

**Computerunterstützte Auswertung in
der automatisierten
zweidimensionalen
Dünnschichtchromatographie**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Matthias Schneider

aus
Dillingen an der Donau

Würzburg 2002

Eingereicht am: 20.12.2002
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: Prof. Dr. Siegfried Ebel
2. Gutachter Prof. Dr. Harold Rüdiger
der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. Siegfried Ebel
2. Prüfer: Prof. Dr. Helga Stopper
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2003
Doktorurkunde ausgehändigt am:

Quidquid agis, prudenter agas et respice finem.

meinen Eltern

Barbara

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie des Fachbereiches Chemie und Pharmazie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Siegfried Ebel.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei ihm für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die hervorragenden Möglichkeiten des selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens in seinem Arbeitskreis herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Patzwald von der Firma Zeiss für die Unterstützung bei der Auswahl des Photodiodenarrays, sowie bei Herrn Prof. Dr. Bernd Spangenberg vom Fachbereich Verfahrenstechnik der FH Offenburg für die Diskussionen zum Thema Lichtwellenleiter und die Möglichkeit, an von ihm entwickelten Geräten Versuche durchzuführen. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Karl-Friedrich Klein vom Fachbereich Informationstechnik- Elektrotechnik-Mechatronik der FH Gießen-Friedberg für die Anregungen und die Unterstützung im Bereich der optimierten Lichtwellenleiter.

Allen Mitarbeitern der Institutswerkstatt möchte ich danken für die Unterstützung beim Bau der mechanischen Teile des Scanners.

Mein besonderer Dank gilt zwei Personen:

Herrn Dr. Bernd Reyer für seine tatkräftige Hilfe im Bereich der Elektronik und die Vermittlung eines Teils seines immensen Wissens um die Tücken derselben.

Herrn Dr. Thomas Henkel für die vielen Gespräche zum Thema Programmierung, Computer und deren Fallstricke sowie die zahllosen nicht nur fachlichen Diskussionen.

Mein Dank gilt ebenso allen Freunden und Kollegen im Arbeitskreis, die es geschafft haben, immer ein freundliches und bisweilen aufmunterndes Arbeitsklima zu schaffen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Aufgabenstellung	5
3	Grundlagen der DC	7
3.1	Trennprinzip	7
3.2	Materialien	9
3.3	Quantitative Auswertung	11
3.3.1	Allgemein	11
3.3.2	Fluoreszenz	11
3.3.3	Phosphoreszenz	12
3.3.4	Remission	12
3.3.5	Kalibrierung und Auswertung	16
3.3.5.1	Lineare Regression	16
3.3.5.2	Linearisierte Regression	16
3.3.5.3	2D lineare Regression	17
3.3.5.4	Sättigungsfunktion	18
3.3.5.5	Nichtlineare Regression	19
3.4	Entwicklungstechniken	20

3.4.1	Eindimensionale Entwicklung	20
3.4.2	(Anti-)Zirkulare Entwicklung	21
3.4.3	2D-Entwicklung	21
4	Verwendete Substanzen	25
4.1	Sulfonamide	25
4.2	β -Blocker	29
5	Aufbau des Scanners	33
5.1	Übersicht	33
5.2	Lichtquelle	34
5.3	Kreuztisch	35
5.4	Lichtwellenleiter	36
5.4.1	Einführung	36
5.4.2	Aufbau eines LWL	38
5.4.3	Eigenschaften eines LWL	41
5.4.3.1	Single- und Multimodefasern	41
5.4.3.2	Dämpfungseigenschaften	42
5.4.3.3	Farbzentren	43
5.4.3.4	Optimierte Lichtwellenleiter	44
5.5	Photodiodenarray	45
5.5.1	Grundlagen	45
5.5.2	Aufbau des Photodiodenarrays	45

6	Datenverarbeitung	49
6.1	Datenstruktur und -eingabe	49
6.2	Datenbearbeitung	50
6.3	Datenausgabe	51
7	Spektrenvergleich Lösung – Platte	53
7.1	Spektrennormierung	54
7.1.1	Punktnormierung	55
7.1.2	Mittelwertnormierung	55
7.1.3	Flächennormierung	55
7.1.4	Normierung durch lineare Regression	56
7.1.5	Normierung durch orthogonale Regression	56
7.2	Normierungsfaktoren der Sulfonamidspektren	58
8	Auswertung der 2D-DC	67
8.1	Auftrageschema	67
8.2	Entwicklung	71
8.3	Fleckdetektion	72
8.3.1	Glättung der Rohdaten	72
8.3.2	Basislinienkorrektur	74
8.4	Fleckzuordnung	82
9	Zusammenfassung	89
10	Summary	93
	Literaturverzeichnis	97

Abbildungsverzeichnis

3.1	Scanmethoden	15
3.2	Lineare Beziehung in eingeschränktem Bereich	17
3.3	Zweidimensionale Entwicklung	21
4.1	Trennung der 14 Sulfonamide	32
4.2	Trennung der 10 β -Blocker	32
5.1	Schema der CLD 300 Deuteriumlampe	35
5.2	Aufbau eines Lichtwellenleiters	39
5.3	Verschiedene Anordnung von Fasern in einem LWL-Bündel	40
5.4	Y-Lichtleiter mit zeilenförmiger Anordnung	41
5.5	Dämpfungsverlauf bei unterschiedlichen Glasarten	43
5.6	Aufbau des Detektors	46
5.7	Deuteriumspektrum	46
7.1	Sulfonamidspektren in unterschiedlichen Medien	63
7.1	Normspektrenvergleich mittels linearer Regression an einem Beispiel	65
8.1	Typisches Chromatogramm eines Spaltscanners [Camag TLC- Scanner II]	68

8.2	Tatsächliche Verteilung eines Substanzfleckes	69
8.3	Phasen der Entwicklung bei der quantitativen 2D-DC	71
8.4	Darstellung der Glättung nach 2D-PLSC	75
8.5	Bilineare Interpolation	77
8.6	Einfluß des Fehlers bei der Basisbestimmung auf den Volumenfehler	81
8.7	Chromatogramme nach der Entwicklung	83
8.8	Sulfonamidpeaks nach der Entwicklung	84

Tabellenverzeichnis

4.1	Verwendete Sulfonamide	28
4.2	Trennsystem für die Sulfonamide	28
4.3	Verwendete β -Blocker	30
4.4	Trennsystem für die β -Blocker	31
7.1	Normierungsfaktoren	59
7.2	Wellenlängendifferenzen	60
7.3	Rangordnung der Sulfonamide nach Wellenlängenmaxima bei verschiedenen Medien	61

Kapitel 1

Einleitung

Mit den grundlegenden Arbeiten zur Dünnschichtchromatographie (DC) von Stahl [35] begann in der analytischen Chemie die Phase der einfachen Trennung auch komplizierter Substanzgemische. Bis dahin wurde vor allem die Papierchromatographie als Trenntechnik eingesetzt. Diese erlaubt aber vornehmlich qualitative Trennungen und ist an Cellulose als stationäre Phase gebunden. Mit der Entwicklung verschiedener Sorbentien für die DC und deren Kombination mit geeigneten Fließmitteln konnte eine Vielzahl neuer Gemische getrennt werden. Anfangs nur zur Identifizierung eingesetzt, gewann die DC zu Beginn der siebziger Jahre zunehmend auch als quantitative Analysenmethode an Bedeutung. Trotz großer apparativer Schwierigkeiten gelang es, robuste und reproduzierbar messende Geräte zu entwickeln, die den Anforderungen an eine moderne Analytik entsprachen. Mit dem Aufkommen der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) Anfang der Achtziger Jahre verlor die DC wieder an Bedeutung und wird heutzutage vor allem als Screening-Methode in der präparativen Chemie und in der pharmazeutischen Analytik eingesetzt.

Unberücksichtigt bleiben oft die großen Vorteile, die die DC gegenüber den moderneren Methoden mit sich bringt. Zum einen liegen auf einer Dünnschichtplatte die gesamten Informationen der Analyse vor. Verluste durch

übermäßige Adsorption treten hier nicht auf. Aufgrund ihrer offenen Struktur ist prinzipiell jede Phase der Trennung beobachtbar und jeder Punkt der Chromatographie ist zugänglich. Die Abhängigkeit des Signals besteht hier nicht von der Zeit, sondern vom Ort.

Auch die hohe Belastbarkeit des chromatographischen Systems macht die DC zu einer interessanten Trenntechnik. Überladungen treten hier erst bei sehr viel höheren Konzentrationen auf als beispielsweise bei der HPLC und die Folgen sind weit weniger gravierend. Dies spielt vor allem bei der Analytik von in biologischen Matrices eingebundenen Substanzen eine Rolle. Die Probenvorbereitung kann hier bei der DC weniger aufwendig ausfallen.

Durch den Einsatz weiterentwickelter Trenntechniken gelingt es der DC, auch im Hinblick auf die Trennleistung zu den anderen Chromatographiearten aufzuschließen. Die Automatische Mehrfachentwicklung (AMD) nutzt hierbei mehrere Fließmittel, die nacheinander auf ein und derselben Platte angewendet werden. So kann man eine der Gradiententechnik vergleichbare Entwicklungsumgebung schaffen mit dem zusätzlichen Vorteil, daß bei jedem neuen Fließmittel eine erneute Substanzkonzentrierung stattfindet. Diese Konzentrierung wirkt der bei der DC auftretenden Fleckverbreiterung bei größeren Wanderungsstrecken entgegen.

War die DC zu Beginn nur als qualitative Trenntechnik eingesetzt worden, wurde ab Mitte der Siebziger Jahre auch versucht, die getrennten Substanzen zu quantifizieren (siehe u.a.[14], [21]). Die hierbei auftretenden Probleme, hervorgerufen durch das Verbleiben der Substanz auf der Platte, wurden durch verschiedene Ansätze zu lösen gesucht. Vom Auskratzen eines Flecks über semiquantitative Vergleiche der Fleckgrößen bis zu diversen optischen Verfahren reicht die Palette, von der für den Routineinsatz heute nur die Remissionsmessung bei einer oder mehreren Wellenlängen übriggeblieben ist.

Eine weitere Variante der dünnenschichtchromatographischen Trennung ist die Entwicklung in zwei zueinander senkrecht stehenden Richtungen (zweidimensionale Entwicklung). Hierbei ist es möglich, zwei Fließmittel zu ver-

wenden, die sich in ihren Eigenschaften stark unterscheiden, um somit unterschiedliche Eigenschaften der zu trennenden Substanzen besser ausnutzen zu können.

Bisher war es äußerst schwierig, alle auf einer Platte enthaltenen Informationen in die Auswertung miteinzubeziehen. Moderne Geräte sind in der Lage, die anfallende Datenmenge zu verarbeiten und so die Möglichkeiten, die die DC bietet, voll auszunutzen.

Kapitel 2

Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Scanner für die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie mit einem Photodiodenarray als Detektor zu entwickeln und die erforderliche Software zur Verfügung zu stellen.

Die bislang kommerziell erhältlichen Scanner sind in erster Linie zur Auswertung eindimensional entwickelter Platten gedacht und lassen sich nur schwer zur Verarbeitung zweidimensionaler Chromatogramme verwenden. Üblicherweise wird hier die Platte in Einzelbahnen mit definiertem Abstand zueinander abgefahren, die Remission bei einer Wellenlänge mit einem Photomultiplier vermessen und die erhaltenen Daten über die Peakhöhe und/oder die Peakfläche in die Konzentrationen umgerechnet.

Da bei der zweidimensionalen Entwicklung die Substanzflecken über die gesamte Plattenfläche verteilt vorliegen können, muß die ganze Fläche abgescannt werden und anschließend eine Zuordnung der erfassten Peaks erfolgen. Dies gelingt sinnvoll nur, wenn das UV-/Vis-Spektrum des Flecks zur Verfügung steht und nicht nur eine Wellenlänge daraus. Die dabei auftretenden Probleme bei der Auswertung von Remissionsspektren müssen berücksichtigt werden.

Kapitel 3

Grundlagen der Dünnschichtchromatographie

3.1 Trennprinzip

Das Trennprinzip in der DC beruht auf der Verteilung einer zu untersuchenden Substanz zwischen einer stationären Phase (Kieselgel, RP-Phasen o.Ä.) und einer mobilen Phase, die aus dem Fließmittel gebildet wird. Prinzipiell wäre auch eine Adsorption der Substanz an der stationären Phase denkbar. In fast allen Fällen ist an diese jedoch Wasser aus der Luftfeuchtigkeit adsorbiert und die Trennung erfolgt aufgrund der o.g. Verteilung. Je nach Polarität der Untersuchungssubstanzen werden diese sich eher in der mobilen oder der stationären Phase aufhalten und so über die Laufstrecke unterschiedlich hoch laufen. Als charakteristischen Wert der Laufstrecke eines Analyten nimmt man den R_f -Wert, der wie folgt definiert ist:

$$R_f = \frac{\text{Distanz Start} - \text{Fleck}}{\text{Distanz Start} - \text{Fließmittelfront}} \quad (3.1)$$

Wie man aus Gleichung (3.1) ersehen kann, kann der R_f -Wert maximal 1 betragen. Neben dem R_f -Wert existieren in der Literatur noch weitere Kenngrößen zur Beschreibung der Lage eines Substanzflecks auf der Platte. Mit

diesen wurde versucht, die vielfältigen Einflußfaktoren, denen der R_f -Wert unterliegt, zu eliminieren. Bedeutung erlangt hat allerdings nur der R_f^c -Wert, bzw. dessen mit 100 multipliziertes Analogon hR_f^c [34].

Im Laufe des Trennvorganges wird aus einem scharf begrenzten Fleck mit hoher Konzentration, wie er am Startpunkt vorliegt, ein breiterer Fleck mit flacherem Konzentrationsprofil. Ursache für diese Verbreiterung ist die Diffusion der Substanz v.a. in der mobilen Phase. Wenn sich ein Stoff in einer Flüssigkeit aufhält, diffundiert er in alle Raumrichtungen, sofern keine äußeren Einflüsse dagegenwirken. Diese Verbreiterung der Substanzflecken kann sowohl in der Achse der Entwicklungsrichtung als auch senkrecht dazu stattfinden und folgt einer zweidimensionalen Gauss-Verteilung [3].

$$c_{x,y,t} = c_{max} \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left[\frac{(x - z_x)^2}{\delta_x^2} - \frac{y^2}{\delta_y^2} \right] \right\} \quad (3.2)$$

Mit: $c_{x,y,t}$ – Konzentration an den Plattenkoordinaten x,y zum Zeitpunkt t

z_x – Fleckwanderungsstrecke

Geht man davon aus, daß die Diffusionsgeschwindigkeit in Richtung der Entwicklung und senkrecht dazu gleich ist (D_l), so ergibt sich für die maximale Konzentration c_{max} im Fleckschwerpunkt

$$c_{max} = \frac{q}{4\pi R_f t \sqrt{D_l [D_l + (1 - R_f) R_f u_f^2 \tau]}} \quad (3.3)$$

Mit: q – aufgetragene Menge

D_l – Diffusionsgeschwindigkeitskonstante

u_f – Frontgeschwindigkeit

τ – Zeit für die Gleichgewichtseinstellung stationäre - mobile Phase

Durch die Diffusion der Substanz während der Entwicklung entsteht aus einem idealerweise zweidimensionalen Konzentrationsprofil ein dreidimensionales, sprich aus einem Peak wird ein Kegel. Damit verbunden sind mehrere Probleme, die vor allem die Auswertung betreffen (s. Abschnitt 3.3).

Auch riskiert man mit großen Fleckdurchmessern das Überlagern einer gering konzentrierten Substanz durch eine ähnlich hoch gelaufene, d.h. physikochemisch verwandte, höher konzentrierte Verbindung.

Um die unerwünschte Diffusion so gering wie möglich zu halten, sollte der Startfleck möglichst klein gehalten werden. Blome [5] hat gezeigt, daß mit dem Wechsel vom punkt- zum bandenförmigen Auftragen eine Verbesserung der Trennleistung erzielt werden kann. Stehen geeignete Auftragegeräte zur Verfügung, wird diese Methode heute bevorzugt.

Der R_f -Wert beeinflußt also entscheidend die Konzentration im höchsten Punkt des Fleckes. Das Bestreben geht dahin, daß nur über eine möglichst kurze Trennstrecke chromatographiert wird. Meist wird dies durch den Einsatz geeigneter Materialien erreicht (s. Abschnitt 3.2).

3.2 Materialien

Es gibt in der Dünnschichtchromatographie eine Vielzahl von Materialien, die sich als stationäre und mobile Phase eignen. Als Träger des Sorbens werden Glas, Aluminium oder Kunststoff eingesetzt. Darauf aufgebracht ist die eigentliche Phase. Diese besteht meistens aus Kieselgel mit einem definierten Korndurchmesser. Aufgrund der freien OH-Gruppen des Silanols hat Kieselgel einen stark polaren Charakter. Dies führt zu Einschränkungen bei der Wahl des Fließmittels, da unpolare Lösemittel verwendet werden müssen, um die Substanzen von der stationären Phase herauszulösen. Variationsmöglichkeiten bestehen in einer Modifikation des SiO_2 . Häufig werden die Hydroxylgruppen mit länger-kettigen Alkanolen verethert und es entstehen die sog. RP-Materialien (*reversed phase*). Dadurch wird eine Umkehr der Polarität erreicht und man kann z.B. Wasser als hier vergleichsweise schwaches Elutionsmittel als mobile Phase einsetzen. Die Kettenlänge des eingesetzten Alkanols wird durch das Anhängen der Kohlenstoff-Anzahl an „RP“ angegeben, z.B. Octanol bei RP8 und Octadecanol bei RP18. Nicht alle frei-

en OH-Gruppen des Kieselgels werden modifiziert. Untersuchungen haben ergeben, daß maximal die Hälfte verethert wird. So entsteht ein „Besen“, zwischen dessen Borsten sich die unpolaren Substanzen einlagern können.

Eine Zwischenlösung zwischen polarem und unpolarem Charakter erhält man mit der Einführung von Propylcyanogruppen. Durch den Propylrest wird die Polarität der Silanolgruppen abgeschwächt, das terminale CN bedeutet wiederum eine leichte Erhöhung des polaren Charakters. Durch geeignete Wahl des Fließmittels kommt entweder die eine oder die andere Eigenschaft verstärkt zum Tragen. Als Anwendungsbeispiel sei bereits hier die zweidimensionale Entwicklung angeführt, auf die unter Abschnitt 3.4.3 auf S. 21 noch genauer eingegangen werden wird. Als weitere Sorbentien finden Al_2O_3 , Cellulose und Kieselgur häufiger Verwendung.

Oft sind die DC-Platten zur Unterstützung der Detektion der getrennten Substanzen mit einem Phosphoreszenzindikator versetzt, der bei einer niedrigen Wellenlänge Licht absorbiert und bei einer höheren wieder abgibt. Befindet sich auf der Platte eine Verbindung, die bei der eingestrahnten Wellenlänge angeregt wird, d.h. sie absorbiert das Licht, so zeigt sich bei Bestrahlung auf der erleuchteten Platte ein dunkler Fleck. Dies funktioniert nur, wenn die Konzentration und der Absorptionskoeffizient des Analyten größer sind als die entsprechenden Werte des Indikators. In der Regel ist dies der Fall. Als Indikator wird häufig speziell dotiertes Zinksulfid eingesetzt, das bei 254 nm absorbiert und im sichtbaren Bereich emittiert. Zur Fluoreszenzanregung mancher Substanzen wird oft Licht bei 360 nm eingestrahlt, um eine eventuelle Eigenfluoreszenz der Verbindungen zu testen.

Um die unter Abschnitt 3.1 auf S. 7 beschriebene Diffusion gering zu halten, wurden HPTLC-Platten (*H*igh *P*erformance *T*hin *L*ayer *C*hromatography) entwickelt, deren Vorteile gegenüber den herkömmlichen DC-Platten in einer engeren Korngrößenverteilung und einem geringeren mittleren Korn-durchmesser bestehen. Somit sind bessere Trennungen bei geringerem R_f -Wert möglich.

Als mobile Phase eignet sich nahezu jede Flüssigkeit. Sie muß in der Lage sein, die zu trennenden Substanzen aufgrund derer Polaritätsunterschiede bei gegebenem Sorbens zu trennen. Oft werden Mischungen aus verschiedenen Lösemitteln eingesetzt, um eine größere Variabilität zu erreichen. Auch die Einstellung eines pH -Bereiches ist so leicht möglich. Erwähnt werden soll hier noch die Gefahr der Entmischung der Fließmittelkomponenten (Bildung sog. β -Fronten) sowie die Tatsache, daß ein Unterschied zwischen Fließmittel und mobiler Phase besteht (siehe u.a. in [17]).

3.3 Quantitative Auswertung

3.3.1 Allgemein

Um einen Stoff nicht nur qualitativ über die Lage seines Fleckes auf der DC-Platte, sondern auch quantitativ erfassen zu können, nutzt man die verschiedenen spektralen Eigenschaften, die die Substanz bietet. Absorbiert eine Verbindung im sichtbaren Bereich, kann man deren Absorption ohne zusätzliche Lichtquelle im Transmissions- oder Remissionsmodus messen. Absorbiert der Stoff Licht im UV-Bereich, bleibt wegen der starken Eigenabsorption des Kieselgels nur die Remissionsmessung übrig. Auch Phosphoreszenz- bzw. Fluoreszenzmessungen sind bei geeigneten Voraussetzungen möglich.

3.3.2 Fluoreszenz

Bei der Auswertung mittels der fluoreszierenden Eigenschaft einer Substanz strahlt man Licht der Anregungswellenlänge λ_{ex} ein und mißt bei der Emissionswellenlänge λ_{em} , die immer im längerwelligen Bereich des Spektrums liegt. Vor den Detektor wird ein Filter vorgeschaltet, der eventuell remittiertes Licht der Wellenlänge λ_{ex} herausfiltert. Gelangt dieses ebenfalls in den Detektor, erhält man zu hohe Remissionswerte.

3.3.3 Phosphoreszenzminderung

Wie bereits unter Abschnitt 3.2 auf S. 9 erwähnt, sind die DC-Platten häufig mit einem Phosphoreszenzindikator versetzt, dessen Anregungswellenlänge bei 254 nm oder bei 360 nm liegt. Auch eine Kombination aus beiden Indikatoren ist gebräuchlich. Bei Bestrahlung mit dem entsprechenden Licht emittieren die Stoffe im grünen bzw. hellblauen VIS-Bereich.

Absorbiert eine getrennte Substanz bei den Anregungswellenlängen das Licht, so steht nicht alle Intensität des eingestrahnten Lichtes zur Anregung des Phosphoreszenzindikators zur Verfügung und man beobachtet eine Phosphoreszenzminderung bei dem entsprechenden R_f -Wert in Form eines dunklen Fleckes. Zu beachten ist, daß die Wellenlänge des eingesetzten Lichtes nicht mit der maximalen Absorptionswellenlänge der untersuchten Substanz λ_{max} übereinstimmen muß.

