

CHROM. 13,940

ZUM EINFLUSS REFLEKTIERENDER TRÄGERMATERIALIEN BEI DER QUANTITATIVEN *IN SITU* HOCHLEISTUNGS-DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

UNTERSUCHUNGEN AM BEISPIEL EINER KIESELGEL 60-BESCHICHTUNG

Th. ECKERT* und U. KNIE

Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Münster, Hittorfstrasse 58–62, D-4400 Münster (B.R.D.)

(Eingegangen am 16. April 1981)

SUMMARY

Influence of reflecting supports of high-performance thin-layer chromatographic silica gel 60 stationary phase on quantitative in situ measurements of thin-layer chromatograms

The influence of aluminium-coated glass plates as a reflecting support (mirror effect) of silica gel 60 on baseline and sensitivity of absorption measurements as well as sensitivity of fluorescence measurements was examined.

The following results were obtained for high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) silica gel 60 aluminium-quartz-coated glass plates as compared to non-mirror-coated HPTLC silica gel 60 plates: (1) The baseline in absorption measurements shows a greater smoothness; (2) the sensitivity in absorption measurements is increased; the increase is dependent on the wavelength; (3) the sensitivity in fluorescence measurements is increased; the increase is dependent on the excitation wavelength.

HPTLC silica gel 60/aluminium foils, which were also examined, lead to intermediate results.

EINLEITUNG

Die Entwicklung der direkten quantitativen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen hat besonders in den letzten Jahren durch zwei Entwicklungslinien Fortschritte gemacht: Einmal im apparativen Bereich durch verbesserte Auftrage- und Trenntechniken, durch automatisierte bzw. rechnergesteuerte Chromatogrammspektralphotometer, aber auch im Bereich des Plattenmaterials, hier insbesondere durch Einführung der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC)-Platten^{1–3}.

Gerade die Einführung der HPTLC-Platte hat deutlich gemacht, dass die *in situ* Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen durch die Qualität der verwendeten TLC-Platten verbessert werden kann.

Im Sinne einer Verbesserung der TLC-Platten lag der im folgenden in seinen Ergebnissen näher beschriebene Gedanke, TLC-Platten zu verwenden, bei denen sich die Adsorbenschicht auf einer oberflächenverspiegelten Glasplatte befindet^{4,5}.

Die Beurteilung der Eigenschaften derartiger TLC-Platten muss durch einen Vergleich mit den bisher üblichen TLC-Platten mit Glas bzw. Aluminiumfolie als Trägermaterial erfolgen.

Es wurden daher im folgenden vergleichende Messungen durchgeführt zwischen HPTLC-Platten mit normalen Glasplatten, mit Aluminiumfolien und mit aluminiumbedampften (oberflächenverspiegelten) Glasplatten als Trägermaterial.

Die Untersuchungen sollten sich auf Grund unserer Überlegungen auf die (1) Basislinienbegradigung bei Absorptionsmessungen; (2) Empfindlichkeitssteigerung der Absorptionsmessung und (3) Empfindlichkeitssteigerung der Fluoreszenzmessung erstrecken.

THEORIE

Die neueren TLC-Spektralphotometer arbeiten fast ausschliesslich in der Remissions-Messanordnung, d.h. sie messen das von der Adsorbenschicht diffus reflektierte Licht. Die diffuse Reflexion des eingestrahnten Lichtes ist in erster Linie abhängig von der Beschaffenheit der Adsorbenschicht.

Bekanntlich zeigen alle TLC-Platten Schichtdickenschwankungen und lokale Inhomogenitäten der Adsorbenschicht. Da die Adsorbenschicht eine endliche Schichtdicke besitzt, kann ein erheblicher Teil des eingestrahnten Lichtes, besonders im sichtbaren Spektralbereich, die Adsorbenschicht durchdringen und wird vom Untergrund (Messtisch) absorbiert.

Aus diesem für die quantitative *in situ* Dünnschichtchromatographie nachteiligen Umstand liessen sich von TLC-Platten mit oberflächenverspiegeltem Trägermaterial die in der Einleitung genannten drei Effekte erwarten:

Basislinienbegradigung bei Absorptionsmessungen

Durch eine oberflächenverspiegelte Glasplatte könnten im Gegensatz zu normalem Glas als Trägermaterial unterschiedliche Remissionsgrade, die durch Schwankungen der Schichtdicke oder der Packungsdichte hervorgerufen werden, teilweise kompensiert werden.

