Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 73 (1982)

Heft: 2

Artikel: Anwendung der instrumentalisierten HPTLC in der Spurenanalytik fluoreszenzmarkierter Substanzen = Application of instrumentalized HPTLC in the trace analysis of fluorescence labelled compounds

Autor: Funk, W.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-983448

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 23.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 73, 139–154 (1982)

Anwendung der instrumentalisierten HPTLC in der Spurenanalytik fluoreszenzmarkierter Substanzen

Application of Instrumentalized HPTLC in the Trace Analysis of Fluorescence Labelled Compounds

W. Funk
Fachhochschule Gießen-Friedberg, Gießen

Einleitung

Jede Molekülart zeigt ein ihr typisches Absorptionsspektrum im sichtbaren Spektralbereich (farbige Substanzen) oder, wie bei der Mehrzahl der farblosen Substanzen, im UV-Bereich. Der photometrische Nachweis farbloser Substanzen ist häufig unspezifisch, da sich die charakteristischen Absorptionsmaxima dieser Substanzen in einem sehr engen Spektralbereich häufen. Deshalb versucht der Analytiker, durch eine gezielte, spezifische chemische Umsetzung die gesuchte Verbindung zu einem im sichtbaren Spektralbereich absorbierenden Derivat umzusetzen.

Daneben ist Ziel einer chemischen Derivatisierung, durch Einführung eines Chromophors ein Derivat mit großem Extinktionskoeffizienten zu erhalten, um somit die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens zu steigern. Verbindet man diesen Analysenschritt mit einer dünnschichtchromatographischen Trennung, so lassen sich zusätzlich Störungen ähnlich reagierender Stoffe vermeiden, was zu einer weiteren Steigerung der Spezifität des Nachweises führt. Damit ist es oftmals erst möglich, eine quantitative DC-Bestimmung im Spurenbereich durchzuführen (1).

Weiteres Ziel einer Derivatisierung kann die Verbesserung einer extraktiven Abtrennung, die Verbesserung der Stabilität der gesuchten Verbindung oder die Verbesserung der chromatographischen Trennung sein. Die wichtigsten Derivatisierungsreaktionen sind dabei:

1. Die *Acylierung* zum Nachweis von z. B. Aminen, Polyaminen oder Phenolen;
2. Die *Alkylierung* zum Nachweis von z. B. aromatischen und aliphatischen Carbonsäuren;
3. *Kondensationsreaktionen* zum Nachweis von z. B. Carbonylverbindungen;
4. *Kupplungsreaktionen* an C-H-aciden Verbindungen.

Im folgenden Fließschema (Abb. 1) sind die Möglichkeiten dargestellt, wann eine Derivatisierungsreaktion bei einer dünnschichtchromatographischen Bestimmungsmethode durchgeführt werden kann.

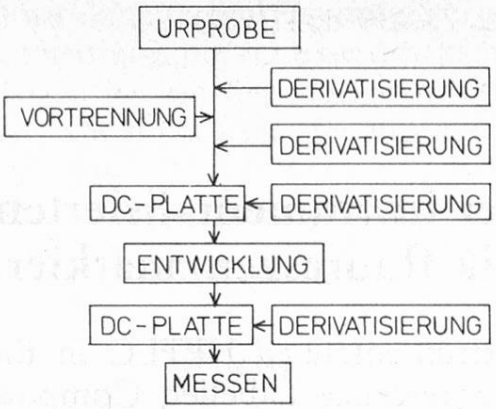

Abb. 1. Fließschema

Die *Postderivatisierung* nach erfolgter chromatographischer Entwicklung durch Besprühen oder Tauchen der DC-Platte hat häufig den Nachteil, daß Sprüh- oder Tauchreagenzien mit einer hohen Eigenabsorption eine quantitative Bestimmung verhindern.

Dieser Nachteil macht sich vor allem dann bemerkbar, wenn man die Derivatisierung mit fluoreszierenden Reagenzien durchführen will. In diesem Fall bleiben die Möglichkeiten der *Vorderivatisierung* als einziger Ausweg.

Daneben kann eine Vorderivatisierung die chromatographischen Eigenschaften schwer zu trennender Substanzen derart verändern, daß erst danach eine chromatographische Trennung möglich ist.

Ebenso ist es möglich, durch eine Vorderivatisierung die Stabilität (z. B. bei Oxidationsempfindlichkeit) von Verbindungen zu steigern sowie die Reaktivität von Verbindungen z. B. mit der stationären Phase zu verringern.

Beispiel der Vorderivatisierung

Quantitative Östriolbestimmung

Im mütterlichen Plasma und Urin ist die quantitative Bestimmung von Östriol bei der Überwachung des Fötus bzw. der Plazentafunktion insbesondere bei Risikoschwangerschaften von entscheidender Bedeutung.

Dabei unterscheiden sich die Konzentrationen dieses Steroids in diesen beiden Matrices um etwa den Faktor 1000 (siehe Tabelle 1).

Das *nicht* derivatisierte Östriol (Abb. 2) läßt sich demnach als Hauptsteroid in den letzten Schwangerschaftswochen nur im Harn direkt bestimmen, da es dort im mg/l-Bereich vorliegt. In Abbildung 3 ist die Remissionsortskurve — gemessen bei $\lambda = 282$ nm — dargestellt. In dem Fließmittel Cyclohexan/Essigester/Ethanol (45:45:10) läßt sich danach Östriol direkt im Arbeitsbereich von 20—100 ng/Fleck ($r = 0{,}99$) noch quantifizieren.

Tabelle 1

a) Östrogenkonzentrationen im Serum während der Schwangerschaft

Wochen nach der letzten Menstruation	Unkonjugiertes Östriol (µg/l)
25	2– 6
30	4,5–10,5
35	6–18
40	7–25