Die Messung der Phosphoreszenzminderung hat einige erhebliche Nachteile. Ihre größte Einschränkung ist eine Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses, das ohnehin in der quantitativen DC gegenüber anderen Trenntechniken ungünstig liegt. Bedingt wird dies durch die inhomogene Verteilung des Indikators in der Trennschicht und zusätzlich durch die Messung außerhalb λ_{max} . Darüberhinaus ist aus der UV-Spektroskopie bekannt, daß Abweichungen in der Meßwellenlänge vom optimalen Meßpunkt Fehler bis zu 9% nach sich ziehen können.

3.3.4 Remission

Im Gegensatz zu dem aus der quantitativen UV-Spektroskopie bekannten *Bouguer-Lambert-Beerschen* Gesetz (Gleichung (3.4)) ist bei Remissionmessungen keine lineare Beziehung zwischen der Konzentration und der gemessenen Remission gegeben.

$$A = \alpha \cdot c \cdot l \tag{3.4}$$

An den Körnchen des Kieselgels findet eine in alle Raumrichtungen gehende Streuung des eingestrahnten Lichtes statt, für die eine exakte Beschreibung bis jetzt noch fehlt. Nimmt man eine ideale Streuung an, so kann man die einzelnen Lichtstrahlen als Bestandteile zweier Vektoren I_T (für Strahlen in Richtung des Lichtes) und J_R (als entgegengesetzte Strahlen) auffassen. Berücksichtigt man die Absorption α und die Streuung ϱ , so ergeben sich für die einzelnen Intensitäten folgende Differentialgleichungen ([24], [28]):

$$dI_T = -2(\alpha + \varrho) \cdot I_T dx + 2\zeta J_R dx \quad (3.5)$$

$$dJ_R = -2(\alpha + \varrho) \cdot J_R dx - 2\zeta I_T dx \quad (3.6)$$

Unter der Annahme, daß die Schicht, an der das Licht reflektiert wird, unendlich dick sei und es keine gerichtete Reflexion gäbe, hat die *Kubelka-Munk*-Funktion folgende Lösung:

$$\frac{\alpha}{\varrho} = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} \quad (3.7)$$

R bezeichnet ursprünglich die absolute Remission, wohingegen in der DC-Praxis nur relative Remissionen gemessen werden. Da aber das Kieselgel eine genügend hohe Eigenabsorption besitzt, nimmt man Schichten, die dicker als $50 \mu\text{m}$ sind, als unendlich dicke Schichten an. Alternativ bietet sich die hyperbolische Lösung der *Kubelka-Munk*- Gleichung an (Gleichung (3.8)). Hier ist das Vorhandensein einer unendlich dicken Schicht keine Grundvoraussetzung.

$$R_d = \frac{\sinh(b\varrho d)}{a \cdot \sinh(b\varrho d) + b \cdot \cosh(b\varrho d)} \quad (3.8)$$

Mit: R_d – diffuse Reflexion einer opaken Schicht endlicher Dicke

$$a = 1 + \frac{\alpha}{\varrho}$$

$$b = \sqrt{a^2 - 1}$$

d – Dicke der Schicht

Um eine ähnlich leicht handzuhabende Gleichung wie Gleichung (3.4) auf der vorherigen Seite auch in der Remissionsspektroskopie zu haben, müssen gewisse Forderungen erfüllt werden:

- Es darf nur bei geringen Substanzkonzentrationen gearbeitet werden.
- Der Diffusionskoeffizient ϱ wird durch die Substanz nicht beeinflusst.
- Die Schichtdicke muß als unendlich angesehen werden können.

Sind diese Voraussetzungen gegeben, so erhält man die Gleichungen (3.9) und (3.10).

$$f(R) = 2.302 \frac{\alpha}{\varrho} c \quad (3.9)$$

$$R_d = \frac{\varrho \cdot d}{1 + (\varrho \cdot d)} \quad (3.10)$$

Mit: c – Konzentration der Substanz in der Schicht [g mm^{-2}]

Von den verschiedenen getesteten Scanmethoden sind heute noch zwei gebräuchlich. Bei der ersten fährt man die Platte mit einem Spalt definierter Breite und Höhe ab. Es sollte darauf geachtet werden, daß die Spaltbreite in etwa der Fleckbreite entspricht. Problematisch ist hierbei vor allem die Mittelwertbildung des Remissionssignals über die gesamte Breite des Lichtspaltes. Die zweite Meßmethode überstreicht die zu untersuchende Bahn zick-zack förmig mit einem Lichtpunkt. Durch die geringeren Ausmaße des Meßpunktes spielt die erwähnte Mittelwertbildung hier keine Rolle, dafür ist der kontinuierliche Antrieb komplizierter, weil er dafür sorgen muß, daß kein Punkt der Platte doppelt vermessen wird und somit der Rechenaufwand bei der anschließenden Integration erheblich vergrößert werden würde. Aufgrund der kleineren ausgeleuchteten Fläche ist die Empfindlichkeit der Punktscanner niedriger als die der Spaltvarianten. Einen Überblick gibt Abbildung 3.1 auf der nächsten Seite.

Auch die modernen HPTLC-Platten weisen immer noch starke Unregelmäßigkeiten in ihrer Struktur auf, die sich ungünstig auf eine quantitative Bestimmung auswirken würden. Zum Ausgleich dieser Einflüsse bietet sich die Aufnahme eines „Nullwertes“ an, der entweder direkt neben dem Meßpunkt auf einer substanzfreien Position gemessen, oder einmal für die

gesamte Platte auf einem mit Fließmittel entwickelten, ebenfalls leeren Fleck aufgenommen wird. Ebenso ist es möglich, einen Fleck bei zwei verschiedenen Wellenlängen zu untersuchen. Dies führt zu einer Abnahme des Hintergrundrauschens, aber auch zu einer Verkleinerung des Signals. Die Aufnahme eines Referenzwertes neben dem ursprünglichen Fleck und anschließende Subtraktion der logarithmierten Remissionswerte verringert zwar den Einfluß unterschiedlicher Schichtdicken und Fließmittelunterschiede v.a. in der Front, führt aber auch zu einer Abnahme des Signal-Rausch-Verhältnisses um einen Faktor von ca. 1.4 ([9], S. 427). Da die DC wenig zeitabhängig, sehr wohl aber ortsabhängig unterschiedliche Ergebnisse liefert, ist die Datenaufnahme von Referenz- und Meßwert an einem Fleck zu unterschiedlichen Zeitpunkten der simultanen Aufnahme an unterschiedlichen Positionen vorzuziehen.

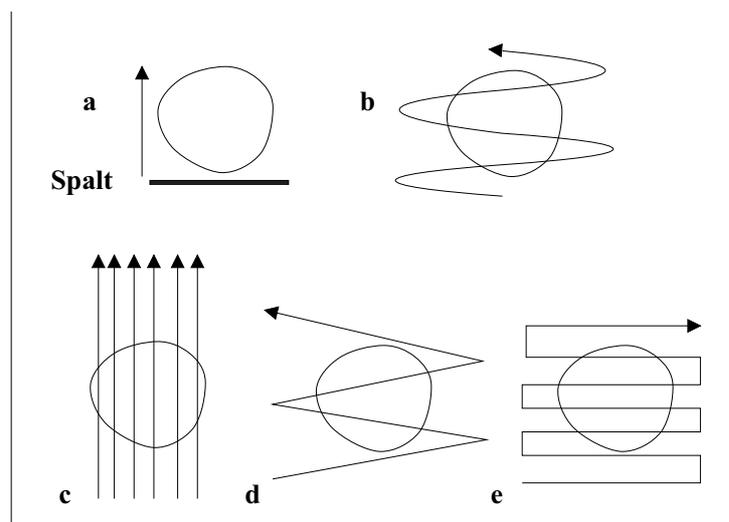


Abbildung 3.1: Scanmethoden

3.3.5 Kalibrierung und Auswertung

3.3.5.1 Lineare Regression

Wie schon zuvor erwähnt, besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration einer Substanz und ihrer Remissionsminderung auf einer DC-Platte. Daher ist die in der UV-Spektroskopie oft eingesetzte lineare Regression nur im Ausnahmefall möglich. Annähernd direkte Proportionalität besteht nur bei sehr geringen Substanzmengen/Fleck sowie in einem eingeschränkten Substanzmengenbereich. (In Abbildung 3.2 auf der nächsten Seite erkennt man, daß annähernde Linearität nur im Bereich von zwei bis drei Größeneinheiten auf der Ordinate herrscht. Im Krümmungsbereich der Kurve gilt eine noch strengere Einschränkung auf eine Einheit.) Ist eine dieser Bedingungen erfüllt, so kann man über Gleichung (3.11) mit den Regressionskoeffizienten nach Gleichung (3.12) und Gleichung (3.13) die gesuchte Größe x aus der Umkehrfunktion von Gleichung (3.11) berechnen (Gleichung (3.14)).

$$\hat{y}(x) = \bar{y}_c + a_1(x - \bar{x}_c) \quad (3.11)$$

$$\bar{y}_c = \frac{1}{n_c} \sum y_i \quad (3.12)$$

$$a_1 = \frac{\sum (x_i - \bar{x}_c)(y_i - \bar{y}_c)}{\sum (x_i - \bar{x}_c)^2} \quad (3.13)$$

$$\bar{x}_a = \frac{\bar{y}_a - \bar{y}_c}{a_1} + \bar{x}_c \quad (3.14)$$

3.3.5.2 Linearisierte Regression

Sobald man jedoch Kalibrierungen über einen größeren Bereich vornimmt, muß man den nichtlinearen Zusammenhang berücksichtigen. Eine einfache Möglichkeit besteht darin, ein Verfahren zu finden, daß das Verhältnis R/c konstant hält und anschließend eine lineare Regression durchzuführen. In der Literatur sind mehrere Linearisierungen vorgeschlagen (Übersicht in [10],

S. 48). Problematisch hierbei ist jedoch, daß bei einer nichtlinearen Transformation der abhängigen Variablen auch der in ihr enthaltene zufällige Fehler nichtlinear transformiert wird. Ebenso wird die geforderte Konstanz der Varianzen im Meßbereich (*Homoskedastizität*) durchbrochen. Beides ist statistisch unzulässig und führt zu falschen Ergebnissen. Eine Quadrierung der Meßwerte resultiert z.B. in einer Verdoppelung eines Fehlers bei einem Meßpunkt. Führt man eine nichtlineare Transformation mit der unabhängigen Variablen durch, so läßt sich dieser Fehler vermeiden. In [10], S. 45 ff. findet sich eine Reihe von Beispielen.

3.3.5.3 Zweidimensionale lineare Regression

Um die Verwendung einer starren Modellfunktion zu umgehen und um die angesprochenen Probleme bei der Linearisierung zu vermeiden, kann man bei einem entsprechenden Datensatz mit einer zweidimensionalen linearen

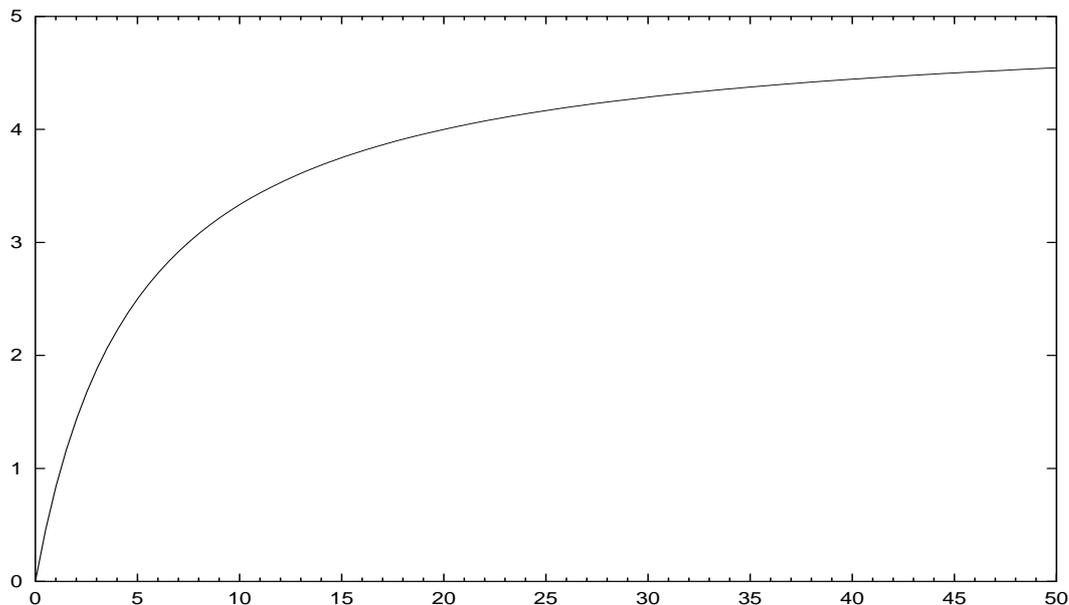


Abbildung 3.2: Lineare Beziehung in eingeschränktem Bereich

Regression arbeiten.

$$\hat{y}(x) = \bar{y}_c + a_1(x - \bar{x}_c) + a_2(x^2 - \bar{x}_c^2) \quad (3.15)$$

Hierbei wird nur die unabhängige Variable x transformiert, eine Modellfunktion wird nicht benötigt.

3.3.5.4 Sättigungsfunktion

Die Remissionswerte, die bei der quantitativen DC erhalten werden, weisen häufig einen Sättigungseffekt auf, der Ähnlichkeit mit bereits bekannten Sättigungsfunktionen hat, z.B. mit der Enzymkinetik nach Michaelis und Menten (Gleichung (3.16)).

$$y = \frac{a_1 \cdot x}{a_2 + x} \quad (3.16)$$

Vergleicht man diese Funktion mit Gleichung (3.10) auf S. 14, der hyperbolischen Lösung der *Kubelka-Munk*-Funktion (Gleichung (3.7) auf S. 13), so erkennt man die Gemeinsamkeit. In der Praxis wird zur Auswertung der *Michaelis-Menten*-Funktion oft die Linearisierung nach Lineweaver und Burk herangezogen. Diese beruht auf einer reziproken Transformation sowohl der abhängigen als auch der unabhängigen Variablen.

$$v_i = \frac{1}{x_i} \quad (3.17)$$

$$z_i = \frac{1}{y_i} \quad (3.18)$$

$$\hat{z}(x) = \bar{z}_c + b_1(v + \bar{v}_c) \quad (3.19)$$

Auch dieser Ansatz macht aus ursprünglich homoskedastischen Daten heteroskedastische und vergrößert durch die Transformation einen Meßfehler erheblich.

Die Linearisierung der Sättigungsfunktion nach Eadie (Gleichung (3.21) auf der nächsten Seite) führt zu unbrauchbaren Ergebnissen, da zwar die

abhängige Variable unverändert bleibt, mit ihr jedoch die unabhängige Variable gewichtet wird.

$$u_i = \frac{y_i}{x_i} \quad (3.20)$$

$$\hat{y}(x) = b_1(u - \bar{u}_c) \quad (3.21)$$

3.3.5.5 Nichtlineare Regression

Gleichung (3.16) auf der vorherigen Seite beschreibt recht gut den Zusammenhang zwischen Remission und Konzentration in der quantitativen Dünnschichtchromatographie. Da die Linearisierung zwar die Auswertung vereinfachen würde, jedoch statistisch unzulässige Transformationen benutzt, bietet sich die nichtlineare Regression als Auswertemethode an. Analog zur linearen Variante werden auch hier die Abstände zwischen den Meßwerten und den ausgeglichenen Werten minimiert, um eine hohe Anpassungsgüte zu erreichen. Die Ausgangsfunktion wurde beschrieben durch Gleichung (3.16) auf der vorherigen Seite, die zu minimierende Größe ist S_{yy} .

$$S_{yy} = \sum \left(y_i - \frac{a_1 x_i}{a_2 + x_i} \right)^2 \stackrel{!}{=} \min \quad (3.22)$$

Die Bestimmung der optimalen Regressionsparameter a_1 und a_2 kann mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden. Ausgehend von zwei geschätzten Werten leitet man S_{yy} nach a_1 und nach a_2 ab und bestimmt so die Steigung der Funktion $S_{yy}(a_1, a_2)$ in der jeweiligen Richtung. Die Resultierende der beiden Steigungen führt zu besseren Werten für die beiden Parameter. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis die Verbesserung unterhalb einer vorgegebenen Schranke liegt. Man bezeichnet dieses Verfahren auch als *Simplex-Suche*. Aufgrund der geschätzten Ausgangsparameter ist dieses Verfahren nicht validierbar. Hat die Suche einmal ein Optimum erreicht, verharrt sie auf diesem. Stellt der gefundene Wert jedoch lediglich ein lokales Optimum dar, wird dieses nicht mehr verlassen. Besser wäre es hier, eine Methode zu finden, bei der unter Inkaufnahme einer temporären Verschlechterung auch

ein Optimum wieder verlassen werden kann, um lokale Maxima oder Minima überwinden zu können und das globale Optimum zu finden. Hier bietet sich beispielsweise der Tabu-Search an, der in den Wirtschaftswissenschaften eine große Rolle spielt und auch in der multivariaten Kalibrierung Eingang gefunden hat [1].

Für einen Vergleich der verschiedenen Kalibrierungsverfahren siehe auch [10] und [12].

3.4 Entwicklungstechniken

3.4.1 Eindimensionale Entwicklung

Die einfachste Möglichkeit, Substanzen dünn-schichtchromatographisch zu trennen, besteht darin, das Gemisch auf einer Platte in einem gewissen Abstand von einer Kante entfernt aufzutragen und zu trocknen. Anschließend stellt man diese Platte mit dem Startfleck am unteren Rand in einen Behälter, in dem sich das Fließmittel befindet. Man muß lediglich darauf achten, daß der Substanzfleck nicht in das Fließmittel eintaucht. Aufgrund der Kapillarkräfte wird das Fließmittel sich entgegen der Schwerkraft auf der Platte hinaufbewegen und dabei die Substanzen mitnehmen. Je nach Polarität und pH -Wert des Lösemittelgemisches werden sich die Substanzen zwischen mobiler und stationärer Phase verteilen und bei entsprechend großen Unterschieden getrennt werden (siehe Abschnitt 3.1 auf S. 7). Hierbei treten die bereits erwähnten Schwierigkeiten mit Fleckverbreiterung etc. auf. Um diese zu vermeiden und den Einfluß der Schwerkraft auf das Fließverhalten des Lösemittelgemisches zu verringern, kann man die Platte auch horizontal entwickeln. Hierbei liegt die DC-Platte auf einem Trog, das Fließmittel wird mit einem Docht oder einer dünnen Glasplatte aus einem tiefer gelegenen Gefäß an die Platte gebracht. Zusätzlich hat man hier noch den Vorteil, daß man von beiden Seiten her entwickeln und so die Plattenkapazität deutlich erhöhen kann.

3.4.2 (Anti-)Zirkulare Entwicklung

Lediglich kurz erwähnt werden soll hier die Möglichkeit, auf einer runden stationären Phase das Fließmittel entweder in der Mitte auf die Platte zu bringen und die Untersuchungslösungen direkt um den Mittelpunkt zu verteilen (zirkular) oder die Substanzen auf einer Kreisbahn am äußeren Rand zu verteilen und das Fließmittel von außen an die Platte zu bringen (antizirkular). Beide Techniken haben sich in der Routine nicht durchgesetzt.

3.4.3 Zweidimensionale Entwicklung

Eine interessante Variante der linearen Entwicklung ist die Entwicklung in zwei senkrecht zueinander stehenden Richtungen. Hierbei wird die Untersuchungslösung in der linken unteren Ecke der Platte aufgetragen und zunächst aufsteigend entwickelt. Nach dieser Trennung, nach der die Substanzen vortrennt auf einer Linie liegen, wird die Platte getrocknet und anschließend um 90° gedreht erneut entwickelt. Dabei ist die während der ersten Entwicklung entstandene Bahn die Startbahn für die zweite Entwicklung. Man kann so im Idealfall die gesamte Fläche der Platte als Trennbett ausnutzen und durch Variation des Fließmittels bei der zweiten Entwicklung unterschiedliche Substanzeigenschaften bei der Trennung ausnutzen. Abbildung 3.3 soll das Vorgehen verdeutlichen.

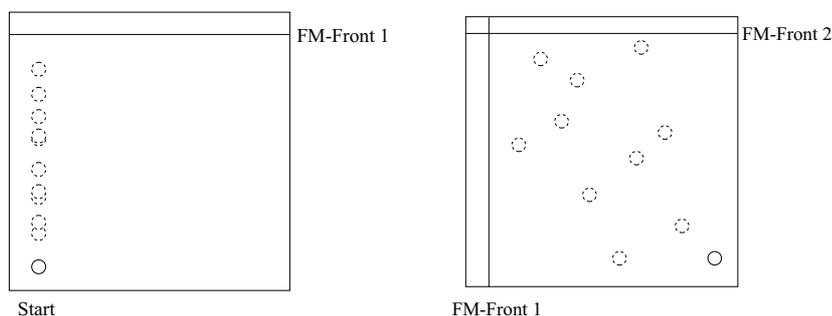


Abbildung 3.3: Zweidimensionale Entwicklung

Behält man bei der Entwicklung in der zweiten Richtung sowohl die sta-

tionäre als auch die mobile Phase bei, so liegen die Substanzen getrennt auf einer Diagonalen vor, die Auflösung wird lediglich um den Faktor $\sqrt{2}$ verbessert. Wesentlich steigern kann man diese Verbesserung durch Variationen der Trennbedingungen. Am einfachsten ist die Wahl eines anderen Fließmittels. Hierbei ist zu beachten, daß bei einem gegebenen Sorbens nicht jedes beliebige Fließmittel eingesetzt werden kann. Wählt man das Sorbens jedoch so, daß in einem weiten Bereich variiert werden kann, z.B. durch den Einsatz von Cyano-Phasen, erzielt man eine deutliche Verbesserung. Aufwendiger ist die Veränderung der stationären Phase. Es gibt kommerziell erhältliche Platten, die auf einem dünnen Streifen am Rand der Platte die eine Phase, auf dem Rest der Platte die andere Phase enthalten. Durch Kombination dieser Platten mit verschiedenen Lösemitteln erreicht man die höchste Variabilität. Meist ist jedoch bereits der Einsatz der erwähnten Cyano-Phasen ausreichend.

Zur Beurteilung der Trennung einer 2D-DC gibt es mehrere Möglichkeiten. [6] verwendet die Korrelationsmatrix der hR_f -Werte der verschiedenen eindimensionalen Trennungen. Dabei werden die Korrelationskoeffizienten nach Gleichung (3.23) gebildet und anschließend verglichen. Je näher der Wert an 1 liegt, desto ähnlicher sind die beiden Trennungen. Das heißt aber auch, daß das gesamte Trennbett weniger ausgenutzt wird. Man strebt demnach eine Minimierung von r an.

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (3.23)$$

Beachtet werden muß hierbei, daß der Korrelationskoeffizient keine absolute Größe ist, sondern von der Steigung abhängig ist [11].

