gegen die Farbstoffmenge im Einzelfleck in Fig. 4 aufgetragen.

Um die mit dem Leuchtdiodenphotometer erhaltenen Werte mit einer anderen Methode vergleichen zu können, wurden die Flecke ebenfalls mit dem Zeiss Chromatogrammspektralphotometer (Zeiss, Oberkochen/Württemberg, B.R.D.) durch Remissionsmessung ausgewertet. Dabei wurde in üblicher Weise gemäss der Kubelka-Munk-Beziehung eine lineare Relation zwischen Konzentration und verminderter Lichtreflexion angenommen und dementsprechend die Einzelmaxima integriert.

Die Ergebnisse beider Messungen sind in Fig. 4 gegenüber gestellt.

Nach Fig. 4 führt diese Messung mit Leuchtdioden im Durchstrahl-Verfahren zu einer linearen Beziehung zwischen Extinktionsintegral und Farbstoffmenge. Wegen

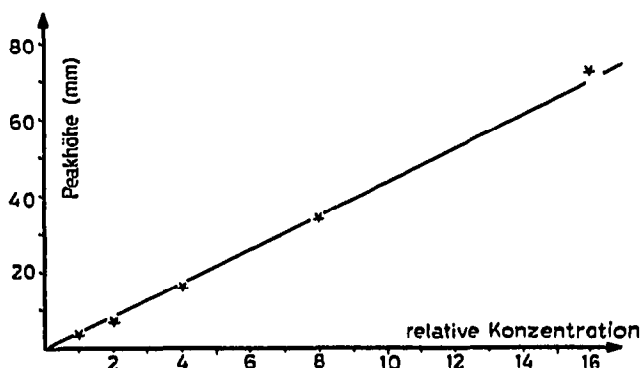


Fig. 2. Beziehung zwischen Peakhöhe und relativer Farbstoff-Konzentration auf DC-Platte. Es wurde bei $\lambda = 670 \mu\text{m}$ die Peakhöhe verschiedenen Farbstoffflecken (Pfefferminz-Grün) gemessen. Die Farbstofflösungen wurden durch geometrische Verdünnung aus der Ausgangslösung (relative Konzentration 16) hergestellt. Vergl. Material und Methoden.

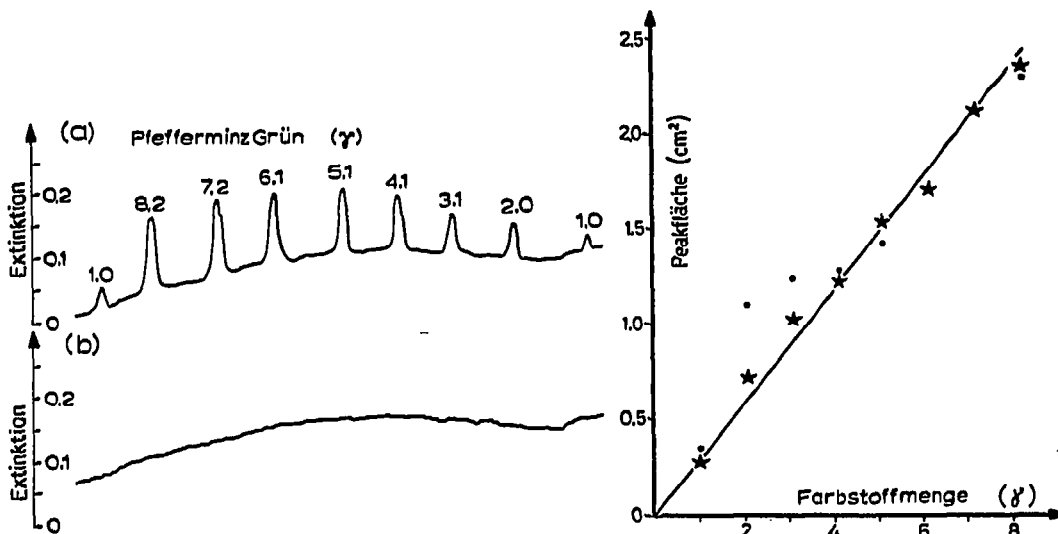


Fig. 3. Densitometerkurve beim Ausmessen verschiedener Farbstoffmengen auf DC-Platten mit Leuchtdiodenphotometer. Farbstoff: Pfefferminz-Grün, (vgl. Material und Methoden). (a) Messung bei $670 \mu\text{m}$, Frequenz der Leuchtdiode 350 Hz. (b) Messung derselben Platte im gleichen R_F -Bereich bei $940 \mu\text{m}$, Frequenz der Leuchtdiode 680 Hz. Beide Messungen im durchfallenden Licht (Transmissionsmessung).