Empfindlichkeitssteigerung der Absorptionsmessung

Dadurch, dass der Anteil des eingestrahnten Lichtes der die Adsorbenschicht durchdringt reflektiert wird und wieder aus der Adsorbenschicht herausgelangen kann, wird von einer TLC-Platte mit reflektierendem Trägermaterial mehr Licht remittiert als von einer TLC-Platte mit normaler Glasunterlage.

Das von einem Substanzfleck bei der Absorptionsmessung (in Remission) hervorgerufene Signal entsteht durch den Intensitätsunterschied des remittierten Lichtes an substanzfreier und substanzhaltiger Stelle auf der TLC-Platte.

Im Vergleich zu einer TLC-Platte mit normalem Glas als Trägermaterial sollte durch die Reflexion der Strahlung der Unterschied der remittierten Lichtmenge an substanzfreier und substanzhaltiger Stelle grösser werden. Dies müsste in einer Empfindlichkeitssteigerung der Absorptionsmessung zum Ausdruck kommen.

Empfindlichkeitssteigerung der Fluoreszenzmessung

Verwendet man statt einer einfachen Glasplatte eine oberflächenverspiegelte Glasplatte, so kann die messbare Fluoreszenzintensität in zweifacher Hinsicht erhöht werden.

Das Fluoreszenzlicht ist bei seiner Entstehung völlig ungerichtet. Der Teil, der die Adsorbenschicht durchdringt, geht bei einer TLC-Platte mit normalem Glas als Trägermaterial für die Messung verloren. Bei einer TLC-Platte mit reflektierendem Trägermaterial kann dieser Teil aus der Adsorbenschicht nach oben herausgestreut werden und so die Fluoreszenzintensität verstärken.

Zum anderen kann eingestrahktes Excitationslicht, das die Adsorbenschicht durchdrungen hat und bei einer normalen Glasplatte vom Untergrund absorbiert würde, nach Reflexion an der Spiegelfläche erneut zur Fluoreszenzanregung beitragen.

EXPERIMENTELLES

Herstellung der verspiegelten TLC-Platten

Die normalerweise als Trägermaterial für die TLC-Platten dienende Glasplatte wurde im Vakuum mit Aluminium bedampft und mit einer Quarzschicht fixiert*.

Diese oberflächenverspiegelten Glasplatten wurden von der Fa. E. Merck (Darmstadt, B.R.D.) mit HPTLC Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator in der gleichen Weise wie die handelsüblichen HPTLC-Platten beschichtet.

Die so hergestellten HPTLC-Platten waren mit den entsprechenden HPTLC-Platten der Fa. E. Merck bis auf die Oberflächenverspiegelung identisch und konnten mit diesen bei *in situ* quantitativen Messungen verglichen werden.

Methodik

Geräte. Es wurde ein Camag TLC-Scanner (Camag, Berlin, B.R.D.) mit angeschlossenen Varian CDS 111 A Integrator (Varian, Darmstadt, B.R.D.) und W + W Recorder 1100 (W + W electronic, Basel-Münchenstein, Schweiz) verwendet.

Die Probenauftragung erfolgte mit dem Camag Nanomat und 0.5- μ l Microcaps Wegwerfkapillaren (Drummond Scientific bezogen durch die Fa. Camag).

Die Entwicklung der Platten erfolgte in Camag Doppeltrogkammern.

TLC-Platten. Die Untersuchungen wurden mit HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 o.F. 10 \times 10 cm, HPTLC-Alufolien Kieselgel 60 o.F. 20 \times 20 cm und HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 o.F. 10 \times 10 cm mit Aluminium/Quarz verspiegelter Glasplatte durchgeführt (alle Platten bzw. Beschichtung Fa. E. Merck).

Chemikalien. Die verwendeten Testsubstanzen und Lösungsmittel hatten p.a. Qualität.