Gonnord et.al.[18] verwenden in ihrem Ansatz zwei Funktionen, die auf dem Abstand der Fleckschwerpunkte beruhen. Ursprünglich gedacht zur Auswahl geeigneter Fließmittelkombinationen auf der Basis einer Datenbank, bestehend aus den R_f -Werten der interessierenden Substanzen, kann man die vorgeschlagenen Kenngrößen auch zur nachträglichen Charakterisierung verwenden. Der D_A -Wert (Gleichung (3.24) auf der nächsten Seite) wird aus

der Summe der Quadrate aller möglichen Abstände zwischen jedem möglichen Fleckpaar gebildet. Der D_B -Wert (Gleichung (3.25)) ist die Summe der Kehrwerte der genannten Abstände. D_A berücksichtigt schlecht getrennte Fleckpaare weniger, sobald einige sehr gut getrennte Flecken vorliegen. D_B hingegen wichtet schlecht getrennte Paare mehr und führt bei der Optimierung zu gleichmäßiger über die Platte verteilte Substanzen.

$$D_A = \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k [(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2] \quad (3.24)$$

$$D_B = \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \frac{1}{[(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2]} \quad (3.25)$$

Mit: k -Anzahl der getrennten Substanzen

Nurok et.al. [29] schlagen zur Charakterisierung der Trennung einer zweidimensionalen dünn-schichtchromatographischen Entwicklung die *Inverse Distance Function* vor (Gleichung (3.26)). Die IDF ist eine Variation des D_B -Wertes und soll wie dieser möglichst kleine Werte annehmen. Um im Falle einer ungenügenden Trennung IDF nicht zu große Werte annehmen zu lassen, setzt man definitionsgemäß den Abstand zwischen Fleckpaaren, die 1 mm oder weniger auseinanderliegen, auf 1 mm. Im Vergleich zum D_B -Wert liefert die IDF kleinere Zahlen.

$$IDF = \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \frac{1}{S_D^{ij}} \quad (3.26)$$

$$S_D^{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2}$$

In Abwandlung der aus der Gaschromatographie bekannten *Chromatographic Response Function* bietet sich die *Planar Response Function* (PRF) an (Gleichung (3.27) auf der nächsten Seite) [29]. Dort wird ein Erwartungswert S_D^{spec} für die Trennung gewählt und alle Trennungen, die besser sind, auf diesen Wert gesetzt. Schlechtere Trennungen verkleinern den Zähler in Gleichung (3.27) auf der nächsten Seite und führen so zu einem größeren negativen Wert des Logarithmus.

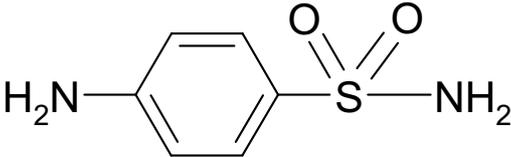
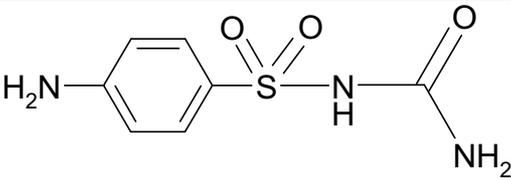
$$PRF = \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \ln \frac{S_D^{ij}}{S_D^{spec}} \quad (3.27)$$

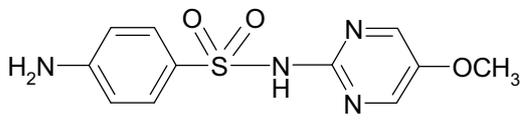
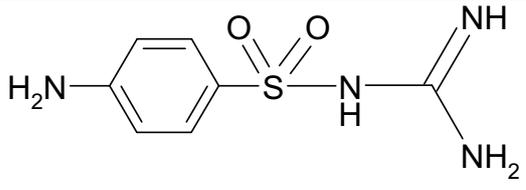
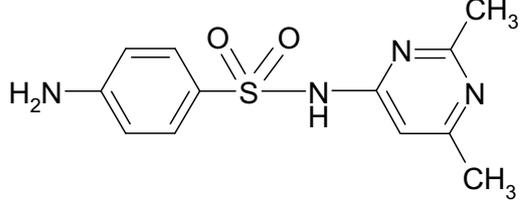
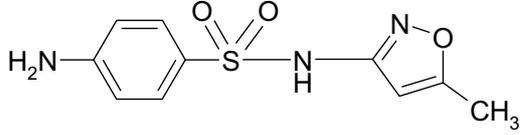
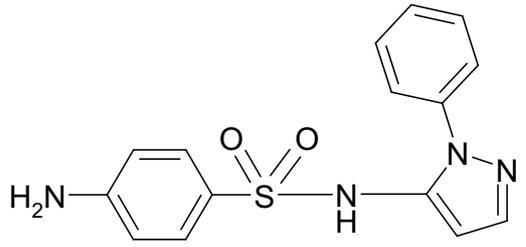
Kapitel 4

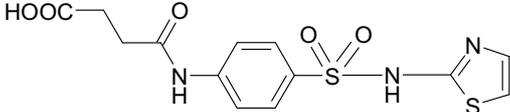
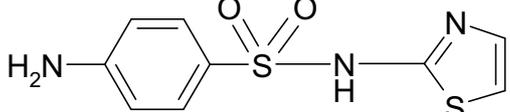
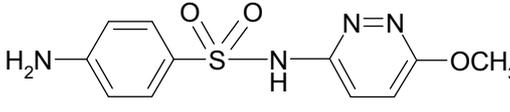
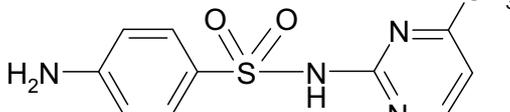
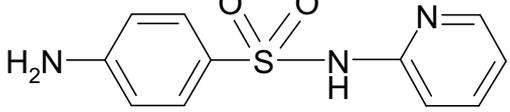
Verwendete Substanzen

4.1 Sulfonamide

Die in dieser Arbeit verwendeten Sulfonamide wurden bereits in [2] untersucht. Dort wird eine Methode zur zweidimensionalen Trennung von 14 Sulfonamiden vorgeschlagen. Die angegebenen Fließmittel wurden weiter optimiert, um eine möglichst vollständige Auftrennung zu erreichen. Tabelle 4.1 zeigt die Strukturformeln.

Sulfanilamid	
Sulfacarbamid	

Sulfamethoxydiazin	
Sulfaguanidin	
Sulfisomidin	
Sulfamethoxazol	
Sulfaphenazol	

Succinylsulfathiazol	
Sulfathiazol	
Sulfamethoxypyridazin	
Sulfamerazin	
Sulfapyridin	

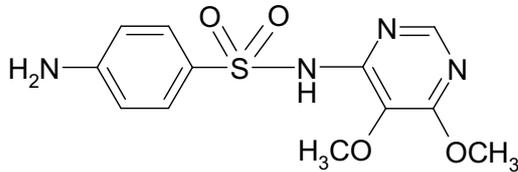
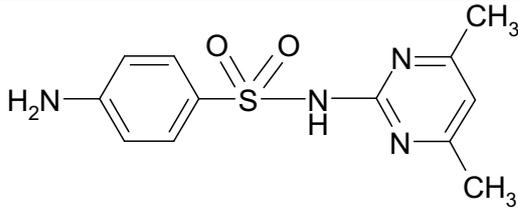
Sulfadoxin	
Sulfadimidin	

Tabelle 4.1: Verwendete Sulfonamide

Zur Trennung der Sulfonamide wurden folgende Fließmittelkombinationen verwendet:

FM 1	H ₂ O/Methanol	30 : 20 Zusatz von 3% NaCl
FM 2	Cyclohexan/Dioxan/NH ₃ (26%)	17 : 26 : 0.5

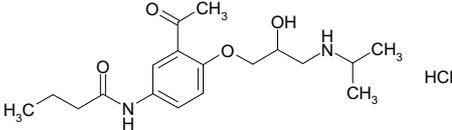
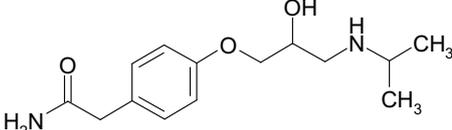
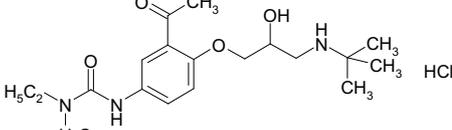
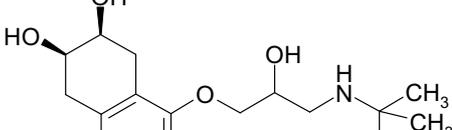
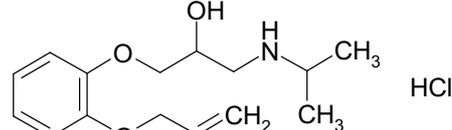
Tabelle 4.2: Trennsystem für die Sulfonamide

FM 1 wurde in der ersten Entwicklung verwendet, danach wurde die Platte 30 Minuten im Kaltluftstrom getrocknet und anschließend mit FM 2 senkrecht zur ersten Richtung erneut entwickelt. Beide Trennungen erfolgten ohne Kammersättigung bei Tageslicht.

Der Zusatz von 3% NaCl im Fließmittel 1 erhöht die Trennschärfe der Flecken [8]. Die FM-Kombination erwies sich bei Variation der Parameter als robust. Die Auswertung erfolgte sowohl visuell als auch mit der PRF (vgl. Gleichung (3.27) auf S. 24) als Zielfunktion. Die Trennung ist in Abbildung 4.1 auf S. 32 dargestellt.

4.2 β -Adrenorezeptorantagonisten

Als weiteres Modell einer zweidimensionalen Trennung wurden die in [16] verwendeten β -Adrenorezeptorenblocker („ β -Blocker“) herangezogen. Die zehn in Tabelle 4.3 aufgeführten Substanzen wurden verwendet.

Acebutolol-HCl	
Atenolol	
Celiolol-HCl	
Nadolol	
Oxprenolol-HCl	

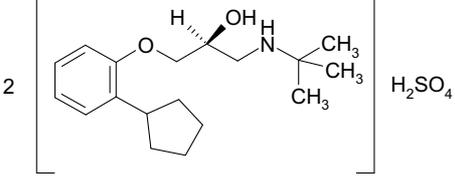
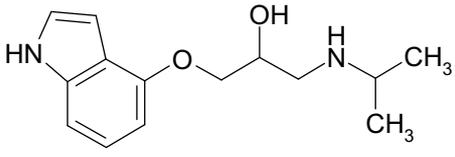
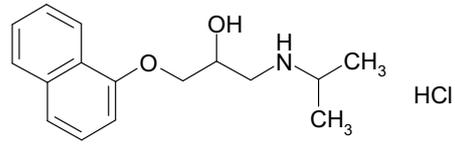
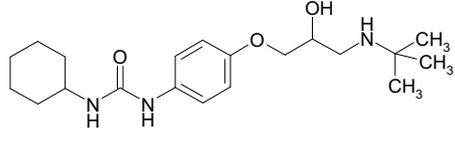
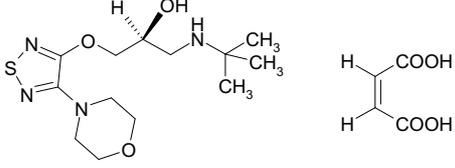
Penbutololsulfat	
Pindolol	
Propranolol-HCl	
Talinolol	
Timololhydrogenmaleat	

Tabelle 4.3: Verwendete β -Blocker

Als Fließmittel wurden folgende Kombinationen verwendet:

FM 1	Methanol/NaCl (1M)/THF/CH ₂ Cl ₂	40 : 42 : 4 : 4
------	--	-----------------

FM 2	Cyclohexan/Methanol/Triethylamin	70 : 15 : 30
------	----------------------------------	--------------

Tabelle 4.4: Trennsystem für die β -Blocker

Die Trennungen erfolgten ohne Kammersättigung und mit 60minütigem Trocknen im Kaltluftstrom nach der ersten Entwicklung. Aufgrund der in der Literatur erwähnten Lichtempfindlichkeit des Pindolols wurde auf Lichtausschluß während des Trocknens geachtet.

Auch hier wurde dem Fließmittel 1 NaCl zur Verbesserung der Trennschärfe zugesetzt. Die Trennung zeigt Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite.

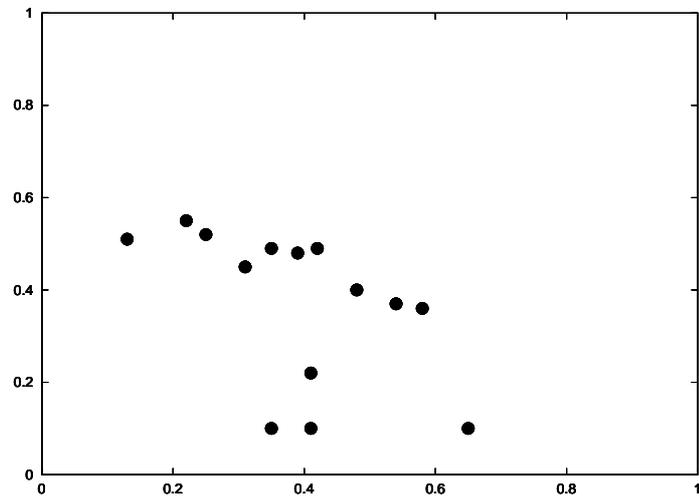
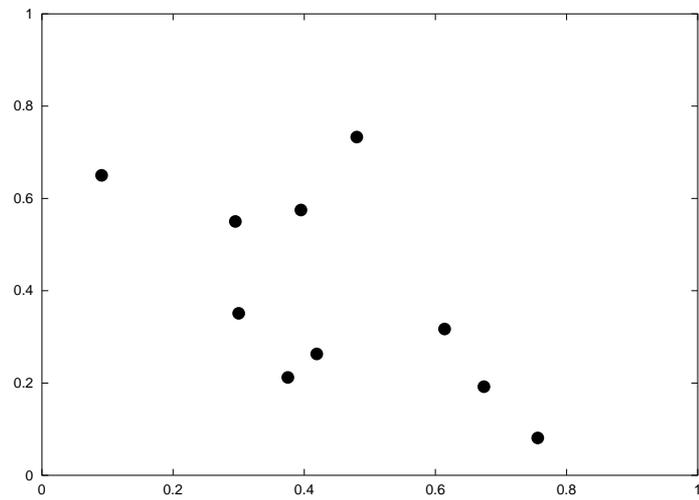


Abbildung 4.1: Trennung der 14 Sulfonamide

Abbildung 4.2: Trennung der 10 β -Blocker

Kapitel 5

Aufbau des Scanners

5.1 Übersicht

DC-Scanner (Densitometer) besitzen im Grunde alle den gleichen Aufbau. Die Platte wird auf einem Kreuztisch befestigt, der sich in zwei Raumrichtungen bewegen kann. Als Lichtquelle dient eine Lampe, die die gewünschten Wellenlängen liefert. Meist werden Deuterium-, Wolfram- oder Quecksilberdampflampen eingesetzt, oft auch eine Kombination aller drei mit der Möglichkeit des Umschaltens. Das polychromatische Licht wird in einem Monochromator in seine spektralen Bestandteile aufgespalten und die interessierende Wellenlänge auf die Platte gestrahlt. In einem bestimmten Winkel wird das remittierte Licht gemessen und mit einem Photomultiplier verstärkt. Die Meßgröße wird dann entweder analog auf einem Schreiber ausgegeben oder digital in einem angeschlossenen Rechner weiterverarbeitet. Moderne Densitometer bieten die Möglichkeit der Steuerung des Scanners über einen Computer, an den auch ein Auftragegerät angeschlossen sein kann. So kann man Methoden definieren, die von beiden Geräten ausgelesen werden können. Üblicherweise enthalten solche Methoden Informationen über Auftrageposition, Auftragemenge, Substanzen, verwendete Wellenlänge, Spaltbreite und -höhe, Scangeschwindigkeit, Empfindlichkeit und Plattengröße. Auch wei-

terführende Angaben sind möglich. Gerade in der Routineanalytik spielt eine solche Automatisierung eine wichtige Rolle.

Der im Rahmen der Arbeit entwickelte Scanner weicht etwas von dem vorgestellten Aufbau ab. So wird nicht monochromatisches Licht auf die Platte eingestrahlt, sondern polychromatisches. Die Aufspaltung in die einzelnen Wellenlängen erfolgt erst nach der Remission. Als Detektor wird kein Photomultiplier eingesetzt, sondern ein Photodiodenarray (siehe Abschnitt 5.5 auf S. 45). Die Übertragung des Lichtes erfolgt mittels eines Lichtwellenleiters, sowohl von der Lichtquelle zur Platte als auch von der Platte zum Detektor (siehe Abschnitt 5.4 auf S. 36). Um auf dem Markt befindliche Auftragegeräte unterstützen zu können, erlaubt die Software das Einlesen der Auftrageparameter des ATS III der Firma CAMAG (MuttENZ, CH). Darüberhinaus sind Anpassungen für das Einlesen der Daten anderer kommerzieller Geräte vorgesehen.

5.2 Lichtquelle

Als Lichtquelle dient eine 30 W Deuterium-Lampe der Firma Hamamatsu, die in einen CLD 300-Modularbaustein der Firma Zeiss (Jena) mit Justagemöglichkeit und Spannungsversorgung eingebaut ist. Der in der Lampe enthaltene Sperrfilter, der Wellenlängen unter 210 nm herausfiltert, um eine Schädigung der Lichtwellenleiter zu verhindern, wurde entfernt (s. Abschnitt 5.4 auf S. 36). Damit erreicht man, daß UV-Strahlung bis 198 nm verwendet werden kann. Den Aufbau des Bausteines zeigt Abbildung 5.1 auf der nächsten Seite.

Auf die Möglichkeit, die Lichtquelle im Vakuum zu betreiben, um die Absorption des Sauerstoffes bei niedrigen Wellenlängen zu verhindern, wurde aus praktischen Gründen verzichtet. Ebenso wäre es möglich, die Lampe mit Stickstoff zu spülen. Für den Einsatzzweck in der DC ist dies jedoch nicht notwendig.

Der serienmäßige Aufbau der Lampe wurde beibehalten. Eine Variation der Einblendtechnik in den Lichtwellenleiter durch direktes Aufbringen der Faser auf der Lampe zeigte nicht den erhofften Erfolg [27].

5.3 Kreuztisch

Der Kreuztisch besteht aus zwei unabhängig voneinander betreibbaren, um 90° versetzt angebrachten Vorschubeinheiten. Der Fahrweg jeder Einheit beträgt 50 cm, um auch größere Objekte aufnehmen zu können. Der Vorschub erfolgt über eine Spindel mit einer Steigung¹ von 4 mm. Die Steuerung der Motoren übernimmt jeweils eine Steuerkarte. Mit dieser ist die Einstellung des Taktes, der Richtung und des Taktstops sowie die Endstufenabschaltung und die Ansteuerung im Voll- und im Halbschrittbetrieb möglich. Wird die eingebaute Spindel im Halbschrittmodus betrieben, so ist

¹Steigung = Vorschubstrecke bei einer Spindelumdrehung von 360°

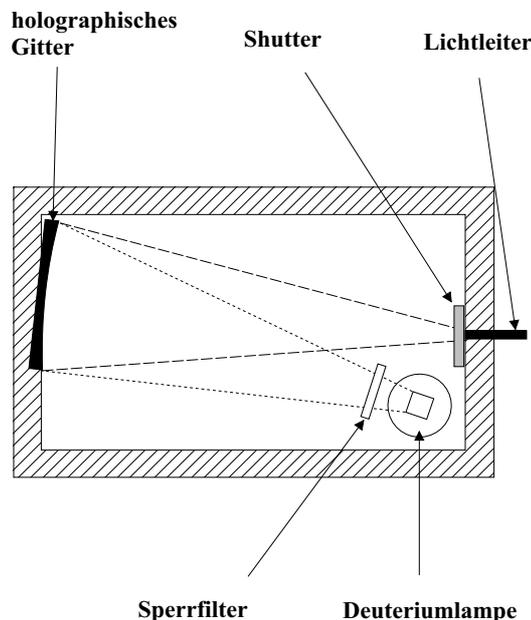


Abbildung 5.1: Schema der CLD 300 Deuteriumlampe

eine Schrittweite von 0.1 mm realisierbar. In den meisten Fällen wird eine derart hohe Auflösung nicht erforderlich sein, bei schlecht getrennten Flecken aber kann sie durchaus eine Verbesserung bringen.

Um die von den Netzteilen der Steuerkarten ausgehende Störung der Spektrenaufnahme zu verringern, wurde in die Stromversorgung jeweils ein 10000 μF Elektrolyt-Kondensator eingebaut. Obwohl es nicht vollkommen gelingt, auftretende Störungen damit zu vermeiden, wird das Rauschen um ca. den Faktor 5 verringert.

Die Steuerung ermöglicht zwei Geschwindigkeiten. Ab einem Weg größer als 10 mm fährt der Tisch mit einer Geschwindigkeit von $1\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, darunter mit $0.1\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Beim Fahren mit der höheren Geschwindigkeit werden zum Anfahren und Abbremsen Geschwindigkeitsrampen benutzt. Wegen der Vibration des Tisches während der Antriebsphase muß nach Erreichen des gewünschten Meßpunktes normalerweise eine Wartezeit vor Aufnahme des Spektrums eingehalten werden. Diese kann entfallen, wenn lediglich ein Übersichtsscan durchgeführt wird.

Die DC-Platte muß so auf dem Tisch montiert sein, daß sie während des Scans nicht verrutschen kann. Andererseits muß eine Variabilität der Plattengröße erhalten bleiben. Dazu wurde auf der Oberseite des Tisches eine T-Nutenplatte befestigt, auf der Befestigungspunkte angebracht werden können. Als Nullpunkt dient ein Anschlagwinkel, in den die linke untere Ecke der DC-Platte eingepaßt wird. Die den Schenkeln des Winkels gegenüberliegenden Seiten der Platte werden mit Muttern fixiert.

5.4 Lichtwellenleiter

5.4.1 Einführung

Um Licht von einer entfernten Lichtquelle zielgerichtet an einen Ort zu bringen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine geeignete Kombination

von Spiegeln ist dazu in der Lage. Allerdings ist der Verlust an Intensität pro Spiegel mit 10% relativ hoch. Dieser Gesamtverlust setzt sich zusammen aus den Einzelverlusten beim Übertritt des Lichtes vom Medium Glas in das Medium Luft (ca. 5%) und bei der Reflexion an der Grenzfläche Spiegelmaterial/Glas, die nur ca. 95% beträgt. Nicht berücksichtigt dabei sind die Verluste, die dadurch entstehen, daß Streulicht gar nicht mehr auf einen gegenüberliegenden Spiegel trifft.

Nützt man die Reflexion an den Oberflächen Glas/Luft bzw. Glas/Glas aus, so kommt man bereits auf weniger Verlust pro Reflexion (ca. 0.1%). Optimiert man die Materialien, die auf der Grenzfläche aufeinandertreffen, so kann man zu noch bedeutend geringeren Verlusten kommen.

Grundsätzlich gilt, daß Licht, das auf die Grenzfläche zweier optisch unterschiedlich dichter Medien trifft, zum Teil reflektiert wird (Einfallswinkel $\theta_I =$ Ausfallwinkel θ_R) und zum Teil in das zweite Medium übergeht, wobei es dort seine Ausbreitungsrichtung ändert ($\theta_I <> \theta_R$). Findet der Übergang von einem optisch dünnen (z.B. Luft) zu einem optisch dichten Medium (z.B. Glas) statt, so wird der Lichtstrahl zum Lot hin gebrochen ($\theta_I > \theta_R$). Beim Übertritt aus einem optisch dichteren Medium in ein optisch weniger dichtes Medium wird der Strahl von der Normalen weggebogen ($\theta_I < \theta_R$).

