

CHROM. 4742

SPEKTRALFLUOROMETRISCHE *IN SITU*-ANALYSE POLYCYCLISCHER AROMATEN NACH TRENNUNG AUF ACETYLIERTEN CELLULOSESCHICHTEN

I. MITT. QUALITATIVE UND QUANTITATIVE AUSWERTUNG*

L. TÓTH

Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach (B.R.D.)

(Eingegangen am 19. März 1970)

SUMMARY

Spectrofluorometric in situ analysis of polycyclic aromatic compounds after separation on acetylated cellulose layers. I. Qualitative and quantitative evaluation

The evaluation of polycyclic aromatic compounds, separated by thin-layer chromatography on acetylated cellulose, is described. *In situ* measurements of the fluorescence, excitation and emission spectra on thin-layer plates by means of a spectrofluorometer allow the identification as well as the determination of most of these substances. The limit of detection depends on the intensity of fluorescence of the aromatic compounds, and was estimated to be 0.1 to 0.001 μg on average. The error in the reproducibility in spotting the sample on the thin-layer plate is in the order of 10%. Standard curves show a fairly good linearity up to 0.2 μg of the substance. The results obtained from the standard curves, corrected by an external standard, are independent of the adjustment of the instrument.

EINLEITUNG

Die Bestimmung polycyclischer Aromaten gewinnt ein immer grösseres Interesse, denn viele dieser Substanzen sind krebserregend. Ihre Identifizierung wird häufig mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt, da die meisten Polycyclen eine charakteristische Fluoreszenz zeigen. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei 10^{-8} – 10^{-9} g/ml, daher ist ein sicherer Nachweis von mindestens 0.1 μg dieser Stoffe in der Probe möglich. Voraussetzung für die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie ist allerdings, dass nicht mehrere polycyclische Aromaten in der Messlösung vorliegen, da sie sich in ihrer Fluoreszenz durch Löschung, Überlagerung usw. stark gegenseitig beeinflussen. Die daher notwendige Trennung einer Vielzahl von polycyclischen Aromaten, wie sie z.B. im Rauch vorkommen, erfolgt mit Hilfe der kombinierten Anwendung verschiedener chromatographischer Trennsysteme. Der durch Ausschütteln mit Lösungsmitteln gereinigte Extrakt lässt sich säulenchromatographisch

* Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

an aktivem Aluminiumoxid¹⁻³ oder dünnschichtchromatographisch auf Silicagelplatten⁴ in mehrere Gruppen auftrennen. Da die einzelnen Gruppen in der Regel mehrere Aromaten enthalten, ist ihre simultane fluorometrische Auswertung nur in wenigen Fällen möglich. Zur weiteren Trennung eignet sich acetylierte Cellulose in Form von Papier³ oder Dünnschicht⁵. Auf diesem Material werden die Aromaten gut getrennt. Sie zeigen ausserdem eine wesentlich intensivere und differenziertere Fluoreszenz als auf Silicagel oder Aluminiumoxid. Es war daher zu erwarten, dass eine direkte qualitative und quantitative Auswertung solcher Dünnschichtchromatogramme *in situ* möglich ist.

Zur sicheren Identifizierung der Dünnschichtflecken ist die Aufnahme der Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren erforderlich, wie sie SAWICKI und Mitarbeiter⁶ bei gaschromatographisch vorgetrennten und auf Dünnschichtplatten kondensierten Substanzen vornahmen. BORNEFF UND FISCHER³ konnten bereits 1961 einige Aromaten durch direkte Aufnahme ihrer Emissionsspektren von acetyliertem Papier identifizieren. Die quantitative Auswertung fluoreszierender Dünnschichtflecken wurde schon bei mehreren Substanzgruppen unter Anwendung verschiedener Dünnschichtauswertegeräte⁷⁻¹⁰ mit Erfolg durchgeführt.

APPARATUR

Zur Ausführung der fluorometrischen Analysen stand ein Aminco-Bowman-Spectrophotofluorometer (American Instrument Co., Silver Springs, Md., U.S.A.) zur Verfügung^{11,12}. Ein aufsetzbares Dünnschichtauswertgerät erlaubt die Aufnahme der Spektren direkt von einer Dünnschichtplatte.