Fig. 4. Beziehung zwischen Peakfläche und Farbstoffmenge. \star , Es wurde die Peakfläche der Densitometerkurve gegen die Menge an Farbstoff (Pfefferminz-Grün) aufgetragen. Extinktionsmessung im durchfallenden Licht. (Emissionsmaximum der Leuchtdiode bei $670 \mu\text{m}$). \bullet , Es wurde die Peakfläche der Remissionsmessung ($670 \mu\text{m}$) gegen die Farbstoffmenge aufgetragen. Messung mit dem Zeiss Chromatogram-Spektralphotometer.

der Verwendung von moduliertem Licht ist dieses Ergebnis — bei nicht abgedunkelten Dünnschichtplatten — unabhängig von der Raumbeleuchtung. Die Remissionsmessung verbunden mit der Auswertung gemäss Kubelka-Munk führt dagegen im unteren Konzentrationsbereich zu Abweichungen von der Eichgeraden, wie die durch Punkte dargestellten Messwerte in Fig. 4 zeigen.

Das Photometer gibt ebenfalls gute Resultate bei der Auswertung angefärbter Serum-Elektrophoresen auf Celluloseacetat-Folie.

Aus Fig. 3 (oberer Teil) kann man ausserdem die Ortsabhängigkeit der Eigenextinktion der Dünnschichtplatte bei der Messwellenlänge von $670 \mu\text{m}$ erkennen. Neben den Maxima der Einzelflecken des Farbstoffs sieht man die unterschiedliche Lichtdurchlässigkeit der Dünnschichtplatte in verschiedenen Positionen mit Differenzen bis zu 0.2 Extinktionseinheiten. Diese Schwankung der Nulllinie beruht auf der Inhomogenität der Dünnschicht. Diese Änderungen der Lichtdurchlässigkeit an verschiedenen geometrischen Orten der Platte kann somit Transmissionsänderungen (oder Reflexionsänderungen) durch die zu messende Substanz vortäuschen.

Die Variabilität der Eigenabsorption der Dünnschicht kann durch das parallele Erfassen des gleichen Messorts mit zwei verschiedenen Leuchtdioden leicht erkannt und kompensiert werden. Wie ein Vergleich des oberen und unteren Teil der Fig. 3 zeigt, lassen sich Schwankungen der Eigenabsorption der Dünnschicht durch eine Leuchtdiode erfassen, die im kurzwelligen Ultrarotbereich ($940 \mu\text{m}$) arbeitet. Da

diese Leuchtdiode mit einer anderen Frequenz als der Messtrahl moduliert werden kann, ist es also möglich, den gleichen Ort der Platte gleichzeitig mit den Lichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen zu durchstrahlen⁹. Bei diesem Doppelstrahlverfahren kann man mit einfachen Methoden die Signale jeder Wellenlänge getrennt verstärken und durch eine geeignete Schaltung die örtliche Änderung der Eigenabsorption kompensieren^{10,11}. Damit dürfte die Empfindlichkeit und Genauigkeit der photometrischen Auswertung auf Dünnschichtplatten wesentlich zu verbessern sein.

DANK

Wir danken Fräulein Bollert und Fräulein Hoffmann für die Präparation der Dünnschicht-Platten.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch das Verwenden von Leuchtdioden, die mit Wechselspannung betrieben werden, gelingt es, Photometer für Dünnschichtplatten zu entwickeln, die unabhängig von Fremdlicht sind und ohne Monochromator oder Filter mit durchfallendem Licht arbeiten. Die Relation zwischen aufgetragener Farbstoffmenge und Extinktionswerten entspricht dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Mit Leuchtdioden für kurzwelliges Infrarot kann durch ein Doppelstrahlverfahren am Messort die Variabilität der Dicke der Kieselgelschicht kompensiert werden.

LITERATUR

- 1 B. A. Wood, in E. Shellard (Herausgeber), *Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography*, Academic Press, London, New York, 1968, S. 107.
- 2 M. Wenzel und K. Hoffmann, *Anal. Biochem.*, 44 (1971) 97.
- 3 H. Jork, *Z. Anal. Chem.*, 236 (1968) 310.
- 4 H. Jork, *J. Chromatogr.*, 48 (1970) 372.
- 5 H. Zürcher, G. Pataki, J. Borko und R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, 43 (1969) 457.
- 6 R. Klaus, *J. Chromatogr.*, 62 (1971) 99.
- 7 L. R. Treiber, R. Nordberg, S. Lindstedt und P. Stöllenberger, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 211.
- 8 J. Goldmann und R. R. Goodell, *J. Chromatogr.*, 40 (1969) 345.
- 9 M. Wenzel, *Deut. Pat., Offen.*, 2 151 005 (1971).
- 10 V. Pollak und A. A. Boulton, *J. Chromatogr.*, 45 (1969) 200.
- 11 V. Pollak und A. A. Boulton, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 87.