Für den Fall $\theta_I < \theta_R$ existiert ein Grenzwert θ_{Ik} , an dem das Licht streifend, d.h. parallel zur Oberfläche austritt. Es gilt Gleichung (5.1). Ab diesem Winkel wird kein einfallendes Licht mehr gebrochen und alle Strahlen werden reflektiert. Man spricht von **totaler interner Reflexion (TIR)** oder Totalreflexion. Die TIR ist die Grundlage für die annähernd verlustfreie Strahlungsübertragung in einem Lichtwellenleiter.

$$\sin \theta_{Ik} = \frac{n_2}{n_1} \quad (5.1)$$

Mit: n_1 – Brechungsindex des optisch dünneren Mediums

n_2 – Brechungsindex des optisch dichteren Mediums

Als Kenngröße wird bei optischen Fasern die *numerische Apertur* (NA) angegeben (Gleichung (5.3)). Diese wird aus dem *Snellius'schen Gesetz* hergeleitet (Gleichung (5.2)). Die NA gibt den Sinus des halben Scheitelwinkels der in die Faser einkoppelbaren Lichtstrahlen an. Je größer NA, desto mehr Licht kann die Faser aus einer in großem Winkel strahlenden Lichtquelle aufnehmen. Licht, das in einem größeren Winkel einfällt, wird nicht total reflektiert und tritt aus der Faser wieder aus. Es ist zu berücksichtigen, daß das Licht, das durch TIR durch die Faser transportiert wird, in einem ebenso großen Winkel am Faserende austritt wie es eingestrahlt wurde.

$$n_i \cdot \sin I = n_r \cdot \sin R \quad (5.2)$$

Mit: n_i – Brechungsindex des ersten Mediums (meist Luft)

n_r – Brechungsindex des zweiten Mediums

I – Einfallswinkel

R – Ausfallwinkel

$$NA = n_0 \cdot \sin \theta_{max} = \sqrt{n_{co}^2 - n_{cl}^2} \quad (5.3)$$

Mit: n_0 – Brechungsindex des umgebenden Mediums

θ_{max} – halber Scheitelwinkel

n_{co} – Brechungsindex des Faserkerns

n_{cl} – Brechungsindex des Fasermantels

5.4.2 Aufbau eines Lichtwellenleiters

In einem Lichtwellenleiter (LWL) verwendet man einen hochbrechenden Glaskern und einen niedrigbrechenden Glasmantel. Tritt Licht an einer Stirnseite in den Kern ein, so wird es aufgrund der Totalreflexion an der Grenze zwischen Kern und Mantel auf die gegenüberliegende Faserseite reflektiert

und somit weitergeleitet. Das Licht folgt so der Faser entlang, bis es auf der anderen Stirnseite wieder aus dem Kern austreten kann (Abbildung 5.2).

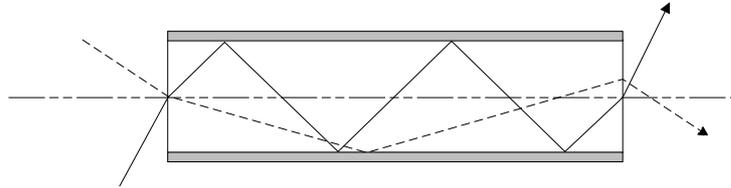
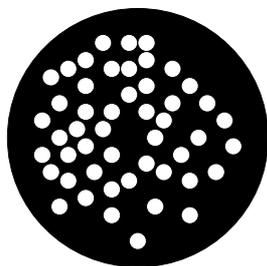


Abbildung 5.2: Aufbau eines Lichtwellenleiters

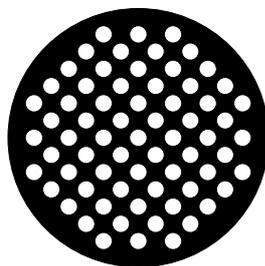
Der Durchmesser einer Faser beträgt üblicherweise zwischen 100 und 1000 μm , wobei der innere Kern zwischen 50 und 800 μm dick ist. Durch die Verwendung optisch unterschiedlich dichter Materialien für den Kern und den Mantel kann nach Gleichung (5.1) auf S. 37 die numerische Apertur variiert werden.

Zur Übertragung von Licht werden Faserbündel verwendet. Die Anordnung der Fasern kann zufällig sein oder einem Muster folgen. Abbildung 5.3 auf der nächsten Seite zeigt einige Möglichkeiten.

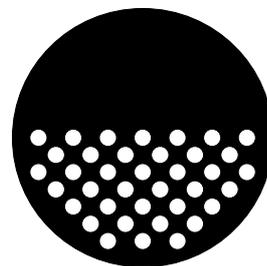
Für den modularen Aufbau des DC-Scanners wurde ein Y-Lichtleiter verwendet, dessen einer Schenkel an die Lichtquelle gekoppelt wird und dessen anderer Schenkel mit dem Detektor verbunden wird. Das gemeinsame Ende enthält sowohl Fasern, die Licht auf die Platte transportieren, als auch Fasern, die das remittierte Licht zum Detektor leiten. Abbildung 5.4 auf S. 41 verdeutlicht den Aufbau. Verwendet wurde hier eine Anordnung im LWL-Ende analog Abbildung 5.4.2 auf der nächsten Seite, bei der die 25 von der Lampe kommenden Fasern zeilenweise angebracht sind und die 25 zum Detektor führenden Fasern zeilenweise darüber fixiert wurden. Dies ermöglicht einen Einfallswinkel von $\theta_I = 0$ und daraus folgend einen Ausfallwinkel von $\theta_R = 0$. So wird die größtmögliche Lichtmenge dem Detektor zugeführt. Nachdem durch die heterogene Oberfläche des Kieselgels eine starke Streuung auftritt, kann man so den Nachteil der verhältnismäßig geringen Lichtausbeute zum Teil wieder wettmachen. Eine Verbesserung wäre



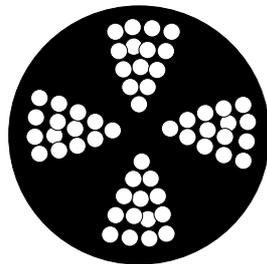
(a) willkürlich



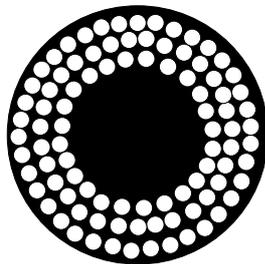
(b) gleichverteilt



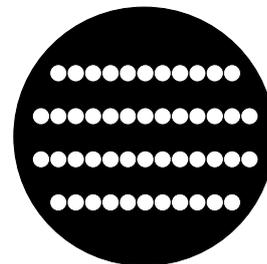
(c) Halbkreis



(d) Segment



(e) konzentrisch



(f) zeilenförmig

Abbildung 5.3: Verschiedene Anordnung von Fasern in einem LWL-Bündel

durch die Verwendung einer Ulbricht-Kugel möglich. Wegen des hohen apparativen Aufwandes, der mit dieser Detektionseinheit verbunden ist, wurde jedoch darauf verzichtet.

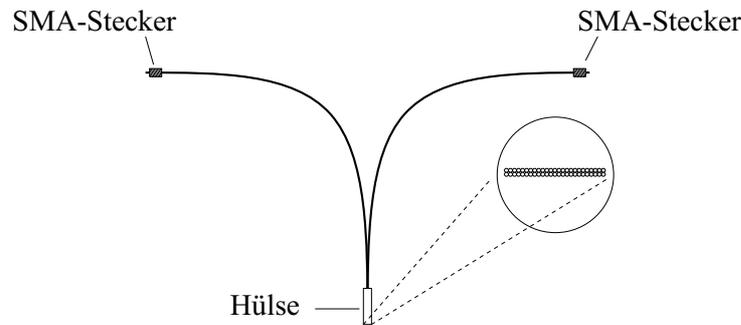


Abbildung 5.4: Y-Lichtleiter mit zeilenförmiger Anordnung

5.4.3 Eigenschaften eines Lichtwellenleiters

5.4.3.1 Single- und Multimodefasern

Lichtstrahlen, die durch eine Faser geleitet werden, können bezüglich ihres Winkels, in dem sie auf den Mantel der Faser treffen, in sogenannte Moden eingeteilt werden. Stärker gebrochene („steilere“) Strahlen werden als Moden höherer Ordnung bezeichnet, Strahlen, die mit weniger Reflexionen durch die Faser kommen („flachere“ Strahlen), gehören zu Moden niedriger Ordnung. Fasern, die mehrere Ordnungen weiterleiten können, werden als Multimodefasern bezeichnet. Ihr Kern hat einen verhältnismäßig großen Durchmesser und eine große numerische Apertur. Damit läßt sich Licht einfach einkoppeln, die Konstruktion der nachfolgenden Bauteile wie z.B. Dioden ist weniger aufwendig und somit günstig. Der Nachteil dieser Faserart besteht darin, daß nur eine geringe Bandbreite² zur Verfügung steht. Strahlen in den unterschiedlichen Moden legen eine unterschiedlich lange Strecke in der Faser zurück und verbleiben somit unterschiedlich lange in der Faser. Das führt dazu, daß die Strahlen interferieren können und die Ausbreitung gestört wird.

²Bandbreite= Datenübertragungskapazität, Produkt aus Strecke und Frequenz

Man bezeichnet diesen Effekt als modale Dispersion. Je länger die Faser, desto deutlicher wird die Dispersion. Natürlich spielt diese Störung nur in den Anwendungen eine Rolle, die ein kohärentes Signal benötigen, z.B. in der Kommunikation. Für die Meßtechnik sind diese Fasern ausreichend, da hier die Fasern nicht zu lange sind und das Signal nicht kohärent vorliegen muß.

Multimode-Fasern wiederum werden unterteilt in Step-Index und Graded-Index-Fasern. Beim Step-Index bleibt die Brechzahl des Kerns über den ganzen Durchmesser gleich und ändert sich stufenartig („step“) an der Grenze Kern/Mantel. Beim Graded-Index nimmt die Brechzahl des Kernes kontinuierlich bis zum Mantel hin ab. Der Weg des Lichtes verläuft in Step-Index-Fasern zickzack förmig, in Graded-Index-Fasern sinusförmig. Wegen der schnelleren Ausbreitung des Lichtes in niedrigbrechenden Umgebungen bewegt sich das Licht am Rand des Faserkernes schneller und verringert somit die Gefahr der Interferenzbildung.

Im Gegensatz zu den Multimode- lassen Singlemode-Fasern lediglich einen, den primären Modus durch die Faser passieren. Dieser verläuft nahezu parallel durch die Faser. Der Vorteil hier ist eine deutliche Erhöhung der Bandbreite. Der Nachteil besteht darin, daß der Faserkern nur einen sehr geringen Durchmesser besitzt und somit die Kopplung des Lichtes in die Faser und aus der Faser sehr aufwendig ist. Außerdem ist die Intensität des einkoppelbaren Lichtes geringer und somit z.B. für die Meßtechnik nicht mehr ausreichend. Single-Mode-Fasern werden heute hauptsächlich in der Telekommunikation eingesetzt.

5.4.3.2 Dämpfungseigenschaften

Entscheidend für die Qualität der Fasern sind deren Dämpfungseigenschaften. Die Dämpfung innerhalb der Faser ist abhängig von der eingesetzten Wellenlänge und wird für den UV-Bereich in dB/m und im sichtbaren und IR-Bereich in dB/km angegeben. Durch die Steuerung des OH-Gehaltes des

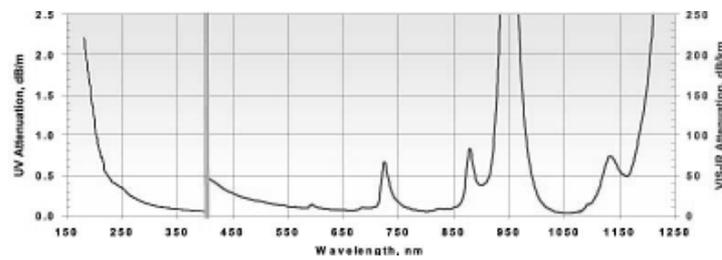
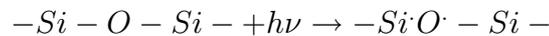


Abbildung 5.5: Dämpfungsverlauf bei unterschiedlichen Glasarten

verwendeten Glases kann man diesen Parameter beeinflussen. Abbildung 5.5 zeigt den Dämpfungsverlauf bei den verschiedenen Glasarten.

5.4.3.3 Farbzentren

Dem Einsatz von Lichtwellenleitern im Wellenlängenbereich unter 230 nm stand lange Zeit eine Wechselwirkung dieses energiereichen UV-Lichtes mit dem Glas entgegen. UV-C Licht ist, ebenso wie die ionisierenden Röntgen- oder γ -Strahlen, in der Lage, im SiO_2 Gitterdefekte hervorzurufen und sogenannte Farbzentren (F-Zentren, E' -Zentren) entstehen zu lassen. Diese führen zu einer Verringerung der Transmission durch die Faser und auf längere Sicht gesehen zur „Erblindung“. Vermutlich brechen durch die Einwirkung der Strahlung schwache Silicium-Sauerstoffbindungen oder Bindungen von Silicium mit Metallen und Chlorid-Ionen, die während der Produktion als Verunreinigungen in das Kristallgitter gelangt sind [22].



Das Ausmaß der Schädigung ist abhängig von der Wellenlänge des einstrahlenden Lichtes und von der Bestrahlungsdauer.

Die Schädigungen treten nicht gleichverteilt über die gesamte Faserlänge auf, sondern sind in dem Teil des LWL, der der Lichtquelle zugewandt ist, am größten und nehmen im weiteren Verlauf ab (Gleichung (5.4) auf der nächsten Seite).

$$\Delta\alpha_L(\lambda) = \int_0^L \Delta\alpha(\lambda, z) dz \quad (5.4)$$

Mit: $\Delta\alpha(\lambda)$ – Verlust durch UV-Bestrahlung

L – Länge des LWL

Ebenso ist das Ausmaß der Bildung der Farbzentren abhängig von der Zeit, die die Faser dem Licht ausgesetzt ist. Der Totalverlust in der Faser ergibt sich aus Gleichung (5.5) [23].

$$\alpha_{L,tot}(\lambda, t_{UV}) = \alpha_B(\lambda)L + \Delta\alpha_L(\lambda, t_{UV}) \quad (5.5)$$

Mit: L – Länge des LWL

t_{UV} – UV-Bestrahlungszeit

λ – Wellenlänge

5.4.3.4 Optimierte Lichtwellenleiter

Untersuchungen der Farbzentren ergaben, daß durch eine Begasung der Faser mit Wasserstoff die E'-Zentren passiviert werden können. Die Anwendung ist vergleichbar mit der Herstellung leistungsfähiger Solarzellen ebenfalls durch H₂-Behandlung. Der Wasserstoff beginnt nach der Begasung entsprechend seines Diffusionskoeffizienten wieder aus dem LWL auszutreten. Dadurch wird die Wirksamkeit der Begasung herabgesetzt und E'-Zentren können erneut entstehen. Diese Diffusion ist der begrenzende Faktor bei der Lebensdauer der Fasern. Zuerst diffundiert H₂ aus den äußeren Schichten des Glases und führt so zu einem Gradienten, der im Lauf der Zeit immer flacher verläuft, bis kein Wasserstoff aus der Begasung mehr in der Faser vorhanden ist. Durch Optimierung der Begasung gelingt es, die Diffusion von freiem H₂ stark zu verlangsamen und somit die Lebensdauer der Fasern zu erhöhen [22].

5.5 Photodiodenarray

5.5.1 Grundlagen

Die Umwandlung von Licht- in elektrische Energie kann über Photodioden erfolgen. Diese bestehen aus einem Halbleiter, der meist aus zwei verschiedenen Elementen aufgebaut ist. Klassifiziert werden die Halbleiter nach den Wertigkeiten der Elemente bzw. nach den Spalten des Periodensystems, aus denen die Elemente stammen. GaAs ist beispielsweise ein 3-5-Halbleiter, SiC ein 4-4-Halbleiter. Ebenfalls gebräuchlich sind SiO_2 und Metalloxide wie z.B. CuO_2 . Für die Energiezustände im Halbleiter gilt Folgendes: Ein Valenzband ist von einem Leitungsband getrennt durch eine verbotene Zone definierter Breite. Im Leitungsband sind n Elektronen, im Valenzband n Löcher. Durch einen Photon-Elektron-Stoß können Elektronen im Leitungsband angeregt werden und bei entsprechend hoher Anregungsenergie über die verbotene Zone gehoben werden.

Während bei reinen Halbleitern die verbotene Zone komplett überwunden werden muß, existieren bei gestörten Halbleitern aufgrund der Störung des Idealgitters der Elemente zusätzliche Energiezustände, die oft in der verbotenen Zone liegen. Dadurch wird die benötigte Anregungsenergie verringert und die Leitfähigkeit erhöht.

5.5.2 Aufbau des Photodiodenarrays

Das remittierte Licht wird über den Lichtwellenleiter zum Array gebracht. Über einen Querschnittswandler wird die runde Fläche der Fasern in eine rechteckige umgewandelt. Das Licht trifft dann auf ein holographisches Gitter, das die polychromatische Strahlung in ihre einzelnen Wellenlängen zerlegt. In definiertem Abstand vom Gitter ist das eigentliche Array angebracht, so daß jeder Diode eine genau bestimmbare Wellenlänge zugeordnet werden kann. Abbildung 5.6 auf der nächsten Seite zeigt den Aufbau einer Detekti-

onseinheit, Abbildung 5.7 ein typisches Spektrum einer Deuteriumlampe.

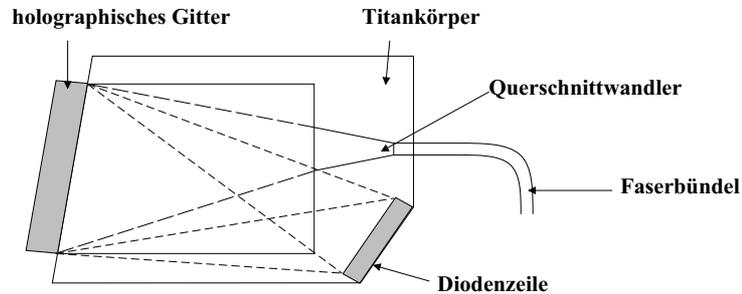


Abbildung 5.6: Aufbau des Detektors

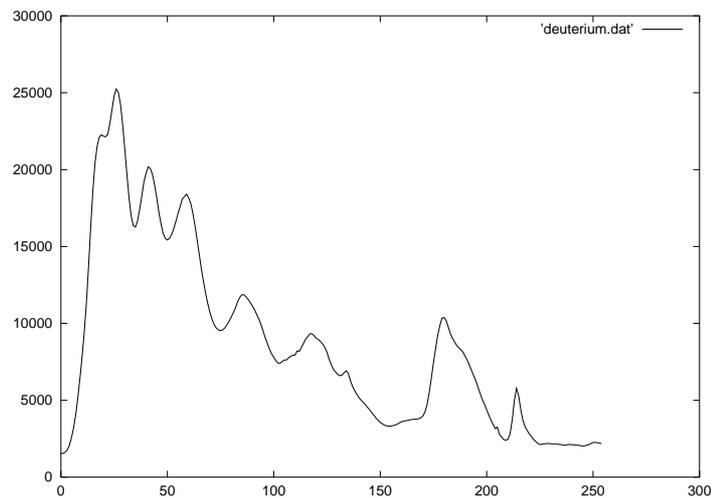


Abbildung 5.7: Deuteriumspektrum

Verwendet wird hier ein Hamamatsu-Array der Serie S3904 mit 256 bzw. 512 Dioden. Jede Diode ist $25 \mu\text{m}$ breit und hat eine Höhe von 2.5 mm. Der Abstand zwischen den einzelnen Dioden beträgt $5 \mu\text{m}$, um ein Übersprechen der Dioden zu vermeiden.

Von Übersprechen spricht man, wenn der Diodenhalbleiter in den Sättigungsbereich gekommen ist und zusätzliche Ladung dann auf die Nachbardioden übertragen wird. Dies führt zu einer Signalanhebung in der Umgebung der vollausgelasteten Diode und in der Folge zu systematisch falsch erhöhten Werten.

Der Meßbereich des Arrays reicht von 190 bis 735 nm. Die Diodenzelle ist in einen Zeiss MMS 224 Modularbaustein eingebaut, der bereits die Elektronik zum Datenauslesen enthält. Am analogen Ausgang der Platine liegt das Arraysignal an. Ein zusätzlicher digitaler Eingang ermöglicht die Ansteuerung des Auslesevorganges. Somit ist eine größtmögliche Flexibilität hinsichtlich der Integrationszeiten und der Auslesezyklen gewährleistet. Die Realisierung des Aufbaus mit modularen Bausteinen gibt die Möglichkeit zum einfachen Austausch einzelner Teile. Interessant dürfte hier vor allem der Austausch des Arrays sein. Eine Erhöhung der Diodenzahl bzw. ein Wechsel des ausgewerteten Teilspektrums ist in kurzer Zeit durchführbar.

Kapitel 6

Datenverarbeitung

6.1 Datenstruktur und -eingabe

Die gemessenen Daten werden im Falle des 512 Dioden-Arrays in einem zweidimensionalen Datenfeld gespeichert, dessen Spaltenzahl den Meßpunkten auf der Platte entspricht. Die Anzahl der Zeilen gibt die Zahl der verwendeten Dioden wieder. Die einzelnen Meßwerte werden als Integer-Wert gespeichert. Hierbei stehen zur Erfassung 2 Byte bzw. 16 bit zur Verfügung. Zur Aufnahme reicht diese Tiefe aus, um präzise Meßwerte möglichst kompakt zu speichern. Scannt man die Bereiche der Platte, die in Abschnitt 8.2 auf S. 71 dargestellt sind, und berücksichtigt dabei die Höhe des Auftragepunktes, so sind bei einer Ortsauflösung von 0.1 mm 450 Einzelschritte vermessen worden. Die Größe des resultierenden Datenfeldes ist somit

$$r \cdot c \cdot s = \text{Größe} = 512 \cdot 450 \cdot 2 = 460800 \text{ Byte} = 450kB \quad (6.1)$$

Mit: r – Zahl der verwendeten Dioden

c – Zahl der angefahrenen Meßpunkte

s – Speicherbedarf des Datentypes

Dieses Datenfeld wird eingelesen und weiterverarbeitet.

Die Zuordnung der Wellenlängen zu den einzelnen Dioden ist nicht bei jedem Array gleich. Nach der Produktion muß das Array so eingemessen werden, daß man die Diodennummer in die entsprechende Wellenlänge umrechnen kann. Dies erfolgt für das gesamte Array mit Hilfe der positiven Lösung einer quadratischen Gleichung, deren Parameter a , b und c vom Hersteller angegeben werden:

$$\lambda = -b + \sqrt{\frac{b^2 - 4 \cdot a \cdot (c - i)}{20 \cdot a}} \quad (6.2)$$

Mit: a, b, c – vorgegebene Parameter des Herstellers

i – Nummer der Diode

Um das Zusammenarbeiten mit kommerziell erhältlichen Geräten zu ermöglichen, wurden Importfunktionen für die Konfigurationsdateien verschiedener Auftragsgeräte und Scanner implementiert.