Zur Erzeugung eines kontinuierlichen Lichtes (ab 200 nm) dient eine Xenon-Hochdruck-Lampe. Die Anregungs- und Emissions-(Gitter)-Monochromatoren (200–800 nm) sind horizontal im 90°-Winkel zueinander angeordnet. Zur linearen Veränderung der Wellenlänge dienen zwei mit den Gittern gekoppelte Synchronmotoren. Bei Benützung des Dünnschichtauswertgerätes wird mit Hilfe eines an Stelle des Küvettenhalters angebrachten Spiegel- und Linsensystems der zur Fluoreszenzerzeugung dienende Lichtstrahl im Winkel von 90° nach oben geleitet. Die zur Auswertung vorgesehene Dünnschichtplatte liegt mit der Schicht nach unten auf einem horizontal angebrachten Kreuztisch. Trifft das durch einen engen Spalt (0.5 × 5 mm) austretende Anregungslicht auf einen Substanzfleck, so durchdringt das erzeugte Fluoreszenzlicht Adsorbenschicht und Glasplatte und wird durch eine Glasfaseroptik zum Emissionsmonochromator geleitet. Mit Hilfe eines Elektromotors kann der Kreuztisch mit konstanter Geschwindigkeit bewegt werden, wodurch die quantitative Auswertung der Dünnschichtflecken ermöglicht wird. Der Kreuztisch und die optischen Systeme befinden sich in einem lichtdicht verschliessbaren Kasten.

Da die Auflösung der Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren von der Spaltbreite entlang des Anregungs- und Emissionslichtweges abhängig ist, sind besonders angeordnete diskontinuierliche Spaltsysteme (von 0.5–5 mm) eingebaut. Als Photomultiplier wenden wir den IP-28 mit einer maximalen Empfindlichkeit bei 350 nm (Messbereich von 230 bis 600 nm) an. Der verstärkte Messstrom wird an einem Galvanometer angezeigt und von einem Schreiber ("Servogor" der Fa. Metrawatt, Nürnberg) registriert. Der Anschluss eines XY-Schreibers oder Oszillographen ist möglich.

VORBEREITUNG DER PROBE

Zur Isolierung und Reinigung der in verschiedenen Lebensmitteln, Wasser, Luftstaub, Rauchkondensat usw. vorkommenden polycyclischen Aromaten sind verschiedene Methoden beschrieben worden^{1-6,13}. Als besonders geeignet erwies sich ein von GRIMMER UND HILDEBRANDT^{1,2} ausgearbeitetes und auf verschiedene Lebensmittel angewandtes Verfahren. Die Aufarbeitung der von uns untersuchten Proben (Räucherammerruss, -teer, Rauchkondensat, geräucherte Fleischwaren usw.) erfolgt nach dieser Methode, die wie folgt durchgeführt wird:

- (a) Extraktion der zerkleinerten Proben mit Methanol und Cyclohexan,
- (b) Flüssig-flüssig-Verteilung zwischen Cyclohexan und N,N-Dimethylformamid (90% + 10% Wasser) und Rückführung der Aromaten in Cyclohexan,
- (c) Reinigung durch Säulenchromatographie an Silicagel.

Die Vortrennung der polycyclischen Aromaten in sechs Fraktionen führen wir bei Vorhandensein grösserer Mengen ($>0.5 \mu\text{g}$ je Komponente) über einer Aluminiumoxidsäule nach dem von GRIMMER UND HILDEBRANDT¹ beschriebenen Verfahren aus; bei geringeren Mengen verwenden wir Silicagel-Platten, wie sie von FRITZ⁴ empfohlen wurden. Beide Methoden ergeben eine ausreichende Vortrennung des Gemisches zu der nachfolgenden Feintrennung.