b) Ausscheidung von Östriol während der Schwangerschaft im 24-h-Harn

Schwangerschaftswoche	mg Östriol / 24 h
25	11
30	15
35	20
40	39

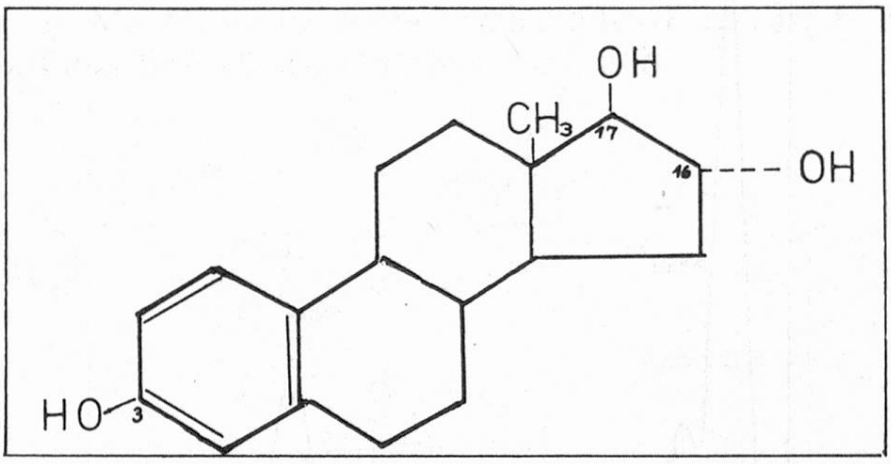

Abb. 2. Östriol

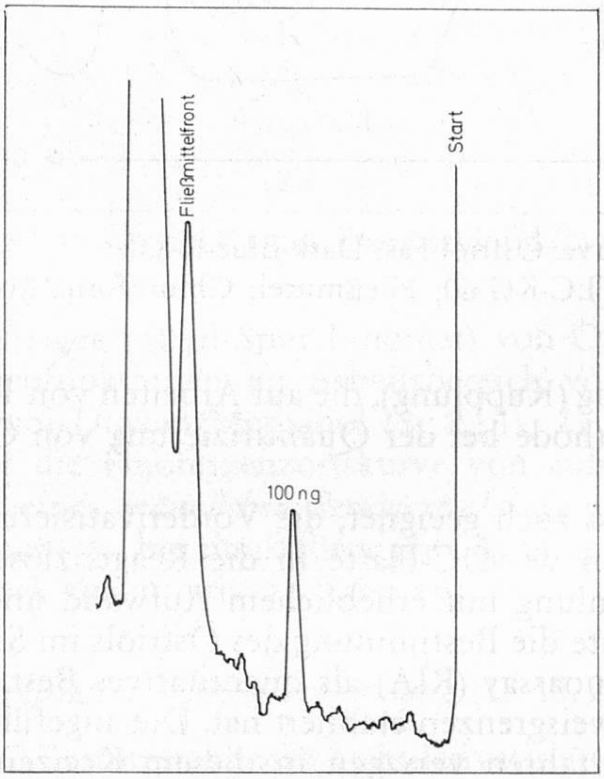

Abb. 3. Remissionsortskurve Östriol
Sorbens: HPTLC-KG-60; Fließmittel: Cyclohexan/Essigsäureethylester/Ethanol (45 : 45 : 10); λ = 282 nm

Die Spezifität und Empfindlichkeit eines Östriolnachweises läßt sich nun erhöhen, wenn man dieses als in 3-Stellung aromatisches Phenol mit Diazoniumsalzen kuppelt. In Abbildung 4 ist die Remissionsortskurve des Östriol-Azofarbstoffes mit Fast-Dark-Blue-R-Salz — gemessen bei 520 nm — dargestellt. Eine Quantifizierung ist damit im Arbeitsbereich von 5 ng/Fleck bis 30 ng/Fleck möglich (r = 0,998).

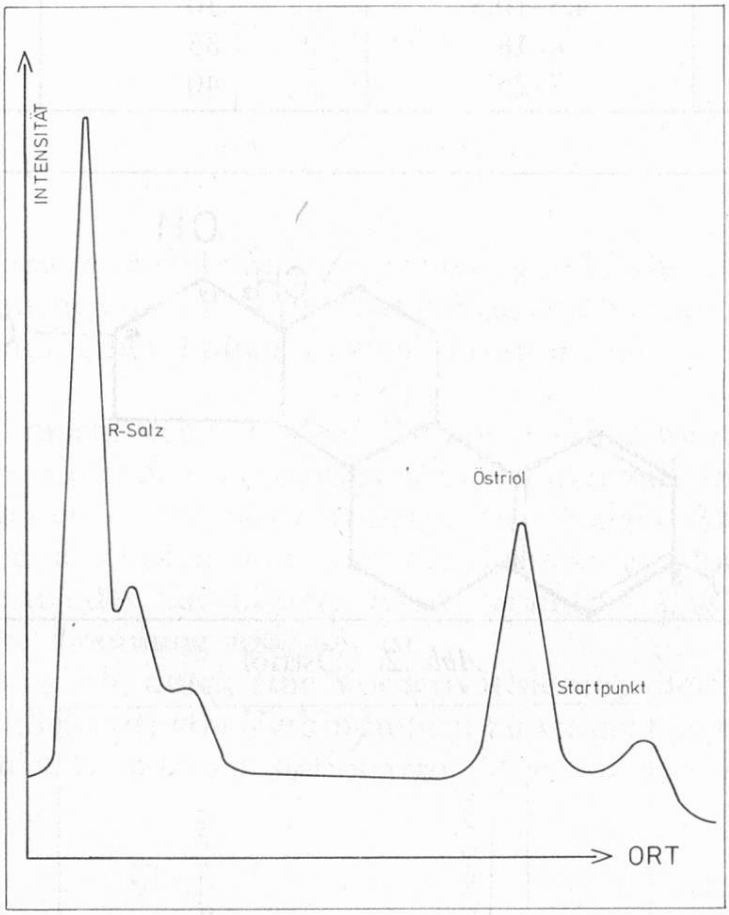

Abb. 4. Remissionskurve Östriol-Fast-Dark-Blue-R-Salz
Sorbens: HPTLC-KG-60; Fließmittel: Chloroform/Aceton (15/5); λ = 520 nm

Diese Diazotierung (Kupplung), die auf Arbeiten von *Weiss* (2—8) zurückgeht, ist heute Routinemethode bei der Quantifizierung von Östriol im 24-Stunden-Schwangernharn.

Diese Methode ist auch geeignet, die Vorderivatisierung direkt auf der DC-Platte durch Tauchen der DC-Platte in die Reagenzlösung vorzunehmen (9).

Da die Urinsammlung mit erheblichem Aufwand und Fehlermöglichkeiten behaftet ist, wird heute die Bestimmung des Östriols im Serum bevorzugt, wobei sich der Radioimmunoassay (RIA) als quantitatives Bestimmungsverfahren mit sehr niedrigen Nachweisgrenzen etabliert hat. Die angeführten dünnschichtchromatographischen Verfahren versagen in diesem Konzentrationsbereich wegen des zu geringen Östrolgehalts im Serum (siehe Tabelle 1).

Den einzigen Ausweg bietet in der quantitativen DC dann die Derivatisierung mit Fluoreszenzlabeln zu fluoreszierenden Verbindungen. Denn die in-situ-

Fluoreszenzmessung auf einer DC-Platte bietet gegenüber der Remissionsmessung entscheidende Vorteile:

- eine gesteigerte *Selektivität;*
- eine um den Faktor 100—1000 erhöhte *Empfindlichkeit;*
- bessere Linearität der Eichkurven (im unteren Arbeitsbereich);
- und daneben sind die Meßwerte unabhängig von der *Fleckform,* was für die Chromatographie von Extrakten aus biologischer Matrix besonders wichtig ist.