Basislinienbestimmung bei Absorptionsmessungen. Auf jeweils vier verschiedenen Platten der drei verwendeten HPTLC-Plattenarten wurden je sechs Scans von 90 mm Länge im Abstand von 10 mm durchgeführt. Die Platten wurden ohne Vorbehandlung so gemessen, wie sie der Packung entnommen wurden.

* Die Oberflächenverspiegelung wurde von der Fa. Heraeus, Produktbereich Vakuumtechnik (Hannau, B.R.D.) durchgeführt.

Da die HPTLC-Platten an zwei Seiten eine wulstartige Verdickung aufweisen, wurde darauf geachtet, dass die Platten immer gleichartig auf dem Messtisch positioniert wurden.

Als Lichtquelle diente eine Hg-Hochdrucklampe ST 48, die TLC-Platten wurden bei 546, 436, 366 und 254 nm gescannt. Die Messung erfolgte bei der niedrigsten Empfindlichkeitsstufe (Sens 1), einer Spaltbreite von 6×0.2 mm, einer mittleren Verstärkung des Signals (Span 4) und einer Scan-Geschwindigkeit von 0.5 mm/sec. Die Bandbreite betrug 30 nm. Die Vorschubgeschwindigkeit des Schreibers war 5 cm/min bei einem Messbereich von 100 mV.

Absorptionsmessungen. Als Testsubstanzen wurden Sudan III und Coffein verwendet. Es wurden entweder 8 Flecke mit je 40 ng oder je zweimal 10, 20, 30 und 40 ng Substanz im Abstand von 10 mm pro Platte aufgetragen. Der Abstand der Startlinie vom unteren Plattenrand betrug 15 mm.

Sudan III wurde in Benzol gelöst aufgetragen und die Entwicklung der Platten erfolgte mit Benzol als Fliessmittel (ohne Kammersättigung) bei einer Laufstrecke von 5 cm. Die photometrische Auswertung erfolgte bei 546 nm (Hg-Lampe), 30 nm Bandbreite und einer Spaltbreite von 6×0.3 mm. Die Scan-Geschwindigkeit betrug 0.5 mm/sec und die Photomultiplierempfindlichkeit Sens 2.

Coffein wurde in Dichlormethan gelöst aufgetragen. Die Entwicklung der Platten erfolgte mit dem Fliessmittel Äthanol-Methanol (50:50) bei einer Laufstrecke von 5 cm (mit Kammersättigung). Die photometrische Auswertung der Platten erfolgte bei 254 nm (Hg-Lampe), 30 nm Bandbreite und einer Spaltbreite von 6×0.3 mm. Die Scan-Geschwindigkeit betrug 0.5 mm/sec und die Photomultiplierempfindlichkeit Sens 4.

Die Peakflächen wurden elektronisch mit einem Integrator berechnet. Jeder Fleck wurde dreimal gescannt und der Mittelwert gebildet. Die Absorptionsortskurven wurden vom Schreiber bei einem Papiervorschub von 3 cm/min und einem Messbereich von 100 mV aufgezeichnet.

Fluoreszenzmessungen. Als Testsubstanz diente Chininsulfat. Es wurden je zweimal 10, 20, 30 und 40 ng Substanz in Methanol gelöst pro Platte aufgetragen. Der Abstand der Startlinie vom unteren Plattenrand betrug 15 mm und der Abstand der Flecke untereinander 10 mm. Die Entwicklung der Platten erfolgte mit Methanol als Fliessmittel (ohne Kammersättigung) bei einer Laufstrecke von 5 cm. Die Platten wurden nach der Entwicklung mit einem Fön getrocknet und bis zur völligen Stabilisierung der Flecke 1 h im dunkeln aufbewahrt. Die photometrische Auswertung wurde so durchgeführt, dass jede Platte zuerst bei 366 nm, dann bei 302 nm und zuletzt bei 254 nm Excitationswellenlänge gemessen wurde. Die Spaltbreite betrug 6×0.7 mm die Scan-Geschwindigkeit 0.5 mm/sec. Die Bandbreite betrug 30 nm und als Sekundärfilter diente das Kantenfilter 400 nm. Die Messung erfolgte bei der Photomultiplierempfindlichkeit Sens 12 und der Verstärkung Span 9. Jeder Fleck wurde dreimal gescannt und der Mittelwert der Integratorwerte gebildet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Basislinienbegradigung bei der Absorptionsmessung

Fig. 1 zeigt jeweils ein typisches Beispiel für die erhaltenen Basislinien in Abhängigkeit vom Trägermaterial und der Wellenlänge.