6.2 Datenbearbeitung

Nachdem die Signale in das Datenfeld eingelesen wurden, werden diese Rohdaten in einem ersten Schritt nach Kubelka/Munk (Gleichung (3.7) auf S. 13) umgerechnet in die entsprechenden Remissionswerte. Anschließend werden die verrauschten Meßwerte entsprechend dem Verfahren nach Abschnitt 8.3.1 auf S. 72 geglättet und mit Hilfe der Basislinie bzw. -fläche korrigiert. Die bearbeiteten Daten werden zur visuellen Auswertung entweder zwei- oder dreidimensional dargestellt und die erkannten Peaks werden in einer Liste ausgegeben und gespeichert. Zur Weiterverarbeitung in anderen Programmen werden die erhaltenen Werte einerseits in einem Datenfeld vom Typ *Double*, das pro Index eine Genauigkeit von 8 Byte besitzt, binär gespeichert. Andererseits werden die Daten in ein Klartext-File geschrieben,

um die Weiterverarbeitung in Standardsoftware wie Tabellenkalkulationen etc. zu ermöglichen. Die Ergebnisse der Auswertung werden in die letzte Zeile der jeweiligen Dateien geschrieben.

6.3 Datenausgabe

Die Ausgabe der Daten erfolgt entweder auf dem Bildschirm, um die vom Programm gewählten Peakgrenzen und -flächen zu visualisieren und dem Bediener die Möglichkeit eines Eingriffes zu geben, oder in eine Datei nach dem im vorherigen Abschnitt vorgestellten Vorgehen. Die Bearbeitung am Bildschirm läßt eine manuelle Kontrolle der Glättungsparameter sowie der Integrationsgrenzen zu.

Spezialisierte Fremdprogramme bieten die Möglichkeit, Daten zu importieren und weiterzuverarbeiten. Daher wird einerseits eine Binärdatei mit den fertigen Daten angelegt, andererseits eine Textdatei erstellt, die die Daten im Klarformat enthält.

Kapitel 7

Vergleich zwischen UV-Spektren in Lösung und auf DC-Platte

Will man Substanzen auf einer DC-Platte identifizieren, gibt es grundsätzlich mehrere Möglichkeiten. Häufig angewandt wird eine visuelle Auswertung der Flecken im Anschluß an die Entwicklung nach dem Besprühen der Platte mit einem Reagenz, das mit verschiedenen funktionellen Gruppen einer Substanz eine Färbung ergibt. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft der Moleküle innerhalb einer Substanzklasse ist die Aussage jedoch nur von eingeschränktem Nutzen. Zieht man zusätzlich noch die R_f -Werte heran, ergeben sich bereits präzisere Aussagen. Dennoch ist es nicht immer möglich, zweifelsfreie Entscheidungen zu treffen. Will man anschließend noch eine quantitative Aussage treffen, birgt die Farbreaktion zusätzliche Fehlerquellen durch ungleichmäßiges Besprühen, unterschiedliche Umsetzungsraten zwischen Substanz und Reagenz und Farbänderungen im Laufe der Auswertung durch Reaktion mit Luftsauerstoff.

In der UV-Spektroskopie ist es möglich, die Spektren von Referenzsubstanzen als Vergleich heranzuziehen und einfach anhand der Lage der Banden

oder aufwendiger, aber genauer, anhand verschiedener mathematischer Verfahren die Übereinstimmung zu testen [20]. Bibliotheken dieser Art existieren (z.B. [7]) und finden in der Praxis Anwendung. Anders verhält es sich bei Remissionsspektren, die auf DC-Platten aufgenommen werden. Hier spielen die Einflüsse vieler verschiedener Faktoren eine große Rolle auf das Aussehen des Spektrums, daß eine Spektrensammlung nicht praktikabel erscheint. So müsste für jede stationäre Phase, die in der DC Verwendung findet, eine eigene Sammlung angelegt werden. Selbst bei gleicher Plattenbeschichtung beeinflußt das verwendete Fließmittel die Form des resultierenden Spektrums in nicht vernachlässigbarer Weise. Dennoch soll hier versucht werden, die Grenzen der Übertragbarkeit von Lösungsspektren und Remissionsspektren auszuloten und anschließend ein Vergleich mit Referenz-Remissionsspektren durchgeführt werden.

7.1 Spektrennormierung

Will man Spektren miteinander vergleichen um zu entscheiden, ob sie von der selben Substanz stammen, ist es häufig notwendig, vor dem eigentlichen Vergleich eine Normierung durchzuführen. Da die meisten Spektren in Abhängigkeit von der Konzentration verschieden große Abszissenwerte annehmen, wäre sonst ein Vergleich zweier Spektren, die bei unterschiedlichen Konzentrationen aufgenommen wurden, nicht möglich. Kann man dies bei Reinsubstanzen noch weitgehend verhindern, stellt sich vor allem bei unbekanntem Proben das Problem der Einwaage. Selbst bei Reinsubstanzen kann jedoch durch vorgeschaltete fehlerbehaftete Schritte wie z.B. Injektionsvolumina in der HPLC oder Einwaage eine Normierung notwendig sein.

Grundsätzlich stehen mehrere Normierungsmethoden zur Verfügung, deren Vor- und Nachteile kurz aufgezeigt werden sollen.

7.1.1 Punktnormierung

Man wählt einen Punkt des Referenzspektrums aus (in der Regel das Absorptionsmaximum) und bestimmt direkt den Normierungsfaktor N_P .

$$N_P = \frac{A_{Ref,max}}{A_{S,max}} \quad (7.1)$$

Diese Normierung ist einfach durchzuführen, birgt aber einige Probleme. So wird ein zufälliger Fehler in A_{max} bei der Umrechnung auf das gesamte Spektrum übertragen. Ebenso weisen einige Substanzen vor allem im niedrigen Wellenlängenbereich eine deutlich Endabsorption auf, die oft im Wert über einem späteren Maximum liegt. In diesem Bereich sind jedoch die externen Einflüsse wie z.B. Fließmittel oder Beschichtung der DC-Platte bereits beträchtlich.

7.1.2 Mittelwertnormierung

Um den beschriebenen Einfluß eines statistischen Fehlers möglichst gering zu halten, kann man die Wellenlängen um den ausgewählten Punkt in die Berechnung miteinbeziehen. So gelangt man zum Normierungsfaktor N_M .

$$N_M = \frac{\sum_{i=-2}^{i=2} A_{Ref,max+i}}{\sum_{i=-2}^{i=2} A_{S,max+i}} \quad (7.2)$$

7.1.3 Flächennormierung

Um den Fehler, der bei Punkt- und Mittelwertnormierung aufgrund mangelnder Richtigkeit bzw. Reproduzierbarkeit auftreten kann, zu vermeiden, nimmt man zur Berechnung des Normierungsfaktors alle zur Verfügung stehenden Wellenlängen und erhält so den Faktor N_F .

$$N_F = \frac{\sum_{i=1}^n A_{Ref,i}}{\sum_{i=1}^n A_{S,i}} \quad (7.3)$$

Bei der Verwendung von n Wellenlängen sollte theoretisch ein Präzisionsgewinn von \sqrt{n} möglich sein. Praktisch wird dieser Faktor jedoch nicht erreicht. Bei Absorptionen nahe 0 liegen die Daten nicht mehr normalverteilt vor, hier tragen Rauscheffekte erheblich zur Abweichung bei. [15] postulieren eine Verbesserung um den Faktor 1 bis 3.

7.1.4 Normierung durch lineare Regression

Geht man davon aus, daß man zwei Spektren der gleichen Substanz vorliegen hat, die bei unterschiedlichen Konzentrationen aufgenommen wurden, so liegt folgende Überlegung nahe: Nimmt man die Absorptionen des einen Spektrums als unabhängige Variable und die Werte des anderen als abhängige, so liegen die Schnittpunkte im Koordinatensystem auf einer Geraden, sofern die Spektren voneinander linear abhängig sind. Mit dieser Geraden läßt sich eine Ausgleichsrechnung wie unter Abschnitt 3.3.5.1 auf S. 16 beschrieben durchführen. Man erhält die Steigung a_1 der Geraden als Normierungsfaktor N_{LR} (s. Gleichung (3.13) auf S. 16).

7.1.5 Normierung durch orthogonale Regression

Wie beschrieben, ist eine der Voraussetzungen für die lineare Regression die Fehlerfreiheit einer Variablen. Dies ist im Falle des Spektrenvergleiches nicht gegeben, da auch bei der Aufnahme des Referenzspektrums fehlerbehaftete Größen Eingang finden. Eine Berücksichtigung dieses Einflusses erreicht man durch die Anwendung der orthogonalen Regression. Voraussetzung hierbei ist, daß beide Größen gleichermaßen fehlerbehaftet sind, d.h.

$$\text{var}(y) \stackrel{\alpha}{=} \text{var}(x) \quad (7.4)$$

Werden bei der linearen Regression die Abstände der Meßwerte zur Ausgleichsgeraden parallel zur Ordinate minimiert, ist die Richtung der Minimierung hier senkrecht zur Regressionsgeraden.

Es gilt

$$S_{xx} \equiv \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad S_{yy} \equiv \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad S_{xy} \equiv \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

$$\cos(\phi) = \frac{1}{\sqrt{1 + \tan^2 \phi}} = \frac{1}{\sqrt{1 + a_{ortho}^2}} \quad (7.5)$$

$$d_i = \frac{(y_i - \bar{y}_c) - a_{ortho}(x_i - \bar{x}_c)}{\sqrt{1 + a_{ortho}^2}} \quad (7.6)$$

Als zu minimierender Term ergibt sich Gleichung (7.7). Die partielle Ableitung wird Null gesetzt und die gesuchte Steigung, die dem Normierungsfaktor N_{ortho} entspricht, ergibt sich aus der positiven Lösung für Gleichung (7.10)

$$S_d = \sum_{i=1}^n d_i^2 \stackrel{!}{=} \min \quad (7.7)$$

$$\frac{\delta S_d}{\delta a_{ortho}} = 0 \quad (7.8)$$

$$a_{ortho}^2 + a_{ortho} \frac{S_{xx} - S_{yy}}{S_{xy}} - 1 = 0 \quad (7.9)$$

$$a_{ortho} = \frac{S_{yy} - S_{xx}}{2 \cdot S_{xy}} \pm \sqrt{\left(\frac{S_{yy} - S_{xx}}{2 \cdot S_{xy}} \right)^2 + 1} \quad (7.10)$$

Um die Güte der Regression beurteilen zu können, zieht man als Parameter die Standardabweichung und das Bestimmtheitsmaß heran.

$$S_d = \frac{S_{yy} - 2 \cdot a_{ortho} \cdot S_{xy} + a_{ortho}^2 \cdot S_{xx}}{1 + a_{ortho}^2} \quad (7.11)$$

$$sdv(d) = \sqrt{\frac{S_d}{n-3}} \quad (7.12)$$

$$r^2 = \frac{S_{xy}^2}{S_{xx} \cdot S_{yy}} \quad (7.13)$$

In [13] wird darauf hingewiesen, daß die Orthogonalregression nur angewendet werden darf, wenn

$$a_{ortho} = \frac{sdv(y)}{sdv(x)} \quad (7.14)$$

bzw. wenn bei gleichen Varianzen sich eine Steigung von 1 ergibt. Die jeweilige Prüfung darauf ist in Tabelle 7.1 auf der nächsten Seite durch ein + resp. - angegeben.

7.2 Normierungsfaktoren der Sulfonamidspektren

In Tabelle 7.1 auf der nächsten Seite sind die einzelnen Normierungsfaktoren für die mit dem CAMAG-Scanner aufgenommenen Spektren im Vergleich mit den UV- Spektren angeführt.

Trotz der Tatsache, daß beide Größen in der Regression fehlerbehaftet sind, wird deutlich, daß die Anwendung der orthogonalen Regression zur Normierung nicht durchgeführt werden kann, da Gleichung (7.14) nicht erfüllt ist. Die Anwendung der linearen Regression muß ebenfalls verworfen werden, da die errechnete Steigung einen unwahrscheinlichen Wert annimmt. Betrachtet man die Regressionskurven (Beispiel Abbildung 7.1 auf S. 65), wird der Grund ersichtlich: Es liegt keine Gerade vor, sondern eine Kurve, die in ihrem Verlauf eher einer Hysterese-Schleife ähnelt. Durch die Verschiebung der Wellenlängen bei einer Messung auf der DC-Platte im Vergleich zu einer Messung in Lösung sind die resultierenden Spektren mit den Mitteln der orthogonalen bzw. linearen Regression nicht vergleichbar. Man muß dann

auf die erwähnten anderen Normierungsfaktoren zurückgreifen und die beschriebenen Nachteile in Kauf nehmen. In Abbildung 7.1 auf S. 63 sind die Spektren der Sulfonamide, in Lösung, auf DC-Platte mit CAMAG-System und auf DC-Platte mit einem PDA aufgenommen, dargestellt.

Sulfonamid	N_P	N_M	N_F	N_{LR}	N_{OR}	+/-
Sulfaguanidin	$1.986 \cdot 10^{-4}$	$1.976 \cdot 10^{-4}$	$1.256 \cdot 10^{-4}$	3234.1	3927.7	-
Sulfapyridin	$1.020 \cdot 10^{-4}$	$1.010 \cdot 10^{-4}$	$8.716 \cdot 10^{-5}$	2554.5	14800	-
Sulfamethoxydiazin	$1.327 \cdot 10^{-4}$	$1.322 \cdot 10^{-4}$	$1.222 \cdot 10^{-4}$	3390.8	6129.4	-
Sulfadoxin	$2.497 \cdot 10^{-4}$	$2.415 \cdot 10^{-4}$	$1.343 \cdot 10^{-4}$	1727.9	6139.2	-
Sulfamerazin	$1.570 \cdot 10^{-4}$	$1.304 \cdot 10^{-4}$	$1.407 \cdot 10^{-4}$	3305.2	4512.5	-
Succinylsulfathiazol	$1.164 \cdot 10^{-4}$	$1.391 \cdot 10^{-4}$	$1.096 \cdot 10^{-4}$	4995.9	6246.2	-
Sulfanilamid	$2.320 \cdot 10^{-4}$	$2.271 \cdot 10^{-4}$	$1.686 \cdot 10^{-4}$	2482.9	2940.9	-
Sulfaphenazol	$2.132 \cdot 10^{-4}$	$2.087 \cdot 10^{-4}$	$1.214 \cdot 10^{-4}$	3712.3	4216.3	-
Sulfathiazol	$2.132 \cdot 10^{-4}$	$2.089 \cdot 10^{-4}$	$1.276 \cdot 10^{-4}$	554.9	26381	-
Sulfamethoxyimidazin	$1.649 \cdot 10^{-4}$	$1.639 \cdot 10^{-4}$	$1.175 \cdot 10^{-4}$	1440.4	6242.6	-
Sulfamethoxazol	$1.535 \cdot 10^{-4}$	$1.531 \cdot 10^{-4}$	$1.202 \cdot 10^{-4}$	3102.7	4778.4	-
Sulfadimidin	$5.330 \cdot 10^{-4}$	$5.211 \cdot 10^{-4}$	$3.721 \cdot 10^{-4}$	1026.7	1410.2	-
Sulfisomidin	$2.198 \cdot 10^{-4}$	$1.775 \cdot 10^{-4}$	$1.284 \cdot 10^{-4}$	2424.4	3975.5	-
Sulfacarbamid	$1.528 \cdot 10^{-4}$	$1.522 \cdot 10^{-4}$	$1.298 \cdot 10^{-4}$	3635.1	4746.8	-

Tabelle 7.1: Normierungsfaktoren

Tabelle 7.2 auf der nächsten Seite macht das Ausmaß der Wellenlängenverschiebung bei den Sulfonamiden deutlich. Vermessen wurde immer die gleiche Charge einer Substanz. Die Lösungen wurden bei der Messung auf der DC-Platte jeweils frisch aufgetragen, sodaß oxidative Effekte minimiert werden konnten.

Sulfonamid	$\lambda_{\text{Lösung}}$	$\lambda_{\text{Platte,Camag}}$	$\lambda_{\text{Platte,eigen}}$
Sulfaguanidin	264	275	306
Sulfapyridin	269	283	310
Sulfamethoxydiazin	271	283	311
Sulfadoxin	274	283	301
Sulfamerazin	270	281	306
Succinylsulfathiazol	285	294	303
Sulfanilamid	262	272	312
Sulfaphenazol	268	276	302
Sulfathiazol	268	297	308
Sulfamethoxypyridazin	268	278	312
Sulfamethoxazol	270	280	277
Sulfadimidin	272	281	307
Sulfisomidin	274	276	312
Sulfacarbamid	269	281	301

Tabelle 7.2: Wellenlängendifferenzen

Es fällt eine durchgehende hyperchrome Verschiebung der Spektren auf der DC-Platte auf. Die niedrigsten Werte werden bei den Spektren erreicht, bei der die Substanzen in Lösung vorliegen. Die Spektren auf der DC-Platte liegen durchgehend höher. Dieser Effekt kann durch den eingesetzten Fluoreszenzindikator der Platten hervorgerufen werden. Bei den Remissionsspektren unterscheiden sich der CAMAG-Scanner, der das Spektrum mit Hilfe eines rotierenden Prismas mißt und hierbei länger über dem Substanzfleck positioniert ist und der Selbstbau-Scanner, der kontinuierlich ein Spektrum aufnimmt. Bis auf eine Ausnahme sind die maximalen Wellenlängen beim CAMAG-Scanner niedriger. Hier spielt eine oxidative Veränderung der Sulfonamide eine Rolle, die beim Messen mit dem eigenen Scanner sowohl mehr Luftsauerstoff als auch Tageslicht ausgesetzt sind.

Vergleicht man die Substanzen bezüglich ihrer Wellenlängenmaxima auf den verschiedenen Medien, sieht man keinen Zusammenhang (Tabelle 7.3). Die Annahme, daß eine Verschiebung um einen konstanten Betrag in Richtung längerwelligem Licht stattfinden würde, ist falsch. Das Heranziehen bereits vorhandener Spektrenbibliotheken wie z.B. [7], die in Lösung aufgenommen wurden, bringt daher keinen Vorteil zur Identifizierung.

Sulfonamid	<i>Rang_{Lösung}</i>	<i>Rang_{Camag}</i>	<i>Rang_{eigen}</i>
Sulfanilamid	1	2	12
Sulfaguanidin	2	4	6
Sulfaphenazol	3	5	4
Sulfathiazol	4	7	9
Sulfamethoxyridazin	5	14	13
Sulfapyridin	6	9	2
Sulfacarbamid	7	12	10
Sulfamerazin	8	8	1
Sulfamethoxazol	9	10	7
Sulfadimidin	10	11	8
Sulfisomidin	11	6	14
Sulfamethoxydiazin	12	1	3
Sulfadoxin	13	3	11
Succinylsulfathiazol	14	13	5

Tabelle 7.3: Rangordnung der Sulfonamide nach Wellenlängenmaxima bei verschiedenen Medien

Somit muß die Identifikation der Substanzen anhand ihrer Spektren auf eine andere Art durchgeführt werden. Nahe läge die Verwendung von Referenzspektren, die ebenfalls in Remission gemessen werden und auf einem vergleichbaren Träger durchgeführt werden. Der Vergleich zweier Remissionsspektren führt aber hier ebensowenig zum Ziel (vgl. Tabelle 7.3, Spalten *Rang_{Camag}* und *Rang_{eigen}*). Daher muß auch hier die Identifikation von Sub-

stanzen anhand von Spektren erfolgen, die mit der gleichen Methode unter den gleichen Bedingungen idealerweise auf der gleichen Platte aufgenommen wurden.