Als aromatisches Phenol läßt sich Östriol im alkalischen Bereich (pH = 8—10) mit dem Fluorenszenzlabel Dansylchlorid in einer Vorderivatisierung acylieren (10—12) (Abb. 5). Mit Hilfe dieses fluoreszierenden Esters ist es nun möglich, Östriol im pg/Fleck-Bereich quantitativ zu erfassen.

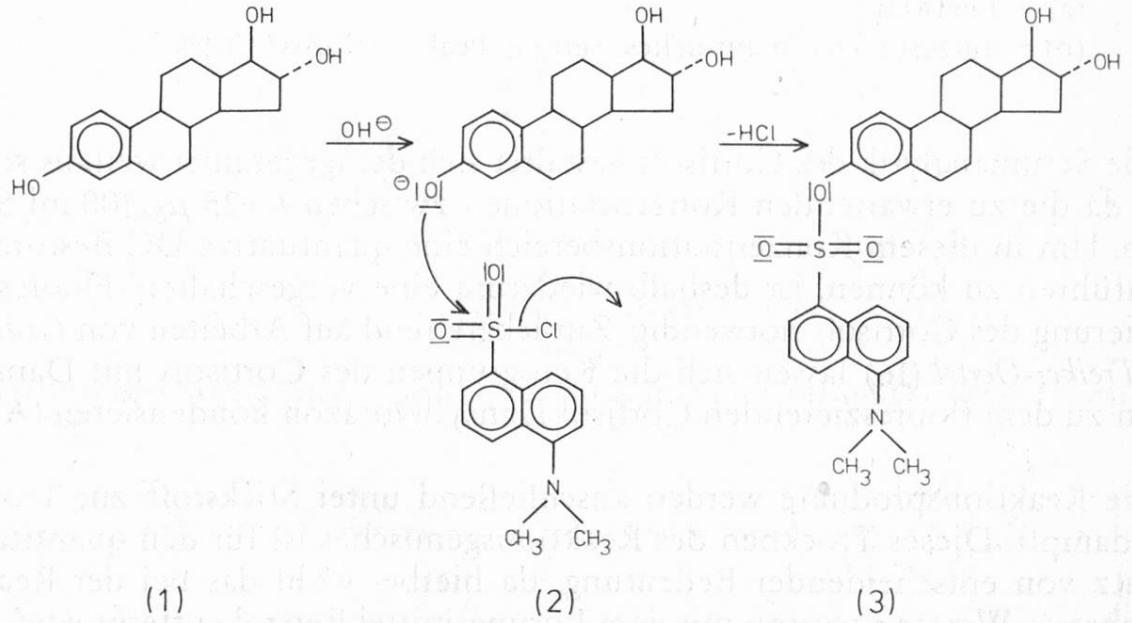

Abb. 5. Derivatisierung von Östriol (1) mit Dansylchlorid (2) zu Dansyl-Östriol (3)

Nach linearem Auftragen (10 μl/Spur Linomat) von Östrioldansylstandards erhält man lineare Eichfunktionen im Arbeitsbereich von 1—9 ng/Spur (r = 0,998; Fließmittel: Toluol/Dioxan/Methanol (8 : 2 : 1); λ_A = 313; λ_F = > 430).

In Abbildung 6 ist die Fluoreszenzortskurve von aufgestockten Serumextrakten dem Leerwert eines *männlichen Serumextrakts* gegenübergestellt (13).

Diese Methode erlaubt es, bei punktförmigem Auftrag (200 nl) noch 100 pg Östriol-Dansylester/Fleck quantitativ zu erfassen.

Quantitative Cortisolbestimmung (17, 18, 20)

Die quantitative DC-Bestimmung von nichtderivatisiertem Cortisol und dessen Metaboliten in Harnextrakten, die bis zu 11 mg/24 Stunden ausgeschieden werden, ist wenig problematisch (14), da hier pro DC-Fleck Substanzmengen im ng-Bereich nachgewiesen werden müssen.

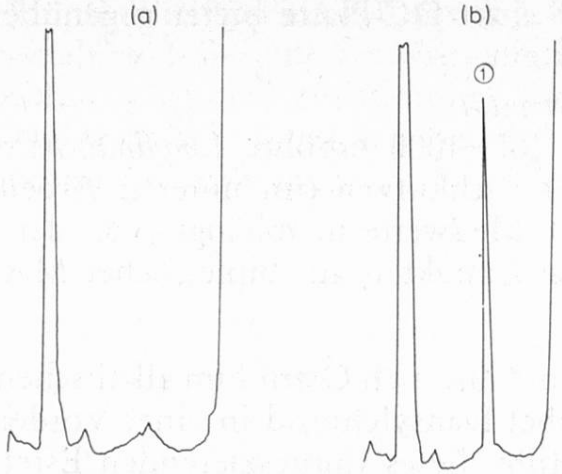

Abb. 6. Fluoreszenzortskurve von Serumextrakten
(a) = Leerwert
(b) = aufgestocktes männliches Serum; Peak 1: Dansyl-Östriol

Die Serumanalytik des Cortisols gestaltet sich demgegenüber weitaus schwieriger, da die zu erwartenden Konzentrationen zwischen 6—25 μg/100 ml Serum liegen. Um in diesem Konzentrationsbereich eine quantitative DC-Bestimmung durchführen zu können, ist deshalb wiederum eine vorgeschaltete Fluoreszenzmarkierung des Cortisols notwendig. Zurückgreifend auf Arbeiten von *Graef* (15) und *Treiber-Oertel* (16) lassen sich die Ketogruppen des Cortisols mit Dansylhydrazin zu dem fluoreszierenden Cortisol-Dansylhydrazon kondensieren (Abb. 7) (19).

Die Reaktionsprodukte werden anschließend unter Stickstoff zur Trockene eingedampft. Dieses Trocknen des Reaktionsgemisches ist für den quantitativen Umsatz von entscheidender Bedeutung, da hierbei wohl das bei der Reaktion entstehende Wasser azeotrop mit dem Lösungsmittel Benzol entfernt wird. Hierdurch wird das Reaktionsgleichgewicht offenbar quantitativ zur Seite der Reaktionsprodukte verschoben. Dieses grundsätzliche Problem jeder Vorderivatisierung, daß die Kinetik einer Derivatisierungsreaktion bei geringen Substanzkonzentrationen oft sehr langsame Reaktionsgeschwindigkeiten aufweist, wird hierdurch gelöst.

In Abbildung 8 ist die Fluoreszenzortskurve des Cortisol-Dansylhydrazons (CDH) dem Blindwert gegenübergestellt. Dabei ist festzustellen, daß die quantitative DC jedem herkömmlichen fluorometrischen Verfahren in einer Küvette überlegen ist, denn sie besitzt erhöhte Richtigkeit, da sie die Nebenprodukte (Peaks 1, 3, 4, 5 in Abb. 8) bei dieser Reaktion nicht miterfaßt.