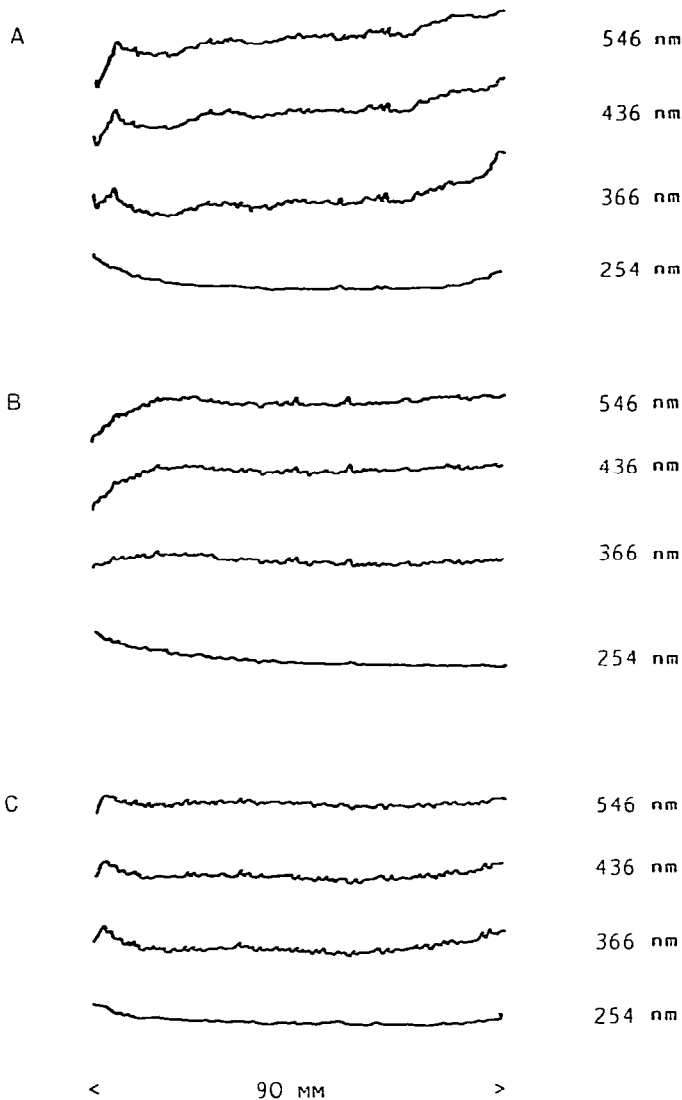


Fig. 1. Basislinien in Abhängigkeit vom Trägermaterial und der Wellenlänge. (A), HPTLC-Fertigplatte Kieselgel 60; (B) HPTLC-Alufolie Kieselgel 60; (C) HPTLC-Fertigplatte Kieselgel 60 mit Aluminium-Quarz verspiegelter Glasplatte.

Die HPTLC Fertigplatte Kieselgel 60 (normale Glasunterlage) zeigt deutlich gradientenartige Störungen der Basislinie bei 546, 436 und 366 nm. Bei 254 nm sind diese nicht mehr zu beobachten, da das Kieselgel in diesem Bereich starke Eigenabsorption aufweist und die Kieselgelschicht für Strahlung dieser Wellenlänge nur wenig durchlässig ist^{6,7}.

Im Gegensatz dazu verlaufen die Basislinien bei der Aluminium-Quarz verspiegelten HPTLC Fertigplatte Kieselgel 60 bei allen Wellenlängen ohne gradientenartige Störungen und bestätigen damit die Überlegungen.

Die HPTLC Alufolie Kieselgel 60 zeigt —abgesehen von einer Drift am Rande der Folie— ebenfalls geringere gradientenartige Störungen.

Die Ergebnisse zeigen, dass trotz der optimierten Beschichtung der Remissionsgrad der normalen HPTLC Kieselgel 60 Platten noch nicht so einheitlich ist, dass man eine völlig gerade Basislinie erhält. Diesem Ziel kommt die HPTLC-Platte mit Aluminium-Quarz verspiegelter Glasplatte wesentlich näher.