FEINTRENNUNG DER POLYCYCLISCHEN AROMATEN

Zur weiteren Auftrennung der einzelnen Fraktionen benutzen wir eine von KÖHLER UND EICHHOFF⁵ empfohlene Mischdünnschicht aus Aluminiumoxid und acetylierter Cellulose zur zweidimensionalen Chromatographie. Obwohl wir die Feintrennung der Aromaten nur eindimensional vornehmen, hat sich die Anwendung der Mischdünnschicht im Hinblick auf die Trennschärfe als vorteilhaft erwiesen.

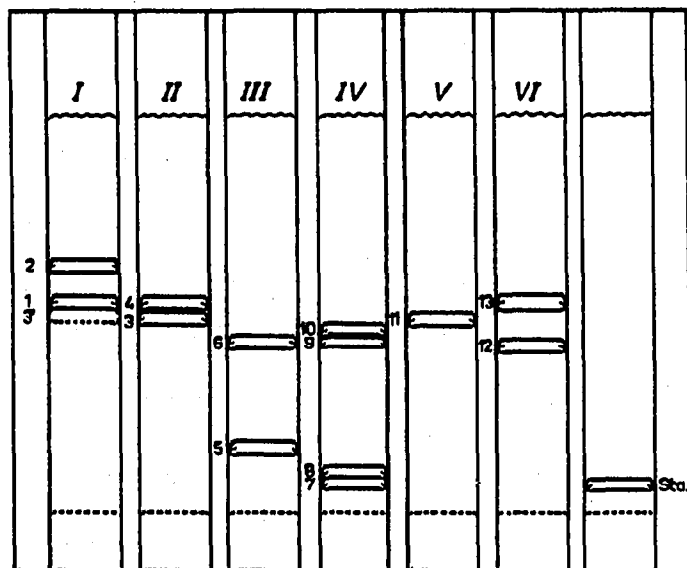


Fig. 1. Schematische Darstellung der Trennung einzelner aus Al_2O_3 -Säule gewonnene Fraktionen (I-VI) eines Testgemisches auf Al_2O_3 -acetylierten Cellulose-Mischplatten (1-13, siehe Tabelle I; Sta = Standard, $0.1 \mu\text{g}$ 3,4-Benzpyren).

Zur Herstellung der Mischplatten dient eine Mischung aus acetylierter Cellulose (MN 300 G/Ac 40% der Fa. Macherey, Nagel und Co.) und Aluminiumoxid (zur DC, neutral, Woelm) im Gewichtsverhältnis 2:1. Von diesem Gemisch werden 24 g in 30 ml Wasser und 30 ml Methanol mit einem Ultra-Turrax homogenisiert (60 sec) und zur Beschichtung von fünf Glasplatten (20 × 20 cm) mit einer Schichtdicke von 0.25 mm verwendet. Die vorerst an der Luft getrockneten Platten werden im Umlufttrockenschrank 1½ h bei 60° nachgetrocknet. Mit Hilfe eines Lineals und eines 3 mm breiten Spatels teilt man die Beschichtung in 2 cm breite Streifen auf (Fig. 1). Aliquote Anteile der eingeeengten Fraktionen aus der Aluminiumoxidsäule¹ oder aus der Silicagel-Platte⁴ und 0.1 µg 3,4-Benzpyren (Standard) werden in 2 cm Breite strichförmig auf die Startlinien aufgetragen.

Fig. 1 zeigt die Verteilung und Trennung des von GRIMMER UND HILDEBRANDT¹ vorgeschlagenen Testgemisches (bestehend aus dreizehn der am häufigsten vorkommenden polycyclischen Aromaten) auf der von uns benutzten Dünnschichtplatte, nach der vorangehenden Auftrennung in sechs Fraktionen (I–VI) auf einer Al₂O₃-Säule.

Ein gleichmässiges Auftragen ist hinsichtlich der Trennschärfe und Genauigkeit der Auswertung sehr wichtig. Als Laufmittel dient eine Mischung aus Methanol–Toluol–Essigsäureäthylester–Isobutylalkohol–Wasser (60:5:10:5:15). Die Höhe des ersten Laufes beträgt ca. 18 cm. Eine zwei- oder dreimalige Entwicklung der Platte nach Zwischentrocknen verbessert die Trennung wesentlich.