Quantitativ verwertbare Ergebnisse lassen sich mit der HPTLC in diesem Arbeitsbereich aber nur erhalten, wenn besondere Bedingungen eingehalten werden:

Die Erfahrung mit der quantitativen Bestimmung vor allem fluoreszierender Substanzen auf einer HPTLC-Platte zeigt, daß unbehandelte Platten ein starkes Untergrundrauschen aufweisen. Dies stört dann aber besonders, wenn man

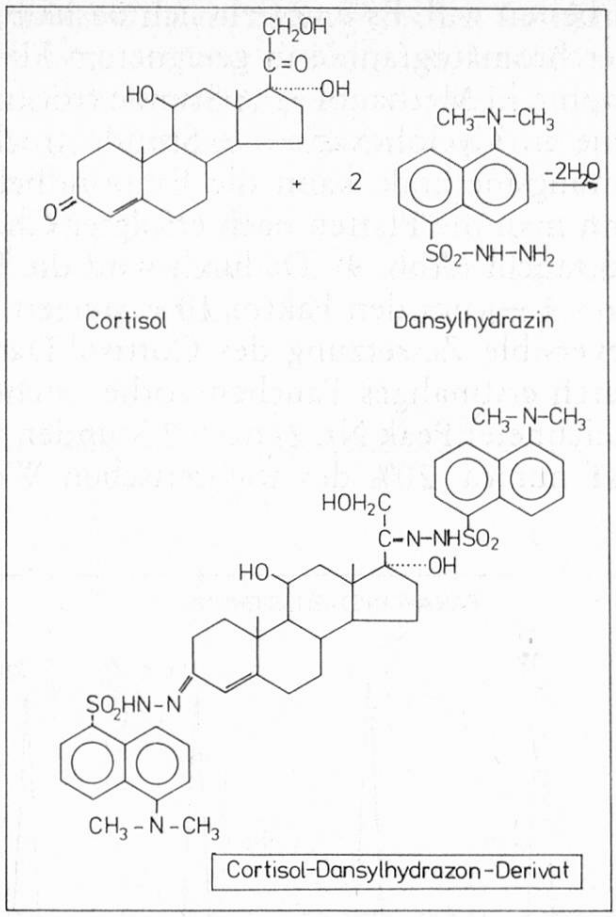

Abb. 7. Reaktion von Cortisol mit Dansylhydrazin zum Cortisol-Dansylhydrazon-Derivat

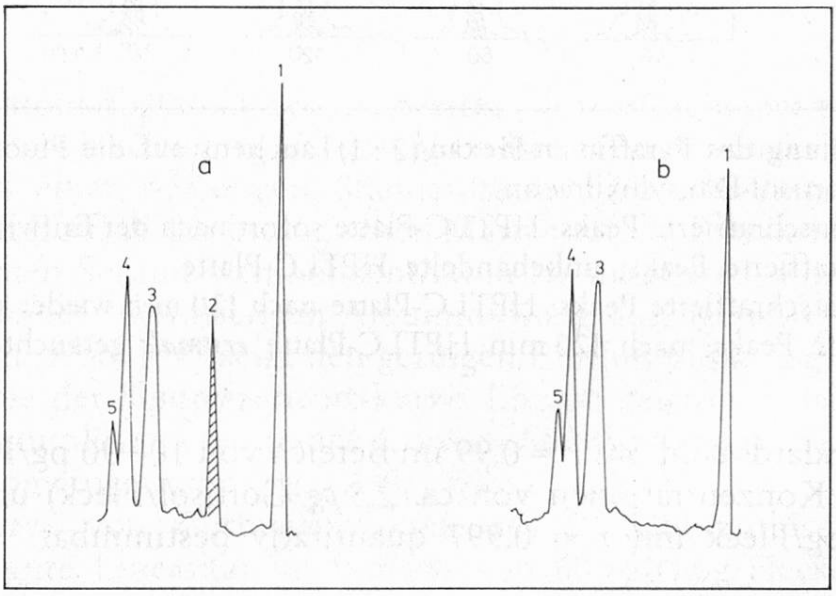

Abb. 8. Fluoreszenzortskurve von Cortisol-Dansylhydrazon (a) und Leerwert (b)
1 = Auftragpunkt
2 = Cortisol-Dansylhydrazon
3, 4, 5 = Nebenprodukte. Sorbens: HPTLC-KG-60; Fließmittel: Benzol/Dioxan/Methanol (8 : 2 : 1) λ_A = 365 nm; λ_F > 460 nm

im pg/Fleck-Bereich arbeiten will. Es empfielt sich deshalb, alle Platten vor Gebrauch durch eine Leerchromatographie in geeignetem Fließmitttel zu reinigen (z. B. Leerchromatographie in Methanol — ½ Stunde trocknen bei 120 °C; weitere Leerchromatographie in Cyclohexan — ½ Stunde trocknen bei 120 °C).

Bei dieser Bestimmungsmethode kann die Empfindlichkeit (21) signifikant gesteigert werden, wenn man die Platten nach erfolgter Chromatographie in ein Paraffin-/n-Hexan-Bad taucht (Abb. 9). Dadurch wird die Fluoreszenzintensität (ausgezeichnete Peaks — 1 —) um den Faktor 10 gesteigert. Ebenso läßt sich erkennen, daß eine irreversible Zersetzung des Cortisol-Dansylhydrazons unterbunden wird, denn durch erstmaliges Tauchen vorher nicht behandelter Platten (Abb. 9 schraffiert gezeichneter Peak Nr. 2) nach 2 Stunden wird die Fluoreszenzintensität lediglich auf nur ca. 20% des theoretischen Wertes gesteigert (20).