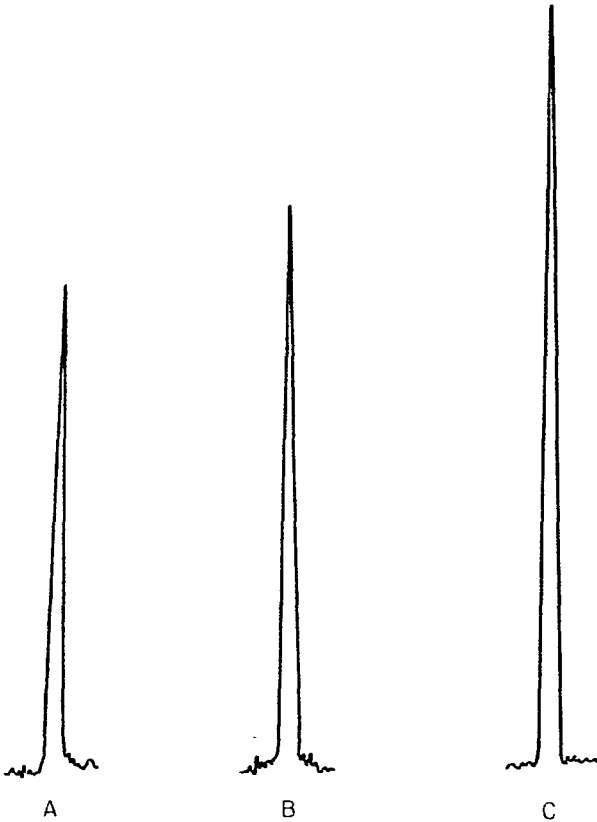


Fig. 2. Einfluss des Trägermaterials auf das Absorptionssignal von 40 ng Sudan III, $\lambda = 546$ nm. Bezeichnungen wie in Fig. 1.

Empfindlichkeitssteigerung der Absorptionsmessung

Fig. 2 zeigt jeweils einen typischen Peak für 40 ng Sudan III und Fig. 3 Eichgeraden für den Bereich von 10–40 ng Sudan III, die auf den verschiedenen Platten unter gleichen Messbedingungen erhalten wurden.

Im Vergleich zur HPTLC Fertigplatte Kieselgel 60 mit normaler Glasunterlage ist das Mess-Signal auf der Aluminium-Quarz verspiegelten HPTLC-Platte um ca. 50–60% grösser. Im Gegensatz dazu ist das Signal auf der HPTLC Alufolie Kieselgel 60 nur geringfügig erhöht.

Wie aus den Untersuchungen mit Sudan III hervorgeht, wird durch das oberflächenverspiegelte Trägermaterial nur das Mess-Signal verstärkt, nicht aber der Rauschpegel, so dass daraus eine Verbesserung des Signal/Rausch Verhältnisses re-

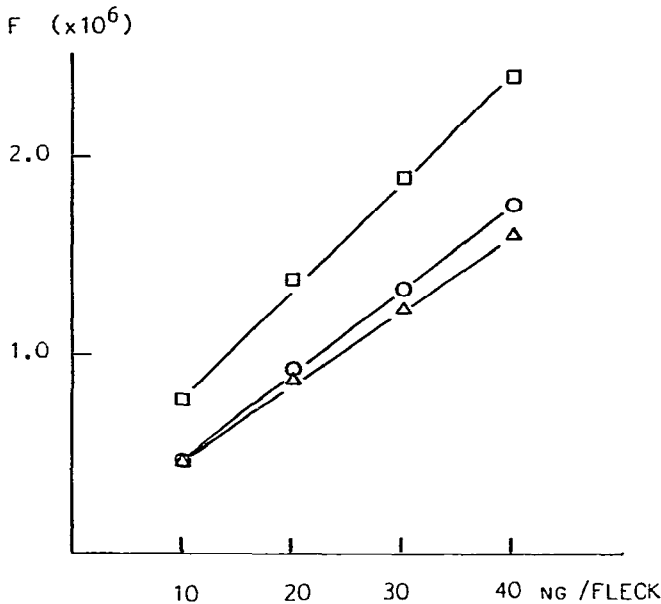


Fig. 3. Einfluss des Trägermaterials auf die Eichgerade bei der Absorptionsmessung von Sudan III, $\lambda = 546$ nm. Δ , HPTLC-Fertigplatte Kieselgel 60; \circ , HPTLC-Alufolie Kieselgel 60; \square , HPTLC-Fertigplatte Kieselgel 60 mit Aluminium-Quarz verspiegelter Glasplatte. F = Peakfläche (Integratoreinheiten).