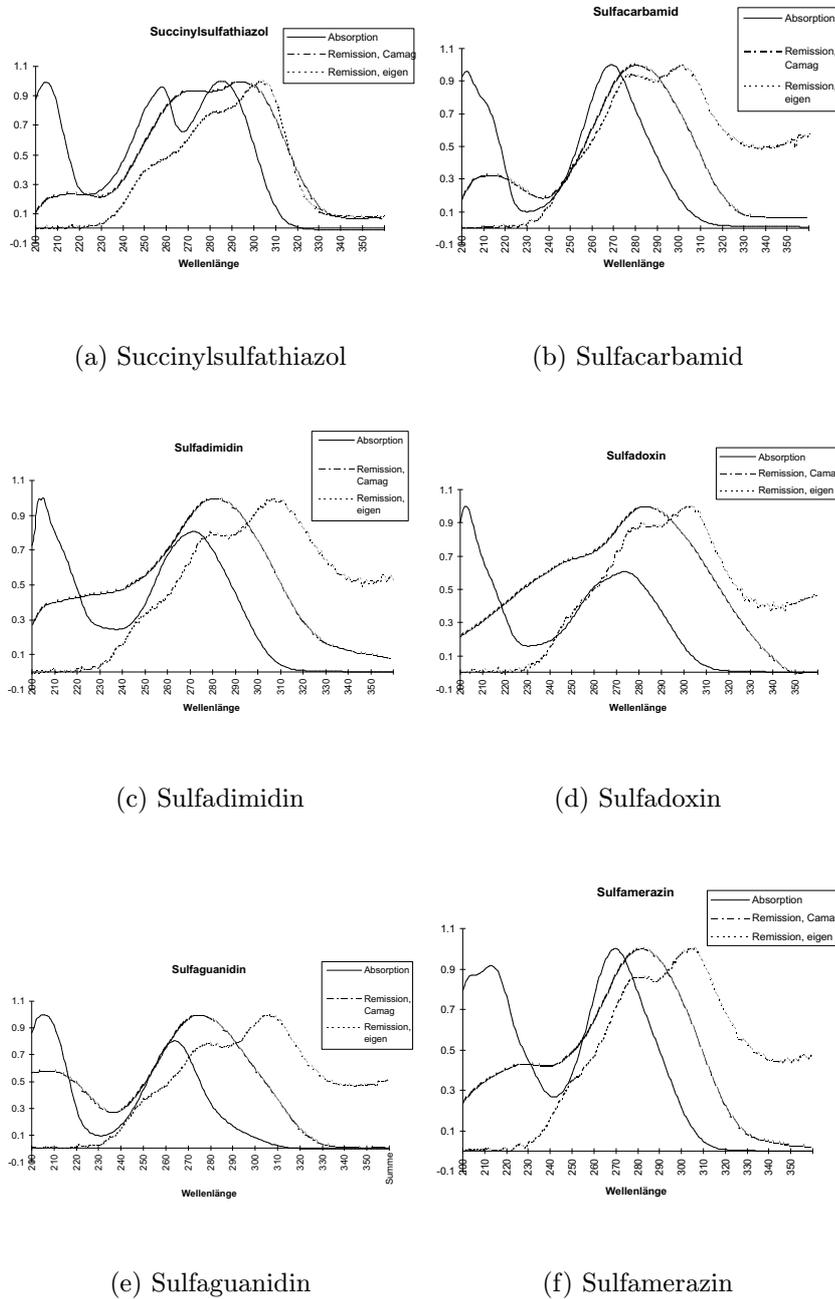
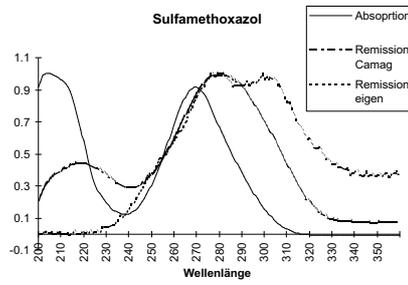
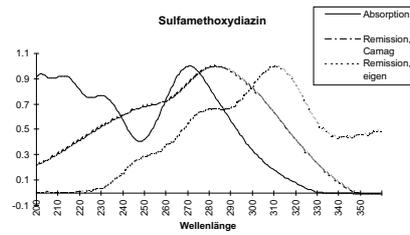


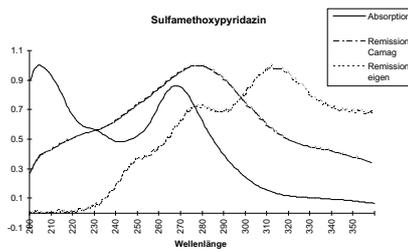
Abbildung 7.1: Sulfonamidspektren in unterschiedlichen Medien



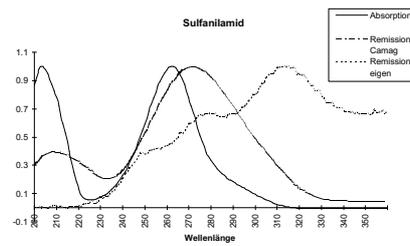
(g) Sulfamethoxazol



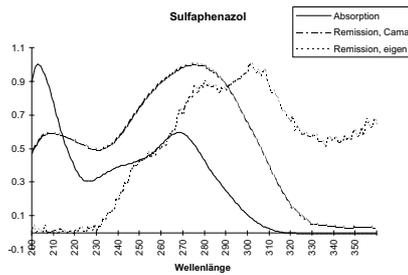
(h) Sulfamethoxydiazin



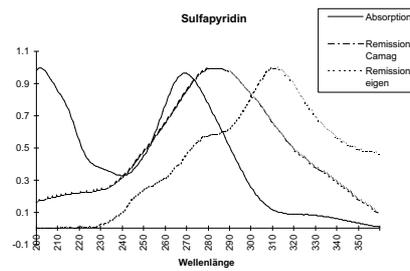
(i) Sulfamethoxypyridazin



(j) Sulfanilamid

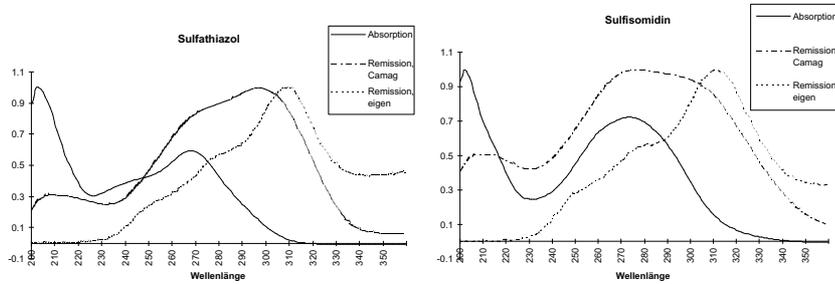


(k) Sulfaphenazol



(l) Sulfapyridin

Abbildung 7.1: Sulfonamidspektren in unterschiedlichen Medien (Forts.)



(m) Sulfathiazol

(n) Sulfisomidin

Abbildung 7.1: Sulfonamidspektren in unterschiedlichen Medien (Forts.)

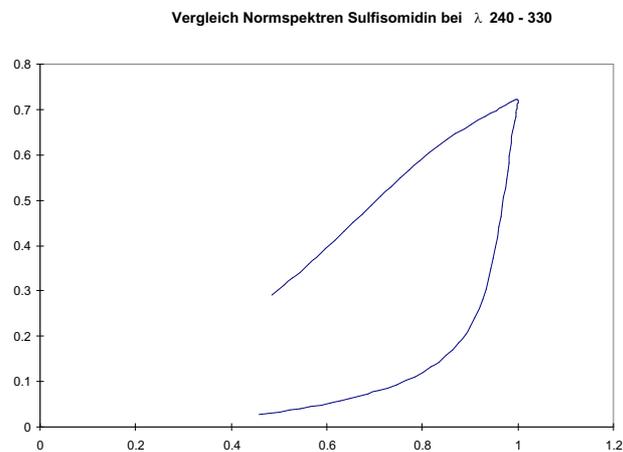


Abbildung 7.1: Normspektrenvergleich mittels linearer Regression an einem Beispiel

Kapitel 8

Auswertung der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie

8.1 Auftrageschema

Eines der Haupthindernisse bei der quantitativen Auswertung von 2D-DC-Platten war bisher die passende Anordnung der Untersuchungs- und der Referenzbahnen. Bei der eindimensionalen Variante unterliegen sowohl das zu trennende Gemisch als auch die Standards während der Entwicklung den gleichen Einflüssen. Daraus resultierende Veränderungen der Substanzen und der Fleckform betreffen alle Flecken. Zwar nimmt die Verbreiterung der Spots mit zunehmender Wanderungsstrecke zu, innerhalb eines gewissen Rahmens ist es dennoch möglich, auch unterschiedlich weit gewanderte Substanzen miteinander zu vergleichen. Bei der zweidimensionalen Entwicklung gehen diese Unterschiede im Quadrat in den Gesamtfehler ein und können so zu erheblichen Abweichungen führen.

Die Grundüberlegung bei der Entwicklung eines Schemas für die zweidimensionale DC ist also, für möglichst alle Flecken die gleichen Bedingungen

zu schaffen.

Mißt man mit einem herkömmlichen Gerät mit einem Lichtspalt den Substanzfleck, findet über die Breite des Spaltes eine Mittelwertbildung statt, die dazu führt, daß man trotz einer definierten Breite des Spaltes nur einen Meßwert zur Verfügung hat [30]. Die zu untersuchende Bahn wird einmal abgefahren und der Spalt dabei so positioniert, daß er genau durch den Fleckmittelpunkt geht. Gemessen wird lediglich die Peakhöhe. Die folgenden Bahnen werden parallel zur ersten in definierten Abständen angesteuert.

Sieht man sich ein typisches Chromatogramm an, so folgt es in seiner Form in etwa der bekannten Gaußkurve (Abbildung 8.1). In Wirklichkeit liegt der Peak nicht nur in zwei Dimensionen aufgespannt vor, sondern in drei. Die resultierende graphische Darstellung zeigt Abbildung 8.2 auf der nächsten Seite.

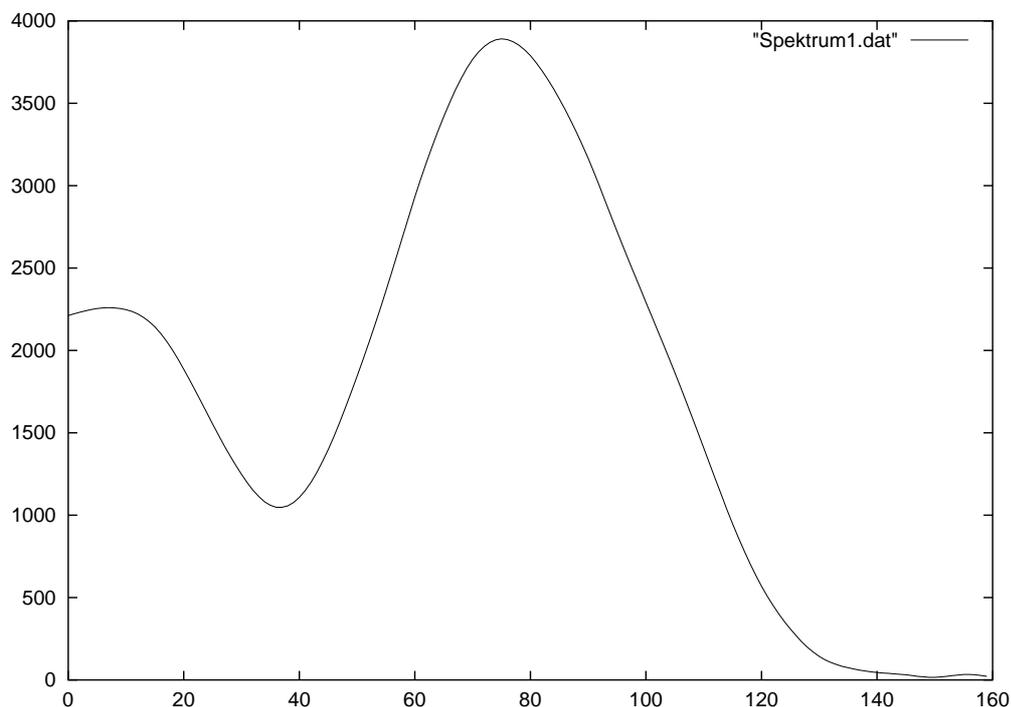


Abbildung 8.1: Typisches Chromatogramm eines Spaltscanners [Camag TLC-Scanner II]

Liegt nun ein Fleckschwerpunkt außerhalb der vorgegebenen Bahn, weil die Entwicklungsrichtung dieser Bahn z.B. nicht exakt senkrecht auf der Startlinie steht, wird dieser Fleck nicht im Mittelpunkt vermessen, sondern an der Flanke. Die Abweichung kann je nach Steilheit der Flanke bis zu 10 % betragen. Daher sollte versucht werden, bei jeder detektierten Substanz den Punkt der höchsten Konzentration zu bestimmen. Bereits in der frühen Phase der automatisierten DC wurde jeder Fleck einzeln angefahren und dann inkrementell versucht, den Fleckschwerpunkt zu bestimmen [21]. Obwohl diese Methode sehr genau ist, war sie zeitaufwändig und für die Geräte eine hohe Belastung.

Um möglichst gleiche Bedingungen für alle getrennten Substanzen zu schaffen, wurden folgende Überlegungen angestellt:

- Alle Substanzen müssen zweimal entwickelt werden.

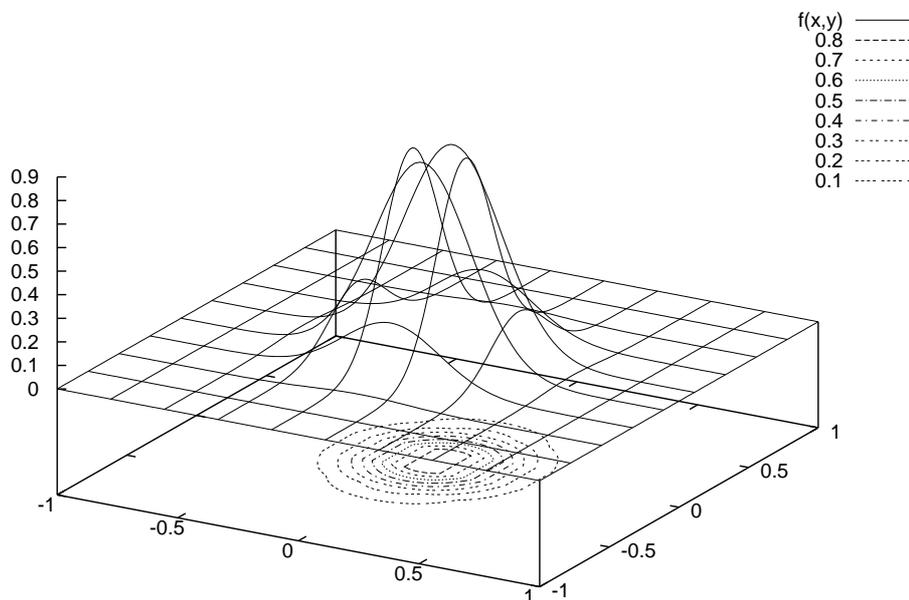


Abbildung 8.2: Tatsächliche Verteilung eines Substanzfleckes

- Für eine vernünftige Auswertung müssen mindestens drei verschieden konzentrierte Standard(gemische) auf *derselben* Platte mitentwickelt werden.
- Das zu untersuchende Gemisch sollte sich möglichst vollständig trennen.
- Die Standards sollten ebenfalls möglichst vollständig getrennt sein.
- Es soll eine einfache Zuordnung der Standards zu den Analyten möglich sein.

Um alle Punkte zu erfüllen und insbesondere mehrere Standards mitentwickeln zu können, wurde die zweidimensionale DC von zwei Seiten gewählt. Möglich wird dies durch die Verwendung 10 x 10 cm großer HPTLC-Platten, die ihre beste Trennleistung bereits nach 5 cm aufweisen. So wurde in einem Eck das zu untersuchende Gemisch, in den anderen Ecken die Standards aufgetragen. Um die vollständige Trennung der Standards zu erreichen und die Fleckzuordnung einfacher zu gestalten, wurden die Standards nach Vorversuchen in drei getrennten Gemischen aufgetragen. Die Gemische wurden jeweils so zusammengestellt, daß sich die R_f -Werte der enthaltenen Substanzen möglichst weit unterscheiden. Das genaue Auftrageschema sowie das Zwischenergebnis und das Endresultat der Entwicklung zeigt Abbildung 8.3 auf der nächsten Seite.

Statt nur einen Meßwert zur Bestimmung der Konzentration einer Substanz heranzuziehen, liegt die Verwendung eines Volumenintegrals der Substanzkurve nahe. Dies hat den Vorteil, daß die gesamte detektierbare Substanz in die Auswertung einbezogen wird, unabhängig von der genauen Laufrichtung und einer eventuellen schiefen Verteilung.

8.2 Entwicklung

Beispielhaft wird im Folgenden auf den Datensatz der Sulfonamide eingegangen. Wie Abbildung 8.3 zeigt, ist die Plattenoberfläche in hohem Maße ausgenutzt. Die Entwicklung erfolgt in einer Horizontalkammer, in der das Fließmittel von zwei gegenüberliegenden Seiten an die Platte gebracht werden kann. Kammersättigung brachte in Vorversuchen keinen nennenswerten Vorteil und wurde daher in der Arbeit nicht durchgeführt. Zu beachten ist lediglich die exakte horizontale Positionierung der Kammer, damit kein Fließmittel schief läuft und die Substanzen aus dem jeweiligen Auswertungsquadranten hinausgelangen. Die Auftragung erfolgte mit Hilfe eines Camag ATS III Auftragegerätes vollautomatisch. Im Free-Mode Betrieb erlaubt es die dazugehörige Software, jeden Punkt auf einer maximal 20 x 20 cm großen Fläche anzufahren und dort Substanzen aufzubringen. Aufgrund der Verbesserung der Trennung wurden die Untersuchungslösungen bandenförmig aufgetragen. Zur Vereinfachung der Spektrenzuordnung und der quantitativen Analyse nach der Entwicklung wurde in der selbst programmierten Software eine Schnittstelle zu den Camag-Konfigurationsdateien geschaffen.

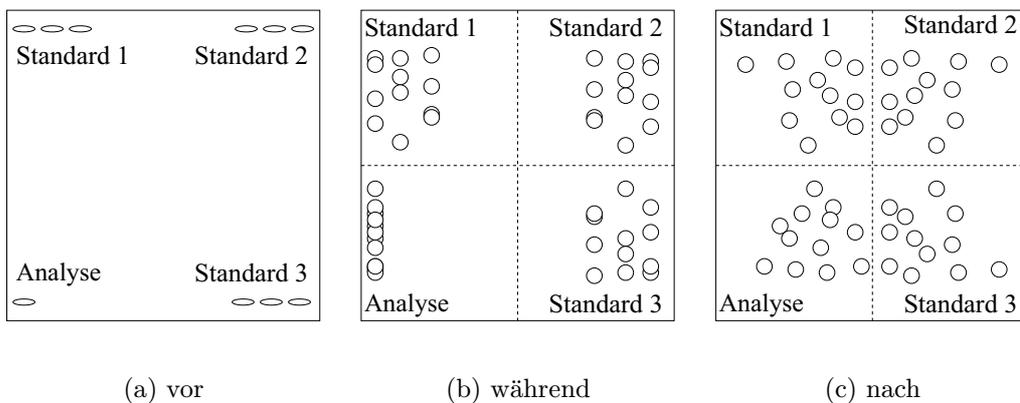


Abbildung 8.3: Phasen der Entwicklung bei der quantitativen 2D-DC

8.3 Fleckdetektion

Nach der zweidimensionalen Entwicklung der Platte wird die Oberfläche mit dem Scanner aufgenommen und die Daten werden zur weiteren Auswertung gespeichert. Vorgeschaltet werden Algorithmen zur Glättung, zur Basislinien- bzw. Basisflächenkorrektur und zur Detektion eines oder mehrerer Flecken.

8.3.1 Glättung der Rohdaten

Die Glättung kann auf verschiedene Arten erfolgen. Zu beachten ist, daß die geglätteten Daten die Originaldaten nicht verfälschen dürfen. Das bedeutet, daß die resultierenden Werte sowohl lage- als auch verhältnistreu sein müssen. Ein Verfahren, das schnell und einfach einsetzbar ist, das jedoch beide vorgenannten Kriterien nicht vollständig erfüllt, ist der gleitende Mittelwert (Gleichung (8.1)). Durch die Variation der Anzahl der miteinbezogenen Werte n , die um den zu glättenden Wert liegen, kann das Spektrum auf Kosten der Genauigkeit beliebig geglättet werden.

$$y_i = \frac{\sum_{j=-n}^n x_{i+j}}{2n+1} \quad (8.1)$$

Die meisten Glättungsverfahren, darunter auch das von Savitzky und Golay [32] mit den Modifikationen nach Bialkowski [4], Steinier [36], Madden [26] und Gorry [19], betrachten zweidimensional vorliegende Datensätze. Im Falle der zweidimensionalen DC mit einer Registrierung mehrerer Wellenlängen liegen die Daten jedoch mehrdimensional vor. Hier ist es von Vorteil, Verfahren zu verwenden, die zumindest die dritte Dimension bei der Glättung mit in Betracht ziehen. Verwendet wurde hier ein modifizierter Algorithmus nach [31]. Dieser beruht auf der Berechnung von Glättungsfaktoren für eine Regressionsoperation, die mit Hilfe eines Polynoms bestimmt werden (polynomial least-squares convolution, PLSC). Hierbei werden vor allem

Einflüsse aus den Rohdaten gefiltert, die im Vergleich zum Analysensignal hochfrequent vorliegen.

Die Regressionsfaktoren, die in [32] und den genannten Folgebeiträgen in Tabellenform veröffentlicht wurden, sind auf die zweidimensionale Anwendung nicht übertragbar. Darüberhinaus liegen sie statisch vor und müssen vor der Auswertung berechnet werden. Der hier verwendete Ansatz erlaubt die Berechnung der Glättungsfaktoren während der Auswertung und erlaubt so ein höheres Maß an Flexibilität. Ebenso kann die Breite der Glättung in beiden Dimensionen unabhängig voneinander gewählt werden.

Der Glättung liegt ein Polynom 3. Grades in zwei Dimensionen zugrunde (Gleichung (8.2)).

$$y = b_0 + \sum_{k=1}^3 a_k x^k + \sum_{k=1}^3 c_k z^k \quad (8.2)$$

Wendet man hierauf eine lineare Regression an, so ergibt sich für die Summe der quadrierten Abweichungen (SS) Gleichung (8.3).

$$SS = \sum_{t=-n}^n \sum_{s=-m}^m \left(y - b_0 - \sum_{k=1}^3 a_k x^k - \sum_{k=1}^3 c_k z^k \right)^2 \quad (8.3)$$

Mit: n – halbe Glättungsbreite in der ersten Dimension

m – halbe Glättungsbreite in der zweiten Dimension

In einer Dimension gibt m den absoluten Wert der Glättungsgrenze an, so daß sich die gesamte Glättung auf $2m+1$ Werte erstreckt. s ist der Index des in die Glättung miteinbezogenen Wertes und läuft von $-m$ bis m . Analog gilt dies für n und t in der anderen Dimension.

Der geglättete Wert berechnet sich wie folgt:

- Das Rohdatum wird mit jedem Wert der Matrix $s \times t$ multipliziert und die Einzelergebnisse aufsummiert.

- Die Werte der Matrix berechnen sich nach Gleichung (8.4), die erhalten wird, wenn man Gleichung (8.3) auf der vorherigen Seite ableitet und die Ableitung 0 setzt.
- Anschließend wird die Summe der Einzelergebnisse durch Gleichung (8.5) geteilt.

$$N(s, t) = -15(Qt^2 + Rs^2) + 9(3m^2 + 3m - 1)(3n^2 + 3n - 1) - 25m(m + 1)n(n + 1) \quad (8.4)$$

$$D = (2m + 1)R(2n + 1)Q \quad (8.5)$$

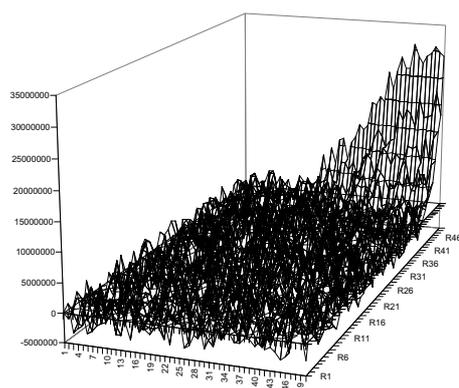
Mit: $R - (2n - 1)(2m + 3)$

$Q - (2m - 1)(2m + 3)$

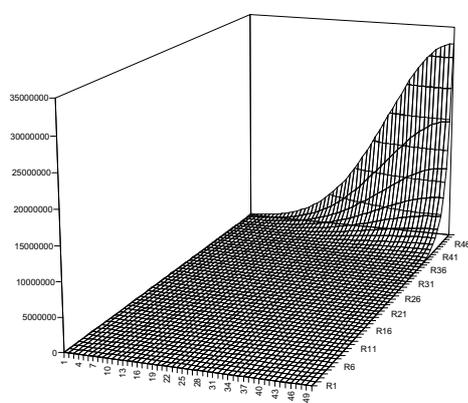
Der Wahl der Glättungsbreite in jeder Dimension kommt auch hier große Bedeutung zu. Es muß ein Kompromiß eingegangen werden zwischen möglichst rauschfreien Daten und möglichst geringer Peakveränderung. Ein Beispiel für die Glättung an einer Peakflanke bis zum Maximum zeigt Abbildung 8.4 auf der nächsten Seite.

8.3.2 Basislinienkorrektur

Bei allen chromatographischen und spektroskopischen Verfahren existiert ein Wert an einer Stelle, an der gesichert keine Substanz vorliegt, der aber ungleich Null ist. Man spricht hier von Hintergrund, Untergrund oder Blindwert. Die Ursachen für diesen Wert sind multifaktoriell und können zum Beispiel von einer Eigenabsorption des Trägermaterials, Verunreinigungen im Fließmittel oder vom Dunkelstrom im Photomultiplier bzw. im Photodiodenarray kommen. Dieser Blindwert muß vor einer Auswertung herausgerechnet werden, da er sonst zu systematisch falschen Ergebnissen führen würde.