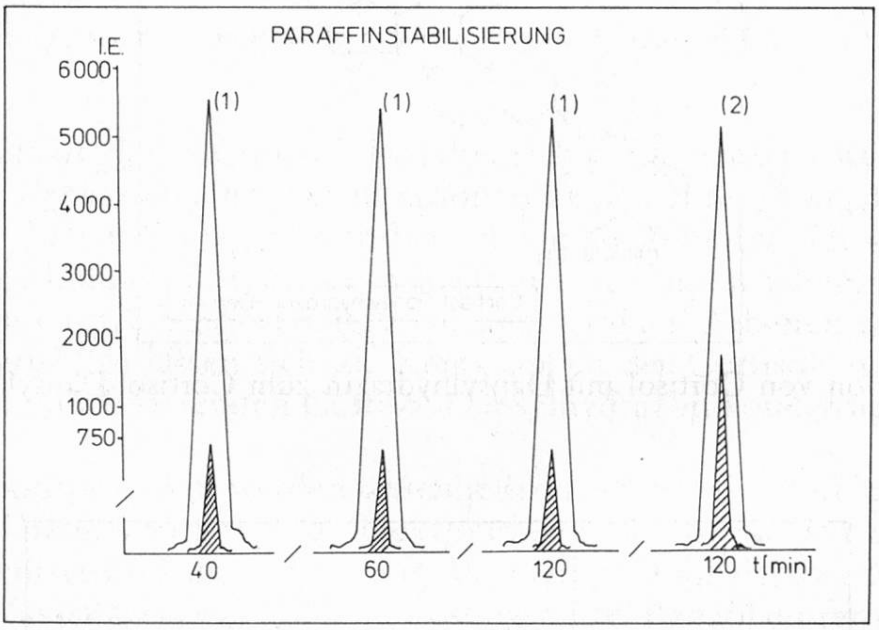

Abb. 9. Auswirkung des Paraffin-/n-Hexan-(2 : 1)Tauchens auf die Fluoreszenzausbeute von Cortisol-Dansylhydrazon:
(1) nichtschraffierte Peaks: HPTLC-Platte sofort nach der Entwicklung getaucht; schraffierte Peaks: unbehandelte HPTLC-Platte
(2) nichtschraffierte Peaks: HPTLC-Platte nach 120 min wieder getaucht; schraffierte Peaks: nach 120 min HPTLC-Platte *erstmals* getaucht

Cortisolstandards sind mit $r = 0{,}99$ im Bereich von 10—90 pg/Fleck (bei noch detektierbaren Konzentrationen von ca. *2,5 pg* Cortisol/Fleck) und im Bereich von 100—700 pg/Fleck mit $r = 0{,}997$ quantitativ bestimmbar.

Cortisolbestimmung in Serum

Die Serumanalytik im Spurenbereich gestaltet sich häufig schwierig, da diese komplexe Matrix oft eine Vielzahl, die Nachweisreaktion störende Begleitstoffe

entält. Dies gilt besonders, wenn man die gesuchte Komponente vor der quantitativen Bestimmung derivatisieren will. Daneben kann sich der relativ hohe Eiweißanteil auf die quantitative Bestimmung nachteilig auswirken. Deshalb empfiehlt es sich häufig, die zu bestimmende Komponente durch eine vorgeschaltete Extraktion abzutrennen.

In Abbildung 10 ist das nach einer Fertigsäulenextraktion eines wässerigen Cortisolstandards und anschließender Derivatisierung zum Cortisol-Dansylhydrazon erhaltene Chromatogramm (10 b) einem Leerwert (10 a) gegenübergestellt.

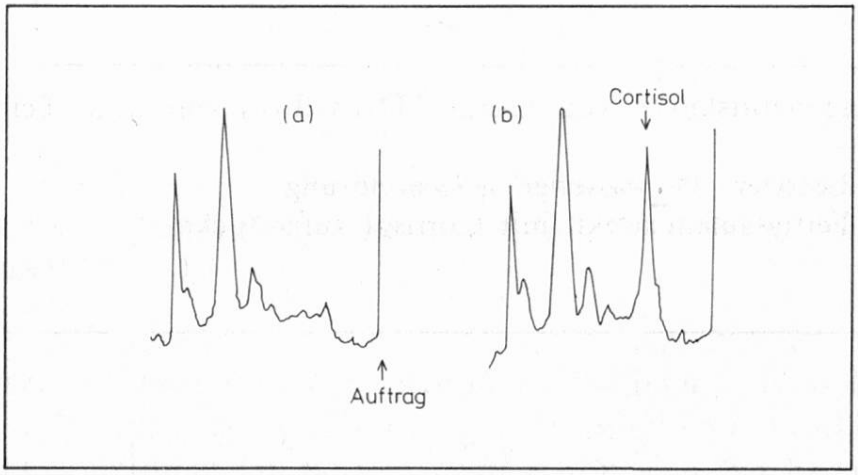

Abb. 10. Fluoreszenzortskurve von Cortisol-Dansylhydrazon nach Fertigsäulen-Extraktion
(a) = Leerwert
(b) = Fertigsäulenextrakt, mit Cortisol aufgestockt

Aus dem Chromatogramm des Leerwertes (10 a) ist dabei zu ersehen, daß es zur Zeit immer noch schwierig ist, untergrundfreies Säulenmaterial zu erhalten. Die Extraktion einer wässerigen Standardprobe läßt allerdings keine Rückschlüsse auf den Einfluß der biologischen Matrix auf die Extraktion zu. Um den Einfluß der hohen Serumeiweißkonzentration zu simulieren, wurde die gleiche Extraktion aus einer 3% wässerigen Albuminlösung durchgeführt. Das Leerwertchromatogramm (Abb. 11 a) zeigt den geringen Einfluß physiologischer Proteine auf die Basislinie der Fluoreszenzortskurve. Ebenso zeigt eine Aufstockung der wässerigen Albuminlösung mit reinen Cortisol-Standardlösungen (Abb. 11 b) vergleichbare Chromatogramme (vgl. Abb. 10 b).

Die Eichkurve von Cortisolextrakten aus 3%-Albuminlösung zeigt mit $r = 0{,}998$ eine gute Linearität im Bereich von 60—600 pg/Fleck.

Die Extraktion eines Humanserums führt zu einem Chromatogramm wie in Abbildung 12 dargestellt (12 c mit 480 pg Cortisol und 12 d mit 240 pg Cortisol aufgestockte Humanserumextrakte).

Serumextrakte dexametasonbehandelter Patienten, deren Serum nahezu cortisolfrei ist, zeigen in dem hier interessierenden Bereich der Fluoreszenzortskurve

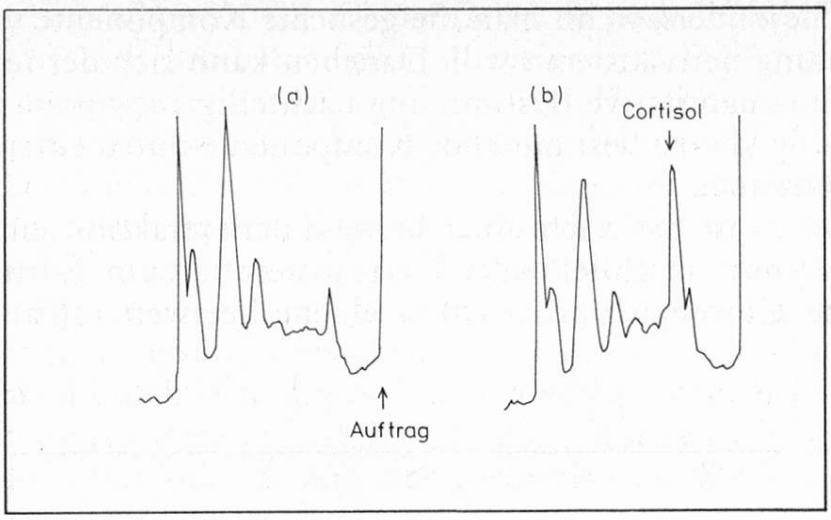

Abb. 11. Fluoreszenzortskurve von Cortisol-Dansylhydrazon nach Fertigsäulenextraktion
(a) = Leerwert 3% wässerige *Albumin*lösung
(b) = Fertigsäulenextrakt, mit Cortisol aufgestockt