sultiert, welches wiederum die Nachweisgrenze determiniert⁸.

Weiterhin ist die Absorptionsmessung von Sudan III auf Platten mit oberflächenverspiegeltem Trägermaterial empfindlicher als auf Platten mit normalem Glas als Trägermaterial, da für die gleiche Änderung der Substanzmenge die Peakfläche stärker zunimmt⁹.

Diese Feststellungen gelten allerdings nur für den längerwelligen Teil des Spektrums. Fig. 4 zeigt am Beispiel des Coffein, dass bei 254 nm keine Verstärkung des Mess-Signals mehr zu beobachten ist. Die Ursache dafür liegt in der geringeren Durchlässigkeit des Kieselgels im UV-Bereich durch dessen gestiegene Eigenabsorption.

Die Reproduzierbarkeit der Messung von 40 ng Sudan III auf den verschiedenen Plattenarten ist in Tabelle I wiedergegeben.

Die relative Standardabweichung der Peakflächen für $n = 8$ Proben pro Platte ist am niedrigsten auf der Aluminium-Quarz verspiegelten HPTLC-Platte (Mittelwert: 1.56 %).

Dies ist einmal durch das verbesserte Signal/Rausch Verhältnis zu erklären. Die Reproduzierbarkeit der *in situ* photometrischen Messung ist nämlich nicht konstant sondern abhängig von der Substanzmenge des Fleckes. Je geringer die zu messende Substanzmenge ist, desto kleiner wird der Peak im Vergleich zum Grundrauschen und umso schwieriger wird die Peakerkennung, sowohl bei manueller als auch bei elektronischer Auswertung¹⁰. Wird das Signal im Vergleich zum Grundrauschen grösser, wie das bei der HPTLC-Platte mit oberflächenverspiegeltem Trägermaterial der Fall ist, so resultiert daraus ein geringerer Fehler der photometrischen Messung.

Zum anderen ist das von einem Substanzfleck hervorgerufene Signal abhängig vom Remissionsgrad der Adsorbenschicht¹¹. Ist der Remissionsgrad der HPTLC-

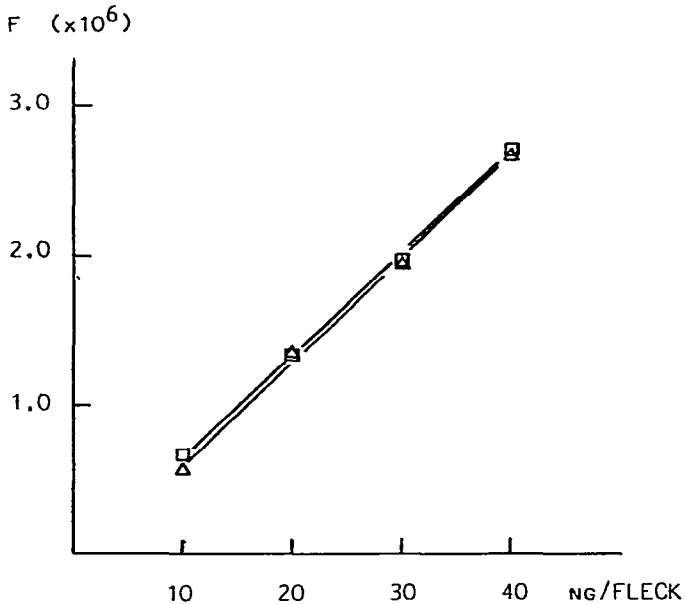


Fig. 4. Einfluss des Trägermaterials auf die Eichgerade bei der Absorptionsmessung von Coffein, $\lambda = 254$ nm. Bezeichnungen wie in Fig. 3.