Die einzelnen Substanzzonen werden unter der UV-Lampe (lang- und kurzwellig) an beiden Enden mit kurzen Strichen markiert (Fig. 1).

AUFNAHME DER FLUORESZENZ-ANREGUNGS- UND EMISSIONSSPEKTREN

Die Dünnschichtplatte wird mit der Schicht nach unten auf den Kreutztisch des Dünnschichtauswertgerätes gelegt. Der durch einen 0.5 mm breiten und 5 mm langen Spalt begrenzte Anregungslichtstrahl soll die Substanzbande in der Längsrichtung und in ihrer Mitte treffen. Die Glasfaseroptik soll wegen der erreichbaren höheren

TABELLE I

ANREGUNGS- UND EMISSIONSWELLENLÄNGEN POLYCYCLISCHER AROMATEN ZUR AUFNAHME IHRER ORTSKURVEN

Nr.	Polycyclische Aromaten	Anregung bei (nm)	Emission bei (nm)
1	Phenanthren	295	410
2	Anthracen	378	430
3	Pyren	338	415
4	Fluoranthren	360	465
5	Chrysen	322	408
6	1,2-Benzanthracen	354	412
7	3,4-Benzpyren	388	430
8	3,4-Benzfluoranthren	355	452
9	Perylen	414	446
10	1,2-Benzpyren	332	408
11	1,12-Benzperylen	388	430
12	1,2:5,6-Dibenzanthracen	351	420
13	Coronen	308	452

Empfindlichkeit in 90° (Stellung für Messung der Transmission) und nicht in der vom Hersteller angegebenen 45° -Stellung zur Platte eingesetzt werden. Die Einstellung der Wellenlänge an den Anregungs- und Emissionsmonochromatoren ist von der zu messenden Substanz abhängig (Tabelle I). Durch wechselndes Verstellen der Wellenlänge wird bei unbekanntem Substanzen die maximale Fluoreszenzintensität ermittelt.

Vor der Aufnahme der Anregungsspektren müssen die Spalten im Strahlengang des Anregungslichtes möglichst eng (0.5 mm) eingestellt werden, um eine ausreichende Auflösung der Spektren zu erreichen. Die Spaltsysteme des Emissionsmonochromators sollen möglichst weit geöffnet sein, um gut messbare Fluoreszenzintensitäten zu erhalten. Die Anregungsspektren werden durch kontinuierliche Veränderung der Wellenlänge (ab 200 nm) des Anregungslichtes bei der für eine maximale Fluoreszenz-