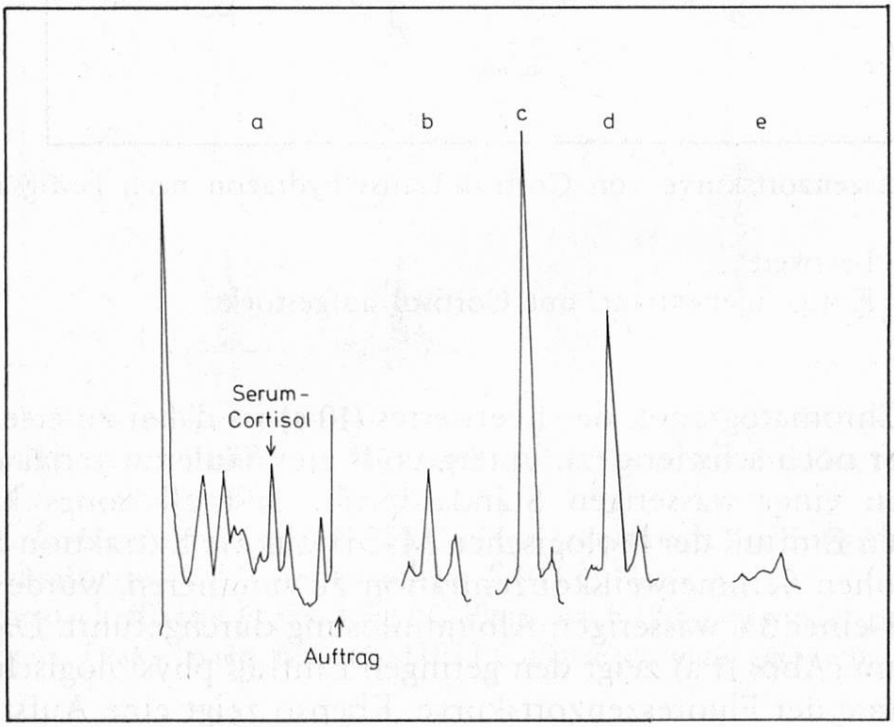

Abb. 12. Fluoreszenzortskurve eines Humanserum-Extrakts
(a) scan = 50 mm/min
(b) scan = 30 mm/min
(c) = Serum mit 480 pg C aufgestockt
(d) = Serum mit 240 pg C aufgestockt
(e) = Serum eines Dexamethason-Patienten

(Abb. 12 e) keine fluoreszierenden Komponenten. Diese quantitative HPTLC-Methode führt zu vergleichbaren Ergebnissen wie eine radioimmunologische Bestimmung (RIA) des Serumcortisols (Abb. 13).

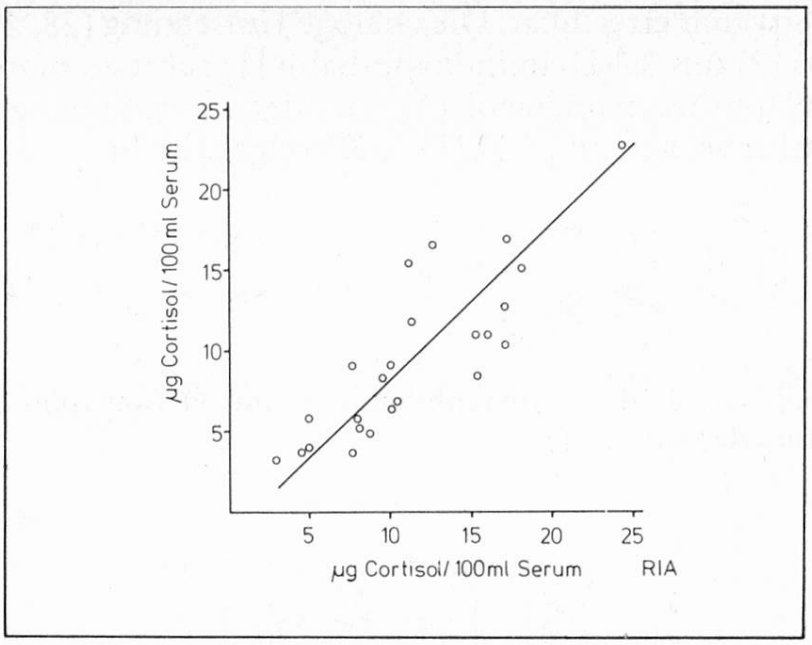

Abb. 13. Methodischer Vergleich: Quantitative Cortisolbestimmung in Serum
$Y = 0{,}9695\,x - 1{,}5$
$r = 0{,}8451$

Die Fluoreszenzintensität des Cortisol-Dansylhydrazons ist jedoch nur unter extrem sauberen Bedingungen stabil. Fast alle organischen Labordämpfe vermindern die Fluoreszenzintensität und machen damit den Nachweis unmöglich.

Quantitative Selenbestimmung (24—26)

Nach der deutschen Trinkwasserverordnung (27) ist eine photometrische Selenbestimmung (Abb. 14) gefordert, die auf einer Kondensation vierwertigen Selens (2) mit 1.2-Diaminobenzol (1) zu Benzoselenodiazol (3) beruht. Dieses Derivat des Selens läßt sich in Remission direkt auf einer DC-Platte quantitativ bestimmen und zeigt eine lineare Eichfunktion im Bereich von 2—8 ng Selen/Fleck (r = 0,99; Fließmittel: Toluol; λ = 330 nm).

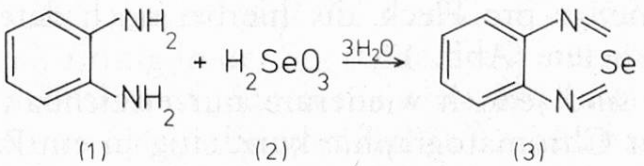

Abb. 14. Reaktion von o-Phenylendiamin (1) mit vierwertigem Selen (2) zu 2.1.3-Benzoselenodiazol (3)

Mit dieser quantitativen HPTLC-Methode ist es möglich, den geforderten Grenzwert von 8 µg Selen pro Liter Trinkwasser zu überwachen. Jedoch ist diese Methode ungeeignet, um Selen im Bereich der natürlichen Grundbelastung (ca. 100 ng Selen/Liter) nachzuweisen. Dieser Arbeitsbereich ist nur mit fluoreszie-

renden Selenderivaten erreichbar. Die analoge Umsetzung (28, 29) (Abb. 15) vierwertigen Selens (2) mit 2.3-Diaminonaphthalin (1) führt zu orangerot fluoreszierendem 2.1.3-Naphthoselenodiazol (3), mit der in Abbildung 16 dargestellten Fluoreszenzortskurve auf einer HPTLC-Kieselgelschicht.