TABELLE I

REPRODUZIERBARKEIT DER REMISSIONSMESSUNG VON 40 NG SUDAN III ($n = 8$) AUF HPTLC KIESELGEL 60 PLATTEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM TRÄGERMATERIAL

n = Anzahl der Proben pro Platte.

	HPTLC-Fertigplatte Kieselgel 60	HPTLC-Alufolie Kieselgel 60	HPTLC-Fertigplatte Kieselgel 60 Aluminium-Quarz verspiegelt
Anzahl der Platten	6*	3**	7*
Mittlere Peakfläche*** (Integratoreinheiten, gerundet)	1621 \pm 77	1820 \pm 86	2561 \pm 99
Mittlere Standard- abweichung***	41.19 \pm 13.41	52.47 \pm 11.18	40.02 \pm 9.10
Mittlere relative Standardabweichung*** (%)	2.54 \pm 0.79	2.88 \pm 0.66	1.56 \pm 0.31

* Darunter 2 Platten mit $n = 7$.

** Darunter 1 Platte mit $n = 7$.

*** pro Platte.

Platte nicht konstant, erhält man für gleich grosse Substanzmengen verschieden grosse Signale.

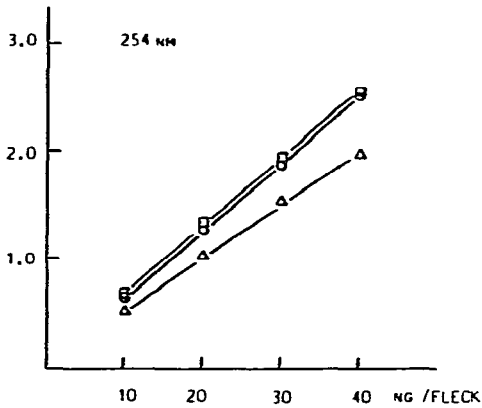
Wie oben gezeigt wurde, ist der Remissionsgrad der HPTLC Kieselgel 60 Platte mit oberflächenverspiegeltem Trägermaterial im Vergleich zur HPTLC-Platte mit

normalem Glas als Träger gleichmässiger und trägt somit zur besseren Reproduzierbarkeit der Messung bei.

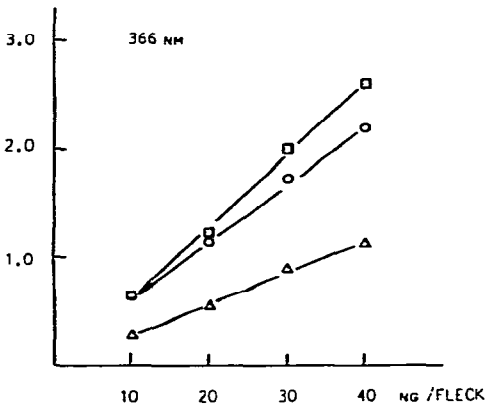
Empfindlichkeitssteigerung der Fluoreszenzmessung

Fig. 5 zeigt Eichgeraden für den Bereich von 10–40 ng Chininsulfat pro Fleck, die auf den verschiedenen Platten bei 366, 302 und 254 nm Excitationswellenlänge erhalten wurden.

F ($\times 10^6$)



F ($\times 10^6$)



F ($\times 10^6$)

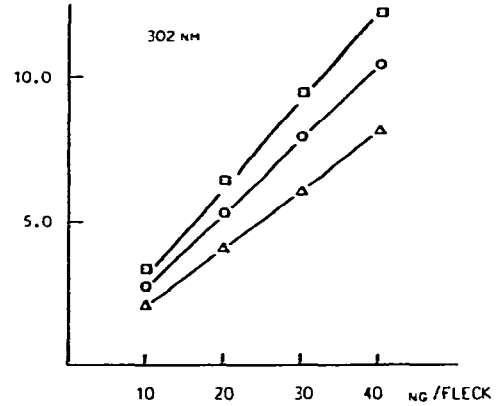


Fig. 5. Einfluss des Trägermaterials auf die Eichgerade bei der Fluoreszenzmessung von Chininsulfat bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen, $\lambda_{cm} > 400$ nm. Bezeichnungen wie in Fig. 3.