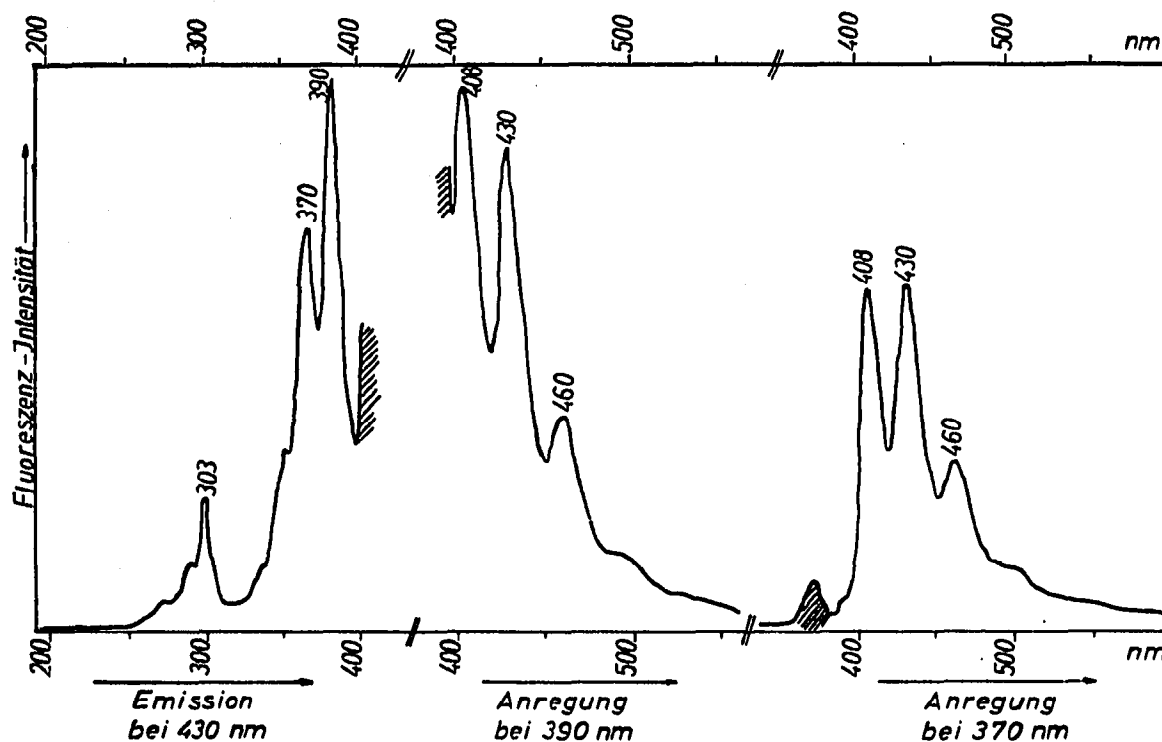


Fig. 2. Anregungs- und Emissions-Spektrum von 3,4-Benzpyren an acetylierten Cellulose-Mischplatten (Konz. 0.01 $\mu\text{g}/\text{Bande}$).

ausbeute notwendigen Einstellung des Emissionsmonochromators aufgenommen (Fig. 2). An Hand des Anregungsspektrums bestimmt man nun den zur Erzeugung der maximalen Fluoreszenzintensität notwendigen Wellenlängenbereich genauer. Dieser wird dann am Anregungsmonochromator eingestellt.

Vor der Aufnahme des Emissionsspektrums wird durch Vergrößerung des Austrittsspalt am Anregungsmonochromator (auf 3–5 mm) für ein intensiveres Anregungslicht und durch Einstellung sehr enger Eintritts- und Austrittspalte am Emissionsmonochromator für eine gute Auflösung des Spektrums gesorgt. Falls nicht zu starkes Streulicht auftritt, stellt man die Anfangswellenlänge am Emissionsmonochromator niedriger als die des Anregungsmonochromators ein, andernfalls sollte die

Wellenlänge so niedrig eingestellt werden, wie es das Streulicht zulässt (Fig. 2). Durch kontinuierliche Veränderung der Wellenlängeneinstellung des Emissionsmonochromators bei konstanter Anregungswellenlänge und gleichzeitiger Registrierung der Fluoreszenzintensitätsänderungen erhält man das Emissionsspektrum der Substanz (Fig. 2).

AUFNAHME DER FLUORESZENZ-ORTSKURVEN

Das strichförmige Auftragen der einzelnen Fraktionen bewirkt, dass nach der Entwicklung der Platte die einzelnen Substanzen bandenförmig getrennt vorliegen. Das Auswertungsprinzip ist das gleiche wie bei der Elektrophorese⁷. Die Dünnschichtplatte wird mit konstanter Geschwindigkeit durch den Anregungslichtstrahl des Auswertgerätes gefahren. Hierbei wird ein aliquoter Anteil der Substanzbande von dem 0.5 mm breiten und 5 mm langen Anregungslichtstrahl kontinuierlich erfasst. Bei laufender Registrierung der Fluoreszenzintensitätsänderung mit einem Linear-schreiber erhält man die entsprechenden Ortskurven (Fig. 3).

Bei der quantitativen Auswertung stellt man an dem Monochromator die zur Erzeugung der maximalen Fluoreszenzintensität erforderlichen stoffspezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen ein. Falls zu starkes Streulicht störend wirkt, wählt man eine höher liegende Emissions- oder eine niedrigere Anregungsbande (Tabelle I). Da praktisch jeder der zu untersuchenden polycyclischen Aromaten eine andere ideale Anregungs- und Emissionswellenlänge besitzt, wird eine Trennungsreihe so oft und bei so vielen Monochromatoreneinstellungen durchfahren, wie Substanzen quantitativ zu bestimmen sind.