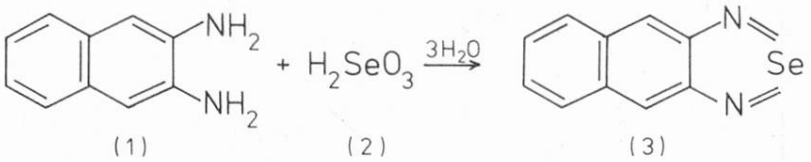

Abb. 15. Reaktion von 2.3-Diaminonaphthalin (1) mit vierwertigem Selen (2) zu 2.1.3-Naphthoselenodiazol (3)

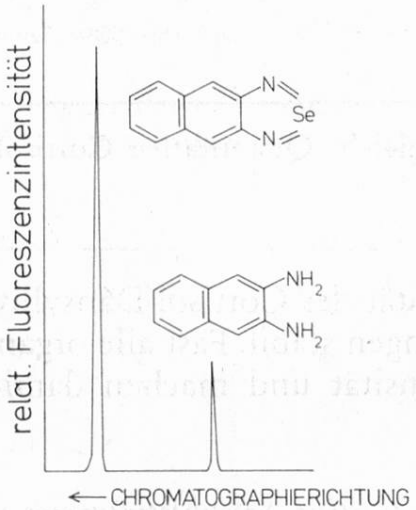

Abb. 16. Fluoreszenzortskurve von 2.1.3-Naphthoselenodiazol und 2.3-Diaminonaphthalin
Sorbens: HPTLC-KG-60; Fließmittel Toluol; λ_A = 365 nm; λ_F > 560 nm

Diese Verbindung zeigt eine lineare Eichfunktion im Arbeitsbereich von 14—93 pg Selen/Fleck (r = 0,998) bei einem Auftragvolumen von 200 nl. Die niedrigste Substanzmenge pro Fleck, die hierbei noch detektiert werden kann, liegt bei etwa 2 pg Selen (Abb. 17).

Diese Ergebnisse sind jedoch wiederum nur erreichbar, wenn die HPTLC-Platten nach erfolgter Chromatographie kurzzeitig in ein Paraffin-n-Hexan-Gemisch (2 : 1) (21) getaucht werden. Wie in Abbildung 18 dargestellt, wird damit die Fluoreszenzausbeute gegenüber nicht behandelten Flecken (I) (schraffiert gezeichnet) um den Faktor 25 (nichtschraffierte Peaks) gesteigert. Darüber hinaus stabilisiert diese Behandlung die Fluoreszenz über einen längeren Zeitraum und verhindert eine Zersetzung des 2.1.3-Naphthoselenodiazols. Werden vorher nicht behandelte DC-Platten nach einer fünfstündigen Lagerzeit erstmals behandelt (schraffiert gezeichneter Peak II), so steigt die Fluoreszenz nur auf etwa 10% der Fluoreszenz behandelter Flecke, die nach einem weiteren Tauchen

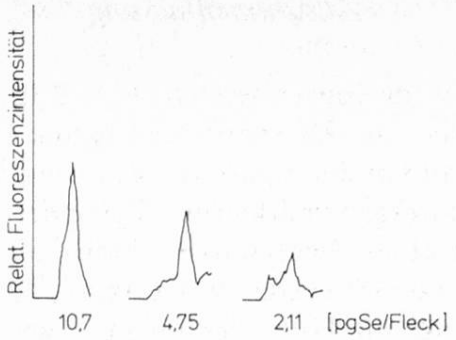

Abb. 17. Ausschnitte der Fluoreszenzortskurve von 2.1.3-Naphthoselenodiazol im Bereich der Nachweisgrenze

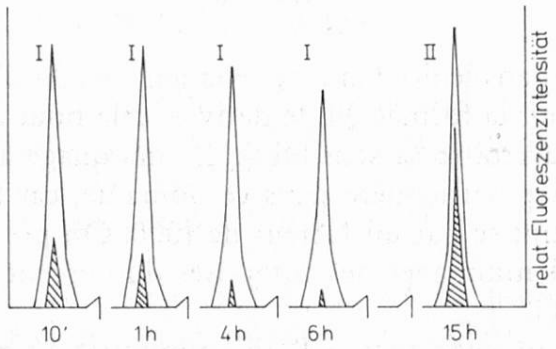

Abb. 18. Auswirkung des Paraffin-/n-Hexan-(2 : 1)Tauchens auf die Fluoreszenzausbeute:
(I) nichtschraffierte Peaks: HPTLC-Platte sofort nach der Entwicklung getaucht; schraffierte Peaks: HPTLC-Platte nicht getaucht
(II) nichtschraffierte Peaks: HPTLC-Platte nach 15 h *nochmals* getaucht; schraffierte Peaks: HPTLC-Platte nach 15 h *erstmals* getaucht

wieder die ursprüngliche Fluoreszenz aufweisen (nichtschraffierter Peak II). Extrahiert (Rührextraktion) man das entstandene 2.1.3-Naphthoselenodiazol mit Cyclohexan aus einer wässerigen Probe, ist es möglich, Selen im Arbeitsbereich von 200 ng Selen/Liter Wasser bis 6 μg Selen/Liter Wasser ($r = 0{,}999$) quantitativ zu erfassen.

Diese Beispiele sollen zeigen, daß die quantitative HPTLC fluoreszenzmarkierter Substanzen mit Erfolg in der Spurenanalytik eingesetzt werden kann. Die hierzu notwendige Präzision ist jedoch nur erreichbar, wenn die Analysengeräte dem Standard der «instrumentalisierten HPTLC» (Auftragegeräte, Trennkammern und Chromatogrammspektralphotometer) entsprechen.

Dank

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Firmen Camag, Muttenz, Schweiz und E. Merck, Darmstadt, durchgeführt.

Zusammenfassung

Eine quantitative Analytik im Spurenbereich ist häufig nur dann möglich, wenn das Analysenverfahren einen Derivatisierungschritt beinhaltet. Dies, um einmal die Spezifität des Verfahrens zu erhöhen und vor allem, um die Empfindlichkeit des Verfahrens zu steigern. Hierbei kommt der Fluoreszenzmarkierung besondere Bedeutung zu, da hierdurch die Nachweisempfindlichkeit eines Analysenverfahrens bis um den Faktor 1000 erhöht werden kann. Die Fluoreszenzmarkierung von Östriol, Cortisol und Selen und deren quantitative Direktbestimmung mit Hilfe der HPTLC wird vorgestellt. Ein Verfahrensvergleich mit Radioimmunoassay zeigt die Gleichwertigkeit dieser Methode auf.