(a) verrauschter Peak



(b) Peak nach Glättung

Abbildung 8.4: Darstellung der Glättung nach 2D-PLSC

Im Fall der Dünnschichtchromatographie beobachtet man oft eine ansteigende Basislinie, die von einer Entmischung des Fließmittels herrührt. In kommerziell erhältlichen Geräten zur Quantifizierung werden zwei Wege zur Bestimmung des Blindwertes gewählt.

- An einer substanzfreien Stelle, die aber mitentwickelt wurde, wird ein Nullabgleich des Detektors durchgeführt. Dieser Wert wird dann von den Meßwerten abgezogen.
- Bei einem Zweistrahlprinzip wird permanent auf einer Bahn neben dem Meßpunkt ein Wert bestimmt, der dann vom Meßwert abgezogen wird. Hier kann man Schwankungen im Lichtstrom der Lampe berücksichtigen. Matrixeinflüsse der stationären Phase werden jedoch auch hier außer Acht gelassen.

Durch das Scannen der gesamten Oberfläche hat man jetzt die Möglichkeit, die unmittelbar um den Fleck liegenden Punkte zur Bestimmung einer Basisfläche heranzuziehen, die dann von der eigentlichen Fleckmatrix subtrahiert werden kann. Dazu werden die vier Eckpunkte eines beliebigen Rechtecks, das möglichst nah an den Peakrändern liegen soll, diese aber nicht schneiden darf, bestimmt und mit Hilfe einer bilinearen Interpolation eine Fläche berechnet. Diese Fläche läßt sich durch folgende bilineare Gleichung beschreiben:

$$f(x, y) = ax + by + cxy + d \quad (8.6)$$

Zur Lösung dieser Gleichung werden die oben bestimmten Eckwerte eingesetzt. Abbildung 8.5 auf der nächsten Seite zeigt das Vorgehen bei der Interpolation. Hier wurde zur Vereinfachung als Basis das Einheitsquadrat gewählt.

Die Vorgehensweise zur Berechnung der Koeffizienten umfaßt vier Schritte. Zunächst wird zwischen den beiden oberen Punkten linear interpoliert. Daraus erhält man

$$f(x, 0) = f(0, 0) + x[f(1, 0) - f(0, 0)] \quad (8.7)$$

Analog wird zwischen den beiden unteren Punkten vorgegangen:

$$f(x, 1) = f(0, 1) + x[f(1, 1) - f(0, 1)] \quad (8.8)$$

Anschließend wird senkrecht interpoliert. Als Ergebnis erhält man:

$$f(x, y) = f(x, 0) + y[f(x, 1) - f(x, 0)] \quad (8.9)$$

Einsetzen von Gleichung (8.7) und Gleichung (8.8) in Gleichung (8.9) und Zusammenfassen führt zu folgender Gleichung zur Berechnung des Korrekturwertes an der Stelle (x, y) :

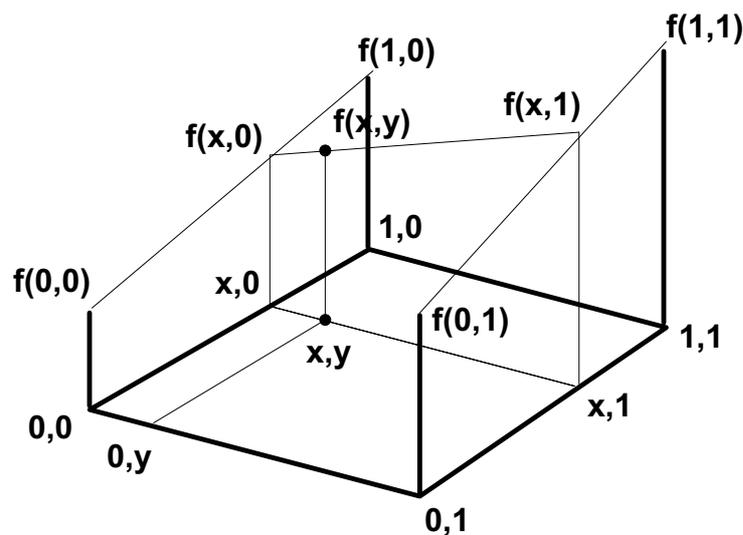


Abbildung 8.5: Bilineare Interpolation

$$\begin{aligned}
f(x, y) &= [f(1, 0) - f(0, 0)] \cdot x \\
&+ [f(0, 1) - f(0, 0)] \cdot y \\
&+ [f(1, 1) + f(0, 0) - f(0, 1) - f(1, 0)] \cdot xy + f(0, 0)
\end{aligned} \tag{8.10}$$

Subtrahiert man die so erhaltene Basisfläche von der Peakmatrix, erkennt man idealerweise nur noch den reinen Peak. Es kann jedoch vorkommen, daß um den Peak verstreut noch einzelne Reste des Rauschens zu finden sind, die zufällig über den Werten der Basisfläche liegen. Grund hierfür ist die Einbeziehung eines einzelnen Eckpunktes zur Berechnung der Korrektorebene. Ersetzt man den singularen Wert durch den Mittelwert von n Werten nach Gleichung (8.11), so treten diese Verfälschungen nicht mehr auf.

$$y = \frac{\sum_{i,j=1}^n x_{i,j}}{n^2} \tag{8.11}$$

Zu beachten ist, daß bei einer falsch gewählten Korrektur der Basisfläche ein verhältnismäßig großer Fehler resultiert, da der Verlust an Volumen an der Basis besonders hoch ist. [25] hat den Flächenverlust A_t für einen Gaußpeak der Höhe H angegeben, dessen Basislinie in der Höhe a angesetzt wurde. Es gilt $0 \leq a \leq H$.

$$A_t = \left[\operatorname{erfc} \left(2 \ln \frac{H}{a} \right)^{\frac{1}{2}} + \frac{a}{H} \left(\frac{1}{\pi} \ln \frac{H}{a} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \tag{8.12}$$

Betrachtet man einen dreidimensionalen Gaußpeak mit der Höhe $H = H_0$ und den Halbwertsbreiten σ_x bzw. σ_y in den beiden Raumrichtungen, so wird dieser Peak durch Gleichung (8.13) beschrieben.

$$f(x, y) = H_0 \cdot \exp \left\{ -\frac{x^2}{2\sigma_x^2} - \frac{y^2}{2\sigma_y^2} \right\} \tag{8.13}$$

Daraus errechnet sich das Volumen zu

$$V_{\infty} = 2\pi H_0 \sigma_x \sigma_y \quad (8.14)$$

Für den Schwellenwert b gelte $0 \leq b \leq H_0$. Die Kurve, die sich ergibt, wenn der Gaußpeak in Gleichung (8.13) auf der vorherigen Seite die konstante Fläche $f(x, y) = b = \text{const.}$ schneidet, wird beschrieben durch:

$$b = H_0 \cdot \exp \left\{ -\frac{x^2}{2\sigma_x^2} - \frac{y^2}{2\sigma_y^2} \right\} \quad (8.15)$$

Gleichung (8.15) kann umgeformt werden zu

$$\begin{aligned} \ln \left(\frac{b}{H_0} \right) &= -\frac{x^2}{2\sigma_x^2} - \frac{y^2}{2\sigma_y^2} \\ 1 &= \frac{x^2}{2\sigma_x^2 \ln \frac{H_0}{b}} + \frac{y^2}{2\sigma_y^2 \ln \frac{H_0}{b}} \end{aligned} \quad (8.16)$$

Gleichung (8.16) ist eine Ellipsengleichung, deren allgemeine Form durch Gleichung (8.17) beschrieben wird und deren Fläche sich nach Gleichung (8.18) berechnet.

$$1 = \frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} \quad (8.17)$$

$$F_{\text{Ellipse}} = \pi \cdot a \cdot b \quad (8.18)$$

Einsetzen der Parameter von Gleichung (8.16) in Gleichung (8.18) führt zu Gleichung (8.19).

$$F = 2\pi \sigma_x \sigma_y \ln \left(\frac{H_0}{b} \right) \quad (8.19)$$

Das Peakvolumen zwischen dem oben eingeführten Schwellenwert b und der Höhe H_0 ergibt sich aus dem Integral von Gleichung (8.19) auf der vorherigen Seite in den Grenzen b und H_0 :

$$V_b^{H_0} = \int_b^{H_0} 2\pi\sigma_x\sigma_y \ln\left(\frac{H_0}{b}\right) dH_0 \quad (8.20)$$

Lösen des Integrals und Umformen ergibt:

$$V_b^{H_0} = 2\pi\sigma_x\sigma_y \left[b \ln \frac{b}{H_0} + (H_0 - b) \right] \quad (8.21)$$

Der prozentuale Volumenfehler, der sich nach Gleichung (8.22) berechnet,

$$V_{err} = \frac{V_\infty - V_b^{H_0}}{V_\infty} \quad (8.22)$$

ergibt sich somit für den dreidimensionalen Gaußpeak zu:

$$V_{err} = \frac{b}{H_0} \cdot \left[1 - \ln \frac{b}{H_0} \right] \cdot 100 \quad (8.23)$$

Man erkennt, daß die Halbwertsbreiten beim Bestimmen des prozentualen Volumenfehlers keine Rolle spielen. Der Fehler ist nur abhängig vom Verhältnis $\frac{b}{H_0}$. Dieser Quotient wiederum ist der Kehrwert des Signal-Rausch-Verhältnisses.

In Abbildung 8.6 auf der nächsten Seite erkennt man die praktische Bedeutung von Gleichung (8.23): Bereits ein kleiner Fehler bei der Bestimmung der Peakbasis führt zu einem großen Fehler im zu bestimmenden Peakvolumen. Daher kommt der Bestimmung der Peakbasis bei der Auswertung dreidimensionaler Gaußpeaks eine noch größere Rolle zu als bei der Auswertung zweidimensionaler Daten.

Der zweite Schritt dient der Detektion eines oder mehrerer Flecken. Dazu müssen Kriterien festgelegt werden, nach denen eine Zuordnung des einzelnen Signals entweder zum Hintergrund oder zum Fleck vorgenommen werden kann. Üblicherweise wird hier der sog. threshold (Schwellenwert) im Voraus festgelegt, anhand dessen die Zugehörigkeit errechnet wird. Als einfachstes Mittel nimmt man hier die Signaländerung im Vergleich zum vorangegangenen Wert. Überschreitet diese Änderung den eingestellten threshold, so werden dieser und die folgenden Werte einem Peak zugeordnet, ansonsten werden sie als Hintergrund verworfen. Um das Rauschen unberücksichtigt zu lassen, beginnt man mit der Detektion erst dann, wenn sich mehrere Werte hintereinander über dem Schwellenwert befinden. Ebenso kann man jede Änderung der Steigung über einen bestimmten Wert hinaus als Peakanfang interpretieren und kleine Peaks, deren Flächen bzw. Volumina unterhalb eines Schwellenwertes liegen, dem Rauschen zuordnen. Probleme treten häufig bei Matrixeinflüssen oder Peakanomalien auf. [33] beschreibt hierfür eine Methode, in der versucht wird, das menschliche Beurteilungsvermögen nachzuahmen und so zu validierbaren Ergebnissen zu kommen. Verwendet werden glättende kubische Spline-Funktionen.

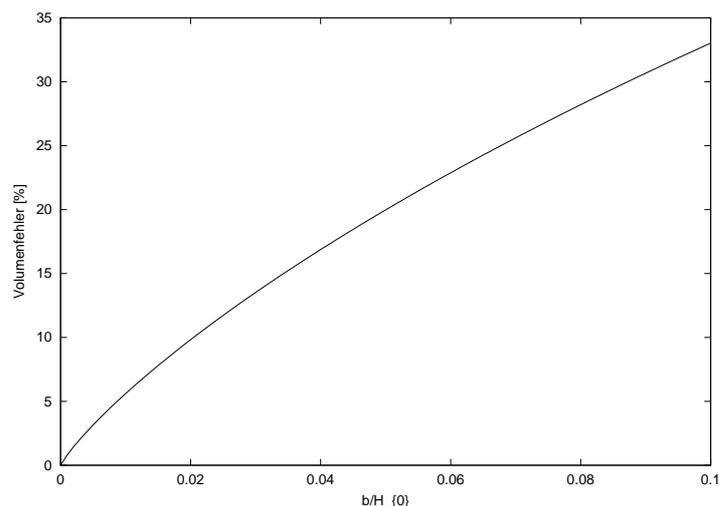


Abbildung 8.6: Einfluß des Fehlers bei der Basisbestimmung auf den Volumenfehler

8.4 Fleckzuordnung

Nach der zweidimensionalen Entwicklung kann man die Spektren der einzelnen Substanzflecken der Analyse mit den Spektren der Referenzflecken vergleichen. Hierbei finden ähnliche Methoden wie beim Spektrenvergleich in Lösung Anwendung (Abschnitt 7.1 auf S. 54). Zu beachten ist, daß die Abweichungen der Meßwerte von der Regressionsfunktion (im Falle einer Ausgleichsrechnung) bei Remissionsspektren deutlich höher sein können als bei Absorptionsspektren in klarer Lösung. Wie beschrieben, sind die üblichen Algorithmen zum Peakvergleich nicht uneingeschränkt einsetzbar. Lediglich eine Annäherung ist möglich. Daher ist es unerlässlich, die Referenzsubstanzen auf der gleichen Platte unter den gleichen chromatographischen Bedingungen mitzuentwickeln. Auch eine automatisierte Auswertung dieser identisch bearbeiteten Substanzen ist nur mit großen Fehlerwahrscheinlichkeiten möglich und daher im Routineeinsatz nicht zu gebrauchen. Eine visuelle Kontrolle durch den Betrachter ist unerlässlich. Zwei typische Chromatogramme nach Transformation nach Kubelka/Munk und Glättung mit PLSC (Abschnitt 8.3.1 auf S. 72) zeigt Abbildung 8.7 auf der nächsten Seite.

Man erkennt die polaren Verunreinigungen im Fließmittel an der Startfront und eine kleine Verunreinigung vor dem eigentlichen Substanzpeak.

Die zweidimensionale Projektion der dreidimensionalen Sulfonamidpeaks zeigt Abbildung 8.8 auf S. 84.

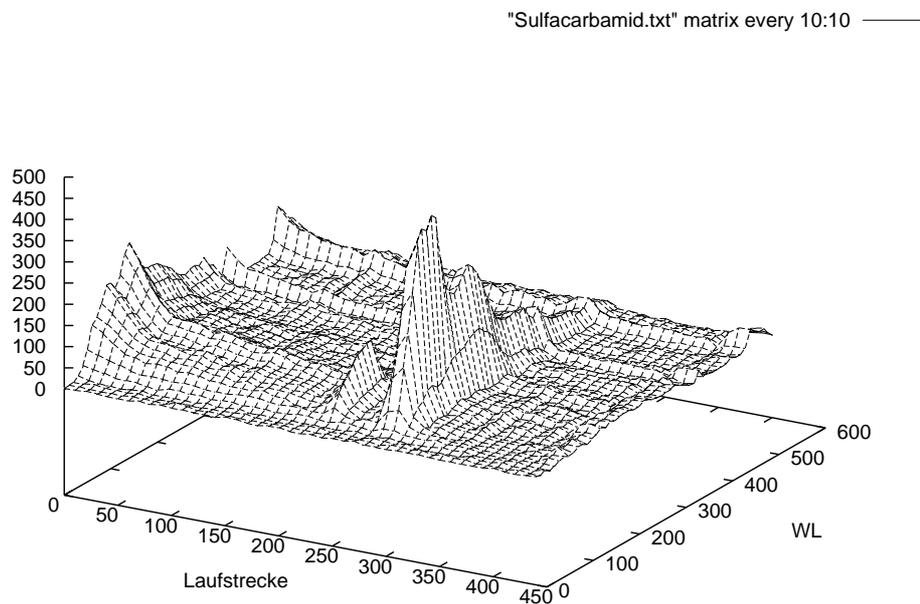
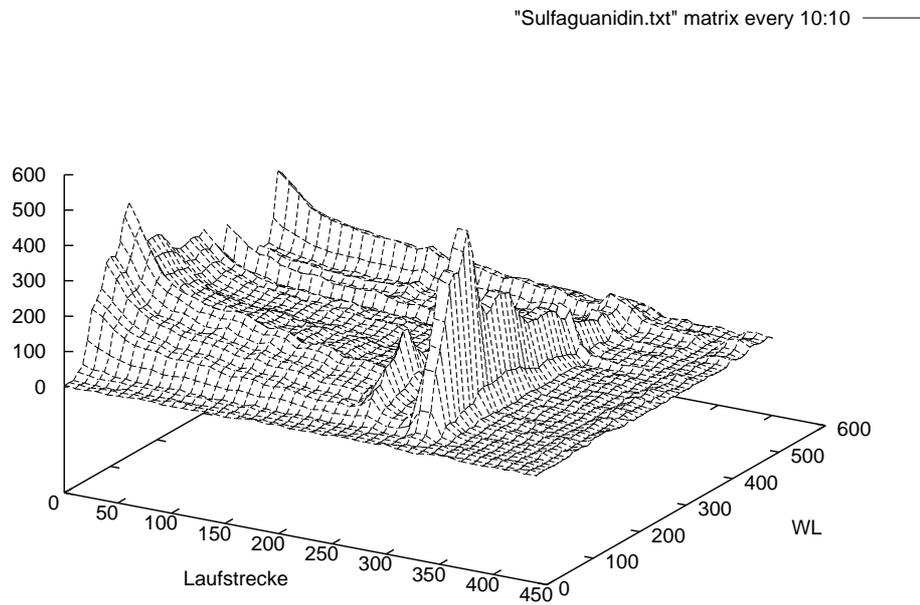
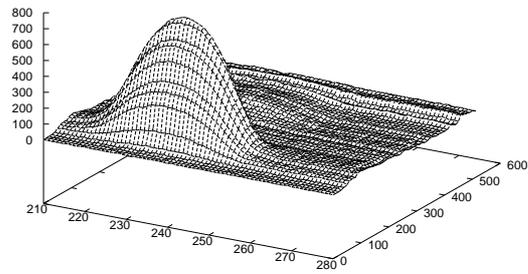
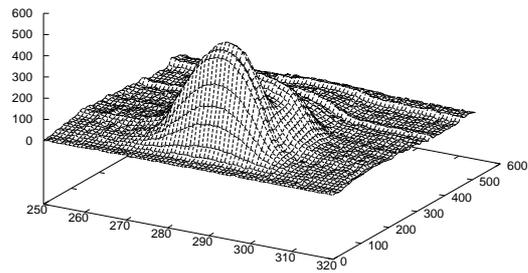


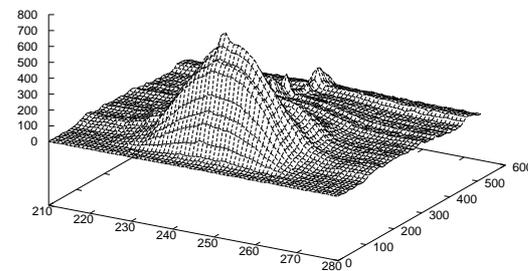
Abbildung 8.7: Chromatogramme nach der Entwicklung



(a) Succinylsulfathiazol

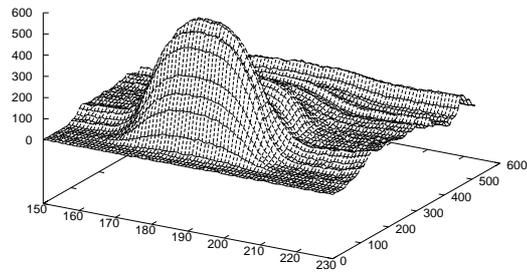


(b) Sulfacarbamid

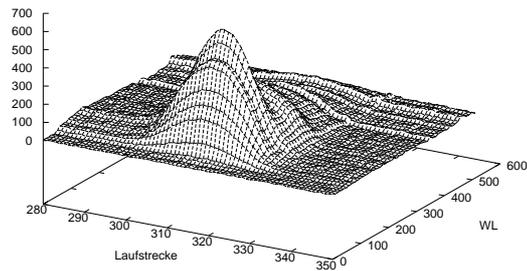


(c) Sulfadimidin

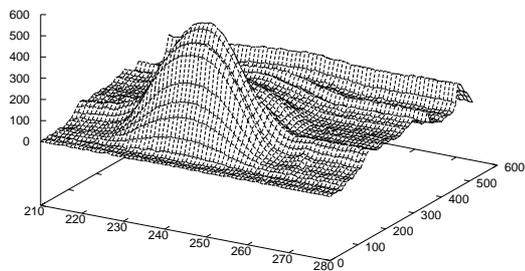
Abbildung 8.8: Sulfonamidpeaks nach der Entwicklung



(d) Sulfadoxin

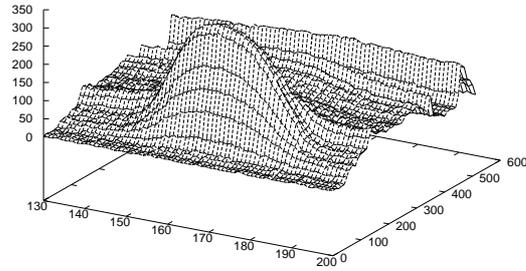


(e) Sulfaguanidin

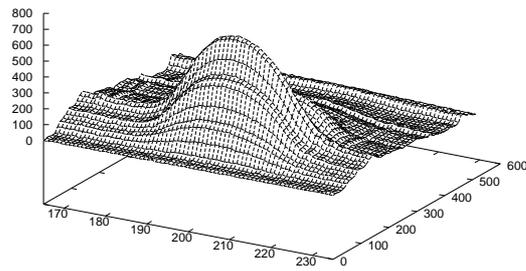


(f) Sulfamerazin

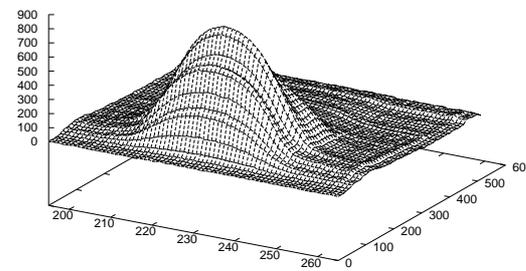
Abbildung 8.8: Sulfonamidpeaks nach der Entwicklung (Forts.)