Sowohl auf der Aluminium-Quarz verspiegelten HPTLC Kieselgel 60 Platte als auch auf der HPTLC-Alufolie ist eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung zu beobachten.

Die grösste Steigerung ist bei λ_{ex} 366 nm auf der Aluminium-Quarz verspiegelten Platte mit mehr als 100% im Vergleich zur HPTLC Glasplatte festzustellen.

Die empfindlichkeitssteigernde Wirkung der Aluminiumfolie ist insgesamt etwas geringer.

Eine Steigerung der Empfindlichkeit ist bei allen Excitationswellenlängen zu beobachten, sie nimmt aber mit abnehmender Anregungswellenlänge ab. Dies ist dadurch zu erklären, dass mit abnehmender Wellenlänge die Durchlässigkeit des Kieselgels nachlässt und damit auch weniger Anregungslicht reflektiert wird. Bei 254 nm dürfte die Empfindlichkeitssteigerung im wesentlichen auf reflektiertes Emissionslicht zurückzuführen sein, dessen Wellenlänge über 400 nm liegt.

TLC-Platten mit normaler Kieselgel 60 Beschichtung

Untersuchungen mit TLC-Platten, die nicht mit HPTLC Kieselgel 60 sondern mit normalem Kieselgel 60 beschichtet waren, führten zu ähnlichen Ergebnissen.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dünnschichtchromatographischer Untersuchungen wird der Einfluss von mit Aluminium verspiegelten Glasplatten als reflektierendem Träger von Kieselgel 60 (HPTLC) auf die Basislinie und die Empfindlichkeit bei Absorptionsmessungen und auf die Empfindlichkeit bei Fluoreszenzmessungen untersucht.

Im Vergleich zu nicht verspiegelten HPTLC Kieselgel 60 Platten zeigen HPTLC Kieselgel 60 Platten mit Aluminium-Quarz verspiegeltem Glas als Trägermaterial für die drei untersuchten Parameter folgendes Ergebnis: (1) die Basislinie zeigt einen geraderen Verlauf bei Absorptionsmessungen; (2) die Empfindlichkeit bei Absorptionsmessungen ist im langwelligen Absorptionsbereich erhöht; (3) die Empfindlichkeit bei Fluoreszenzmessungen ist erhöht und zwar in Abhängigkeit von der Excitationswellenlänge.

Die gleichfalls in die Untersuchungen mit einbezogene HPTLC Kieselgel 60 Aluminiumfolie nimmt eine Zwischenstellung ein.

LITERATUR

- 1 A. Zlatkis und R. E. Kaiser (Herausgeber), *Journal of Chromatography Library, Vol. 9, HPTLC — High Performance Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, Institute of Chromatography, Bad Dürkheim, 1977.
- 2 W. Bertsch, S. Hara, R. E. Kaiser und A. Zlatkis (Herausgeber), *Instrumental HPTLC, Proc. 1st Int. Symp. Instrumental HPTLC, Bad Dürkheim, May 18–21, 1980*, Hüthig, Heidelberg, 1980.
- 3 H. Halpaap und J. Ripphahn, *Kontakte (Merck)*, 3 (1976) 16.
- 4 Th. Eckert, *Deutsche Offenlegungsschrift*, Nr. 29 10 102, (1980).
- 5 Th. Eckert und U. Knie, *Deutsche Offenlegungsschrift*, Nr. 29 22 866, (1980).
- 6 U. Hezel, *Angew. Chem.*, 85 (1973) 334.
- 7 H. Jork, *J. Chromatogr.*, 82 (1973) 85.
- 8 H. Kaiser, *Z. Anal. Chem.*, 209 (1965) 1.
- 9 H. Kaiser, *Z. Anal. Chem.*, 260 (1972) 252.
- 10 H. R. Schmutz, in W. Bertsch, S. Hara, R. E. Kaiser und A. Zlatkis (Herausgeber), *Instrumental HPTLC, Proc. 1st Int. Symp. Instrumental HPTLC, Bad Dürkheim, May 18–21, 1980*, Hüthig, Heidelberg, 1980, S. 338.
- 11 H. E. Geissler und E. Mutschler, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 28 (1978) 1964.