Résumé

L'analyse quantitative dans le domaine des éléments traces n'est souvent possible que si le procédé analytique inclut la formation de dérivés; cela pour augmenter la spécificité du procédé et surtout pour accroître sa sensibilité. Le marquage avec des composés fluorescents revêt une importance particulière dans ce domaine, car la sensibilité d'un procédé analytique peut être multipliée par un facteur de 1000. On présente ici le marquage d'oestriol, de cortisol et de sélénium avec des composés fluorescents et leur évaluation quantitative directe par HPTLC.

La comparaison de ce procédé avec le Radioimmunoassay montre l'équivalence de ces deux méthodes.

Summary

The quantitative determination in the trace range of compounds frequently needs a derivative step. This leads to a higher specificity and especially an increase in the sensitivity of the analytical method. As a derivatisation procedure the fluorescence labelling is of main interest, because it normally reduces the limit of determination by a factor of 1000. For example the fluorescence labelling of estriol, cortisol and selenium and their quantitative in-situ HPTLC determination are presented. Compared with Radioimmunoassay the HPTLC shows at least similar performance characteristics.

Literatur

1. *Ritter, W.:* Thin-layer densitometric determination of Mucolimine. A structurally new diuretic drug, at the nanogram level in biological fluids. J. Chromatogr. **142**, 431–440 (1977).
2. *Weiß, P. A. M:* Kurzhydrolyse von Östriolkonjugaten aus Schwangerenharn. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. **12**, 279–281 (1974).
3. *Weiß, P. A. M.:* Einfache quantitative Bestimmung von Östron, Östradiol und Östriol mittels Dünnschichtchromatographie und Chromatogrammspektralphotometrie sowie deren praktische Anwendung zur Bestimmung von Östriol aus Schwangerenharn. Endokrinologie **59**, 273–278 (1972).
4. *Weiß, P. A. M.:* Quantitative Östriolbestimmung aus Schwangerenharn mittels Chromatogrammspektralphotometrie. Geburtsh. u. Frauenheilk. **30**, 623–629 (1970).

5. *Weiß, P. A. M.:* Zur dünnschichtchromatographischen Schnellbestimmung von Östriol aus Harn von Schwangeren. Geburtsh. u. Frauenheilk. **35**, 475—477 (1975).
6. *Weiß, P. A. M.:* Die Ausscheidung von Östriol-3-Sulfat im Harn von Schwangeren während des letzten Trimenons. Endokrinologie **65**, 249—253 (1975).
7. *Weiß, P. A. M., Esterbauer, H.* und *Scherr, F.:* Die Ausscheidung von Östriol, Östetrol, 16-Epi-Östriol, 16-Keto-Östradiol und 16-Hydroxy-Östron im 24-Stunden-Harn Schwangerer des letzten Trimenons. Endokrinologie **65**, 254—265 (1975).
8. *Weiß, P. A. M., Winter, R., Scherr, F.* und *Bayer, H.:* Die Überwachung der Risikoschwangerschaft anhand der Ausscheidung von Östriol-16-Glucuronid. Geburtsh. u. Frauenheilk. **36**, 256—262 (1976).
9. *Lewitzky, E.:* Diplomarbeit. FH-Gießen 1979.
10. *Kammerl, E.* und *Mutschler, E.:* Überprüfung der Einzeldosierung in der Arzneimittelqualitätskontrolle entsprechend dem Content Uniformity Test durch direkte quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen, 4. Mitteilung Pharmaz. Acta Helvetiae **50**, 269—274 (1975).
11. *Vogt, K.* und *Oehrle, K. L.:* Dünnschichtchromatographische Identifizierung und Bestimmung von Steroidöstrogenen und Stilbenderivaten in Kälberurin als Dansylester. Arch. Lebensmittelhyg. **28**, 44—50 (1977).
12. *Fishman, S.:* Determination of estrogens in dosage forms by fluorencence using dansylchlorid. J. Pharm. Sc. **64**, 674—680 (1975).
13. *Arndt, F.:* Dissertation. Universität Gießen (in Vorbereitung).
14. *Götz, Sachs, Wimmer:* Dünnschichtchromatographie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1978.
15. *Graef, V.:* Methode zur fluorometrischen Bestimmung von Oxosteroiden mit Dansylhydrazin. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. **8**, 320 (1970).
16. *Treiber, L.* und *Oertel, G. W.:* Zur Bestimmung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. **5**, 84—86 (1967).
17. *Boll, E.:* Diplomarbeit. FH-Gießen 1980.
18. *Kerler, R.:* Diplomarbeit. FH-Gießen 1981.
19. *Kawasaki, T., Maeda, M.* and *Tsuji, A.:* Determination of plasma and urinary cortisole by HPLC using fluorenscence derivatisation with dansylhydrazin. J. Chromatogr. **163**, 143—150 (1979).
20. *Funk, W., Kerler, R., Boll, E.* and *Dammann, V.:* High-performance thin-layer chromatographic determination of fluorescence-labelled cortisol. J. Chromatogr. **217**, 349—355 (1981).
21. *Uchiyama, S.* and *Uchiyama, M.:* Fluorescence enhancement in TLC by spraying vicous organic solvents. J. Chromatogr. **153**, 135—142 (1978).
22. *Scott, N. R.* and *Dixon, P. F.:* Determination of cortisol in human plasma by reversed-phase HPLC. J. Chromatogr. **164**, 29—34 (1979).
23. *Lautto, O.* et al.: Interlaboratory evaluation of 4 RIA-bits for determination of plasma Cortisol, with special reference to accuracy. Clin. Chem. **26**, 1899—1902 (1980).
24. *Vogt, H.:* Diplomarbeit. FH-Gießen 1980.
25. *Funk, W., Vogt, H., Dammann, V.* und *Weyh, C.:* Dünnschichtchromatographische Selenbestimmung. Vom Wasser **55**, 217—226 (1980).
26. *Funk, W., Vogt, H.* and *Dammann, V.:* Trace analysis of selenium in water. In: Bertsch, W., Hara, S., Kaiser, R. E., Zlatkis, A.: Instrumental HPTLC, S. 97—111. A. Hüthig Verlag, Heidelberg 1980.

27. *Quentin, K. E.:* Die Trinkwasserverordnung (Hrsg. K. Aurand), S. 127–133. Schmidt Verlag, Berlin 1976.
28. *Hall, R. J.* and *Gupta, P. L.:* The determination of very small amounts of selenium in plant samples. Analyst **94**, 292–299 (1969).
29. Analytical Methods Comittee: Determination of small amounts of selenium in organic matter. Analyst **104**, 778–787 (1979).

Prof. W. Funk
Fachhochschule Gießen-Friedberg
Wiesenstraße 14
D-6300 Gießen