(g) Sulfamethoxazol

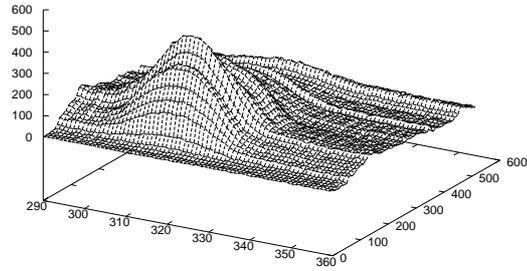


(h) Sulfamethoxydiazin

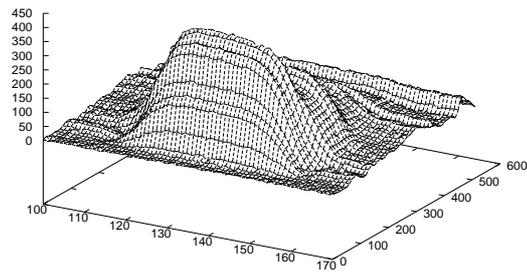


(i) Sulfamethoxypyridazin

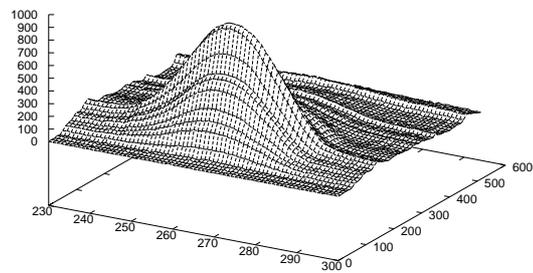
Abbildung 8.8: Sulfonamidpeaks nach der Entwicklung (Forts.)



(j) Sulfanilamid

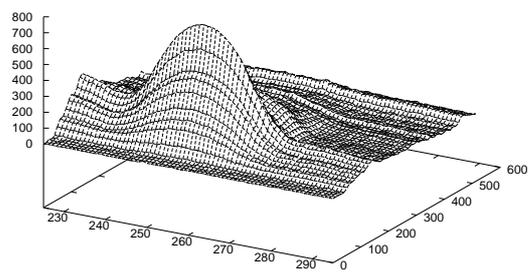


(k) Sulfaphenazol

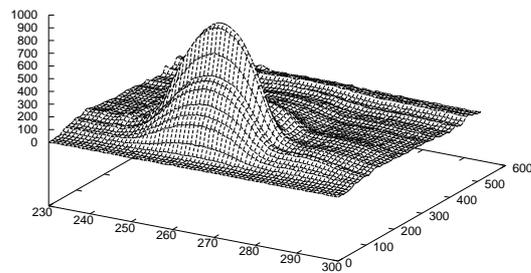


(l) Sulfapyridin

Abbildung 8.8: Sulfonamidpeaks nach der Entwicklung (Forts.)



(m) Sulfathiazol



(n) Sulfisomidin

Abbildung 8.8: Sulfonamidpeaks nach der Entwicklung (Forts.)

Kapitel 9

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie. Bisher gab es keine Möglichkeit, Dünnschichtchromatogramme, die in zwei aufeinander senkrecht stehenden Richtungen entwickelt wurden, komfortabel auszuwerten. Es war Ziel der Arbeit, einen Scanner zu entwickeln, der die Plattenoberfläche ganz aufnimmt und dabei nicht nur eine, sondern eine Vielzahl von Wellenlängen benutzt.

In Kapitel 3 wird auf die Grundlagen der Dünnschichtchromatographie eingegangen. Die Trennmethode wird vorgestellt und das Trennprinzip erläutert. Die verwendeten Materialien werden aufgezeigt. Darüberhinaus werden die Vorgehensweisen der quantitativen Auswertung gegenübergestellt und bewertet. Besonders behandelt werden die nichtlinearen Regressionsmethoden, die in der Dünnschichtchromatographie eine große Rolle spielen. Die in dieser Arbeit verwendete Entwicklungstechnik wird erklärt und die Vorteile beschrieben.

Die Substanzen, mit denen modellhaft gearbeitet wurde, werden in Kapitel 4 vorgestellt, ihre Struktur gezeigt und das verwendete Trennsystem und die Trennbedingungen angegeben.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Scanner und die dazugehörige Software werden in den folgenden Kapiteln (Kapitel 5 und 6) vorgestellt. Als

Lichtquelle dient eine 30 W Deuteriumlampe, die ohne Sperrfilter betrieben wird. Dies ermöglicht die Verwendung von Licht auch im Bereich von 198–210 nm. Auf einen Betrieb der Lichtquelle im Vakuum wurde verzichtet. Die Einblendtechnik der Lichtstrahlen in den Lichtwellenleiter wurde nicht verändert.

Der bewegliche Teil des Scanners besteht aus einem Kreuztisch, dessen Vorschubeinheiten um 90° versetzt angebracht wurden, um die Platte in x- und in y-Richtung bewegen zu können. Die Wahl der Spindelsteigung ermöglicht eine Schrittweite von 0.1 mm im Bedarfsfall. Jede Vorschubeinheit wird durch eine eigene Steuerkarte angesprochen. Damit kann in beide Richtungen unabhängig voneinander verfahren werden. Durch die räumliche Nähe von Steuerkarte und Detektor kann es zu Störungen der Spektrenaufnahme kommen. Daher wurde in die jeweilige Stromversorgung der Einheiten ein 10000 μF Elektrolyt-Kondensator eingebaut, der einen Großteil der spannungsabhängigen Störung herausfiltert. Die Vorschubgeschwindigkeit ist in zwei Stufen wählbar, um einerseits größere Strecken schnell überbrücken, andererseits exakte Positionierungen möglichst schwingungsfrei durchführen zu können.

Um den Intensitätsverlust bei der Lichtübertragung gering zu halten und einen modularen Aufbau realisieren zu können, wurde als Übertragungsmedium zwischen Lampe und Platte ein Lichtleiter gewählt. Dieser ist in der Lage, sowohl eine als auch mehrere Wellenlängen zu übertragen. Probleme bereiten bei normalen Lichtwellenleitern die Alterung und damit „Erblindung“ der Faser durch die Induktion von Farbzentren, die durch energiereiches Licht im unteren UV-Bereich hervorgerufen werden. Durch den Einsatz eines optimierten Faserbündels, das mit H_2 begast wurde, um die Bildung der Farbzentren zu verhindern, kann die Alterung stark verlangsamt werden. Die Dämpfung der Lichtintensität innerhalb der Faser spielt durch die Verwendung von Fasern, die kürzer als 75 cm sind, nur eine untergeordnete Rolle.

Als Detektionseinheit werden Photodiodenarrays verwendet, die 256 bzw.

512 Dioden besitzen. Dadurch hat man einen maximalen Meßbereich von 190 bis 735 nm. Eingebaut wird jeweils nur das vorjustierte Array, das auf eine Platine aufgebracht ist, die die Elektronik zum Auslesen sowie die Möglichkeit zur Ansteuerung des Auslesevorganges bereits enthält. Die Minimalkonfiguration erlaubt das Verwenden eigener, für den Einsatzzweck optimierter Bauteile.

Die erstellte Software (Kapitel 6) verarbeitet die registrierten Daten und ordnet die Signale den entsprechenden Wellenlängen zu. Die Rohdaten werden nach der bekannten Gleichung von Kubelka und Munk in Remissionswerte umgerechnet. Ein neues Verfahren zur Glättung von zweidimensional verrauschten Daten wird eingeführt, mit Hilfe dessen die Signale in eine verwertbare Form übergeführt werden. Hierzu wird eine Regressionsrechnung in zwei Dimensionen mittels eines Polynoms durchgeführt. Die Glättungsbreite kann variabel für beide Dimensionen bestimmt werden. Die Faltungsoperation kann im Gegensatz zu bisher bekannten Verfahren auch während der Auswertung durchgeführt werden. Statische Faltungsoperatoren werden nicht mehr benötigt.

Peaks werden gesucht und ihre Lage mit Hilfe einer Basisfläche korrigiert. Diese Fläche berücksichtigt Matrixeinflüsse der Platte, Schwankungen im Lichtstrom der Lampe und Änderungen der mobilen Phase, die zum Beispiel durch Entmischen des Fließmittels auftreten können. Die transformierten und geglätteten Daten werden in zwei Dateien geschrieben, die sich nur in der Art der Speicherung unterscheiden, um sie mit Fremdprogrammen weiterverarbeiten zu können.

In Kapitel 7 wird die Möglichkeit untersucht, Remissionsspektren unterschiedlicher Herkunft und UV-Spektren miteinander zu vergleichen. Um auf umfangreiche existierende UV-Spektrenkataloge zurückgreifen zu können, wird eine Möglichkeit gesucht, mit deren Hilfe die Remissionsspektren UV-Spektren zugeordnet werden können. Ein automatisiertes Vorgehen alleine reicht nicht aus, der Eingriff des Benutzers ist unerlässlich. Bei Remissionsdaten findet eine nicht reproduzierbare Verschiebung der Wellenlängen statt,

die ein direktes Inbezugsetzen verhindert.

In Kapitel 8 wird die Auswertung zweidimensional entwickelter DC-Platten beschrieben. Es wird ein Auftrageschema vorgestellt, das auch für quantitative Analysen anwendbar ist. Zusätzlich zu dem zu untersuchenden Gemisch werden drei Standardgemische bekannter Konzentration und Zusammensetzung aufgetragen. Die erste Entwicklung erfolgt von gegenüberliegenden Seiten bis zur Mitte der Platte, nach Trocknen und Drehen um 90° wird die zweite Entwicklung ebenfalls beidseitig durchgeführt. So wird die Plattenoberfläche optimal ausgenutzt und die Kriterien zur quantitativen Auswertung werden erfüllt. Die Leistungsfähigkeit des neu eingeführten Glättungsalgorithmus wird gezeigt. Auf die Besonderheiten einer Auswertung anhand des Peakvolumen und nicht wie bisher anhand der Peakfläche wird eingegangen. Ein Datensatz von aufgenommenen Spektren wird nach der Verarbeitung gezeigt.

Das entwickelte System aus Hard- und Software ist in der Lage, jeden Punkt auf der Platte anzusteuern und Daten zur weiteren Auswertung in genügend hoher Genauigkeit zu liefern. Eine vollautomatische Auswertung zweidimensional entwickelter DC-Platten ist jedoch nicht möglich. Die Kontrolle durch einen Benutzer bleibt Voraussetzung für eine sichere Weiterverarbeitung. Zur sicheren quantitativen Bestimmung über ein Volumenintegral stehen noch keine leistungsfähigen Lichtleiter mit genügend geringen Abmessungen zur Verfügung.

Kapitel 10

Summary

The presented thesis deals with two-dimensional thin-layer chromatography. Up to now, there were no ways of easy evaluating thin-layer chromatograms that have been developed in two perpendicular directions. It was the goal of this thesis to develop a scanner that records the whole surface and uses not only one but consecutive wavelengths that represent a UV-spectra.

In chapter 3 the basics of thin-layer chromatography are covered. The separation method is described and the separation principles are laid out. Normally used material is presented. Known quantitation methods are compared and evaluated with respect to non-linear regression methods. These play a prominent role in thin-layer chromatography. The developing method used in this work is described and the advantages are shown.

Exemplarily used substances are presented in chapter (4). Their structure, the separation system and the separation method are pointed out.

The scanner and software developed in this thesis are described in the following chapters (chapter 5 and 6). As a light emitting source a deuterium lamp was used that is operated without a limiting filter, allowing usage of light below 210 nm down to 198 nm. The operation of the lamp in vacuum is rejected. The connection of the lamp to the used optic fibre is not altered.

The movable parts of the scanner consist of two motor-driven plates that

run perpendicular to each other making movement in both x- and y-direction possible. The created system allows single steps down to 0.1 mm if necessary. Each moving plate is addressed by its own controller making independent movement in both directions possible. The closeness of controller and detector evokes disturbances in spectra recording. Therefore, the power supply of each controller is equipped with a 10000 μF electrolyte condensator. This suppresses most of the voltage-dependent noise. The speed of the moving plates is switchable in two steps, one of those being fast enough to bridge long distances, the other being precisely enough to position in a least oscillating way.

In order to minimize the loss of intensity while transmitting the UV light and to realize a modular construction, fibre optics were used between TLC-plate and lamp. The fibre is capable of transmitting single or multiple wavelengths, respectively. Problems arising by aging of the optical fibres through induction of E'-centers by transmitting UV-light in the range below 215 nm and hence increasing attenuation are met by using optimized fibres. Optimization is done by treating the fibre in a H_2 -atmosphere. This leads to the reduction of E'-centers and improvement of the lifetime-stability of the fibre optics. Normal attenuation plays a minor role because of the limited lengths of the optics.

A photodiodearray consisting 256 and 512 diodes, respectively, is used as a detection unit leading to a usable UV-range between 190 and 735 nm. Implemented is only the readily adjusted array fixed to a small controller. The controller offers the electronics for reading the array and for synchronizing the reading cycles. This minimum configuration allows the further usage of parts that are specialized for the required scanning process.

The programmed software (chapter 6) evaluates the registered data and sorts the signals to the corresponding wavelengths. Raw data is transformed to remission data by using the known equation of Kubelka and Munk. A new method of smoothing two-dimensional scattered data is introduced. It is done by a regression in two dimensions using a polynom. The smoothing

width can be varied for each direction independently. This convolution can be carried out during evaluating the data whereas known methods have to determine the convolution integers in advance. Static convolution integers are not needed any more.

Peaks are searched and their shape is stripped by using not only baseline but a basearea correction. This is done for correcting influences of the matrix, disturbances in the lightstream, and change of the mobile phase due to decomposition of the eluent mixture. Transformed and smoothed data are written in two files differing only by ways of storing data. A plain-text file is produced for importing the data into commercially available software.

In chapter 7 it is examined whether remission spectra of different sources and UV-spectra are comparable. In order to use existing UV-databases, a way of pairing remission and corresponding UV data is searched. An automatic approach is not sufficient, correction by the user is mandatory. In recording remission data, a non-reproducible shift of wavelengths is observed that prevents the direct comparing.

In chapter 8 the evaluation of two-dimensional developed TLC-plates is described. A spotting scheme is presented that is usable for quantitative analysis. In addition to the examined mixture, three standards of known compounds and concentrations are transferred to the plate as well. The first development is carried out from opposing sides to the middle of the plate. After drying and switching 90° the second development is done from opposing sides also. This is done for using the surface optimally and meeting the requirements for quantitative evaluation. The power of the presented smoothing algorithm is shown. The specialities of evaluating the peak-volume instead of only the peak-area are dealt with. A dataset of recorded spectra is shown after evaluating.

The developed system consisting of hard- and software is capable of moving to every point of the plate-surface and recording data for further evaluation in sufficient precision. A fully automatic evaluation of two-dimensional

developed TLC-plates is not possible. Visual control carried out by a user is crucial for further calculations. In order to produce reproducible data for quantification using the volume integral, a sufficient small but powerful fibre optic is still to come.

Literaturverzeichnis

- [1] ALBERT, Hagen: *Optimierung von multivariaten Kalibriermodellen durch Variablenselektion*, Universität Würzburg, Dissertation, 2000
- [2] BARTHELME, Christian: *Validierung der Auftragung und zweidimensionale Entwicklungstechnik in der DC/HPTLC*, Universität Würzburg, Dissertation, 1995
- [3] BELENKIJ, B. G. ; KOLEGOV, V. I. ; NESTEROV, V. V.: Theory of TLC. Effects of the structure of the absorption layer on spreading of spots. In: *Journal of Chromatography* 107 (1975), S. 265–283
- [4] BIALKOWSKI, Stephen E.: Generalized Digital Smoothing Filters Made Easy by Matrix Calculations. In: *Analytical Chemistry* 61 (1989), S. 1308–1310
- [5] BLOME, J.: Advantages, limits and disadvantages of the ring developing technique. In: ZLATAKIS, A. (Hrsg.) ; KAISER, R. E. (Hrsg.): *HPTLC High performance thin-layer chromatography*. Amsterdam, New York : Elsevier Scientific Publishing Company, 1977, S. 51–71
- [6] DESPIEGELEER, B. ; VAN DEN BOSSCHE, W. ; DEMOERLOOSE, P. ; MASSART, D.: A Strategy for Two-Dimensional, High-Performance Thin-Layer Chromatography, Applied to Local Anaesthetics. In: *Chromatographia* 23 (1987), S. 407–411

- [7] DIBBERN, Hans-Werner: *UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe*. Aulendorf : Edition Cantor, 1978
- [8] DINGENEN, J. ; PLUYM, A.: Retention behaviour of some classes of pharmaceutical products on chemically modified thin-layer chromatographic plates. In: *Journal of Chromatography* 475 (1989), S. 95–112
- [9] EBEL, Siegfried: Quantitation in TLC. In: *Fundamentals of Thin Layer Chromatography (Planar Chromatography)* [17],
- [10] EBEL, Siegfried: Validierung in der DC/HPTLC. In: *WSA Würzburger Skripten zur Analytik*. 2. Auflage. Würzburg : Eigenverlag, 1992 (Validierung), Kapitel 6.3
- [11] EBEL, Siegfried: Lineare Kalibrierung. In: *WSA Würzburger Skripten zur Analytik*. 6. Auflage. Würzburg : Eigenverlag, 1995 (Statistik), Kapitel 4
- [12] EBEL, Siegfried: Nichtlineare Kalibrierfunktionen. In: *WSA Würzburger Skripten zur Analytik*. 1. Auflage. Würzburg : Eigenverlag, 1995 (Statistik), Kapitel 7
- [13] EBEL, Siegfried: Spezielle Verfahren der linearen Regression. In: *WSA Würzburger Skripten zur Analytik*. 1. Auflage. Würzburg : Eigenverlag, 1995 (Statistik), Kapitel 5
- [14] EBEL, Siegfried ; HOCKE, Jürgen: Computer-controlled evaluation in thin-layer chromatography. In: *Journal of Chromatography* 126 (1976), S. 449–456
- [15] EBEL, Siegfried ; MÜCK, Wolfgang: Algorithmen zum automatischen Vergleich von Spektren in der HPLC/UV-Kopplung, 2. Spektrennormierung. In: *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 331 (1988), S. 351–358

-
- [16] ENDRES, Claudia: *Analytik im europäischen Arzneibuch am Beispiel ausgewählter β -Rezeptorenblocker*, Universität Würzburg, Dissertation, 1999
- [17] GEISS, Friedrich: *Fundamentals of Thin Layer Chromatography (Planar Chromatography)*. 1. Auflage. Heidelberg : Dr. Alfred Hüthig Verlag, 1987
- [18] GONNORD, Marie-France ; LEVI, Florence ; GUIOCHON, Georges: Computer assistance in the selection of the optimum combination of systems for two-dimensional chromatography. In: *Journal of Chromatography* 264 (1983), S. 1–6
- [19] GORRY, Peter A.: General Least-Squares Smoothing and Differentiation by the Convolution (Savitzky-Golay) Method. In: *Analytical Chemistry* 62 (1990), S. 570–573
- [20] HEILING, Thomas: *Spektrenvergleiche in der UV-Spektroskopie*, Universität Würzburg, Dissertation, 1995
- [21] HOCKE, Jürgen: *Automatisierung der quantitativen Dünnschichtchromatographie*, Universität Marburg, Dissertation, 1976
- [22] KLEIN, Karl-Friedrich ; HÜTTEL, Stefan ; KAMINSKI, Ralf ; KIRCHHOF, Johannes ; GRIM, Stefan ; NELSON, Gary: Stability and life-time improvements of UV-fibers for new applications. In: GOURLEY, Paul L. (Hrsg.) ; KATZIR, Abraham (Hrsg.): *Proceeding of Micro- and Nanofabricated Structures and Devices for Biomedical Environmental Applications* Bd. 3258, 1998, S. 150–160
- [23] KLEIN, Karl-Friedrich ; SCHLISSMANN, Peter ; SMOLKA, E. ; HILLRICH, Georg ; BELZ, Mathias ; BOYLE, William J. ; GRATAN, Kenneth T.: UV-stabilized silica-based fibre for applications around 200 nm wavelength. In: *Sensors and Actuators B* 38–39 (1997), S. 305–309

-
- [24] KUBLEKA, Paul ; MUNK, Franz: Ein Beitrag zur Optik der Farbanstrieche. In: *Zeitschrift für technische Physik* 11a (1931), S. 593–604
- [25] LITTLEWOOD, Anthony B.: The Processing of Gas-Chromatographic Data. In: *Zeitschrift für Analytische Chemie* 236 (1968), S. 39–51
- [26] MADDEN, Hannibal H.: Comments on the Savitzky-Golay Convolution Method for Least-Squares Fit Smoothing and Differentiation of Digital Data. In: *Analytical Chemistry* 50 (1978), S. 1383–1386
- [27] MÜLLER, Peter: *Entwicklung eines UV-spektrometrischen Detektors für die Gaschromatographie*, Universität Würzburg, Dissertation, 1992
- [28] MUNK, Franz: New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials, Part I. In: *Journal of the Optical Society of America* 38 (1948), S. 448–457
- [29] NUROK, David ; HABIBI-GOUDARZI, Sohrab ; KLEYLE, Robert: Statistical Approach to Solvent Selection as Applied to Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography. In: *Analytical Chemistry* 59 (1987), S. 2424–2428
- [30] POST, Peter: *Massenverteilung und densitometrische Detektion in der Dünnschichtchromatographie*, Universität Marburg, Dissertation, 1979
- [31] RATZLAFF, Kenneth L. ; JOHNSON, Jean T.: Computation of Two-Dimensional Polynomial Least-Squares Convolution Smoothing Integers. In: *Analytical Chemistry* 61 (1989), S. 1303–1305
- [32] SAVITZKY, Abraham ; GOLAY, Marcel J. E.: Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. In: *Analytical Chemistry* 36 (1964), S. 1627–1639
- [33] SCHIRM, Bernhard ; WÄTZIG, Hermann: Peak Recognition Imitating Human Judgement. In: *Chromatographia* 48 (1998), S. 331–346

-
- [34] SCHÜTZ, Harald: Der korrigierte R_f -Wert (R_f^c -Wert). In: *Pharmazie in unserer Zeit* 18 (1989), S. 161–168
- [35] STAHL, Egon: *Die Dünnschichtchromatographie*. 1. Auflage. Heidelberg - New York : Springer Verlag, 1962
- [36] STEINIER, Jean ; TERMONIA, Yves ; DELTOUR, Jules: Comments on Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Square Procedure. In: *Analytical Chemistry* 44 (1972), S. 1906–1909

Lebenslauf

Persönliche Daten

Matthias Schneider

geboren am 12. Dezember 1969 in Dillingen an der Donau

verheiratet mit Barbara Schneider, geb. König

Familie

Eltern Walter und Gabriele Schneider, geb. Rüdinger

Schulbildung

1975–1979 Angelina–Egger–Volksschule, Dillingen an der Donau

1979–1988 Johann–Michael–Sailer–Gymnasium, Dillingen an der Donau

Mai 1988 Abitur

Wehrdienst

07/1988–08/1988 Grundausbildung in Landshut

08/1988–09/1989 Wehrdienst in Dillingen an der Donau

Studium und Praktikum

11/1989–10/1994 Studium der Pharmazie an der Bayerischen Julius–Maximilians–Universität in Würzburg

04/1993 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

10/1994 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

11/1994–04/1995 Pharmaziepraktikum in der Apotheke zur Post, Hamburg

- 05/1995–10/1995 Mitarbeiter an der Faculty of Pharmaceutical Sciences der University of British Columbia, Vancouver B.C., Kanada
- 12/1995 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker

Beruf

- 01/1996–04/2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie der Bayerischen Julius–Maximilians–Universität in Würzburg
- Juli 1999 Prüfung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik
- seit 05/2000 Mitarbeiter der schwaben–apotheke in Dillingen an der Donau
- 11/2002 Abschluß als Praktischer Betriebswirt für die Pharmazie (WDA)