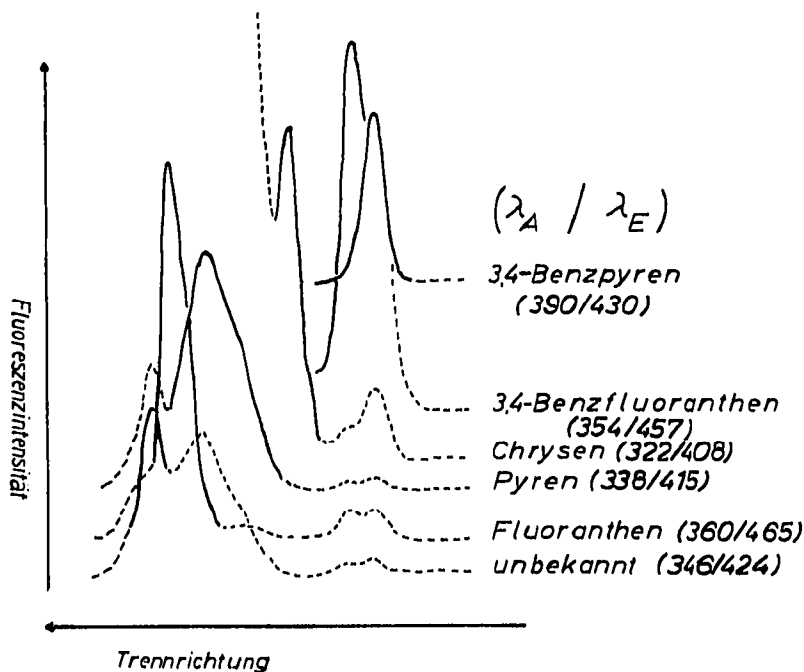


Fig. 3. Registrierung der Fluoreszenzortskurven einer Trennreihe (ca. 0.01 bis 0.3 μg je Komponente) bei substanzspezifischer Anregungs- und Emissionswellenlängen (λ_A = Anregungs-; λ_E = Emissionswellenlänge).

Wie Fig. 3 zeigt, gelingt auf diese Weise eine fast störungsfreie und sehr empfindliche Aufnahme der Ortskurven auch bei nicht vollständig getrennten Substanzbanden, wie es z.B. bei 3,4-Benzpyren und 3,4-Benzfluoranthren oder Pyren und Fluoranthren der Fall sein kann. Ist die Konzentration entlang den 2 cm langen Banden nicht ganz gleichmässig verteilt, so empfiehlt es sich, die Messung der einzelnen Substanzbanden an drei Stellen der Zone zu wiederholen und bei der Auswertung den Mittelwert zu bilden.

Bei der Aufnahme der Ortskurven müssen alle Messbedingungen konstant gehalten werden, da nur so vergleichbare Messgrössen zu erwarten sind. Man hält daher Spaltsystem, Photomultiplier, Empfindlichkeits- und Schreibereinstellung konstant, so dass nur die elektronische Abschwächung des maximalen Verstärkungsgrades in konstanten Proportionen (z.B. 1:3.0; 1:10; 1:30 usw.) mit Hilfe des Meter-Multipliers stattfindet. Bei der Aufnahme der Ortskurven wenden wir folgendes Spaltsystem an: 5; 0.5; 0.5-Platte-0.5; 0.5 mm. Bei dieser engen Spalteinstellung ist die Registrierung von $0.01 \mu\text{g}$ 3,4-Benzpyren, verteilt auf einer 2 cm langen Bande, mit einem 70-80%igem Skalenausschlag bei maximaler Verstärkereinstellung (Meter-Multiplier: 0.001; Sensitivity: 20) möglich. Bei konstantem Kreuztischvorschub von 7.5 cm/min und Papiervorschub von 12 cm/min erhält man gut auswertbare Ortskurven.

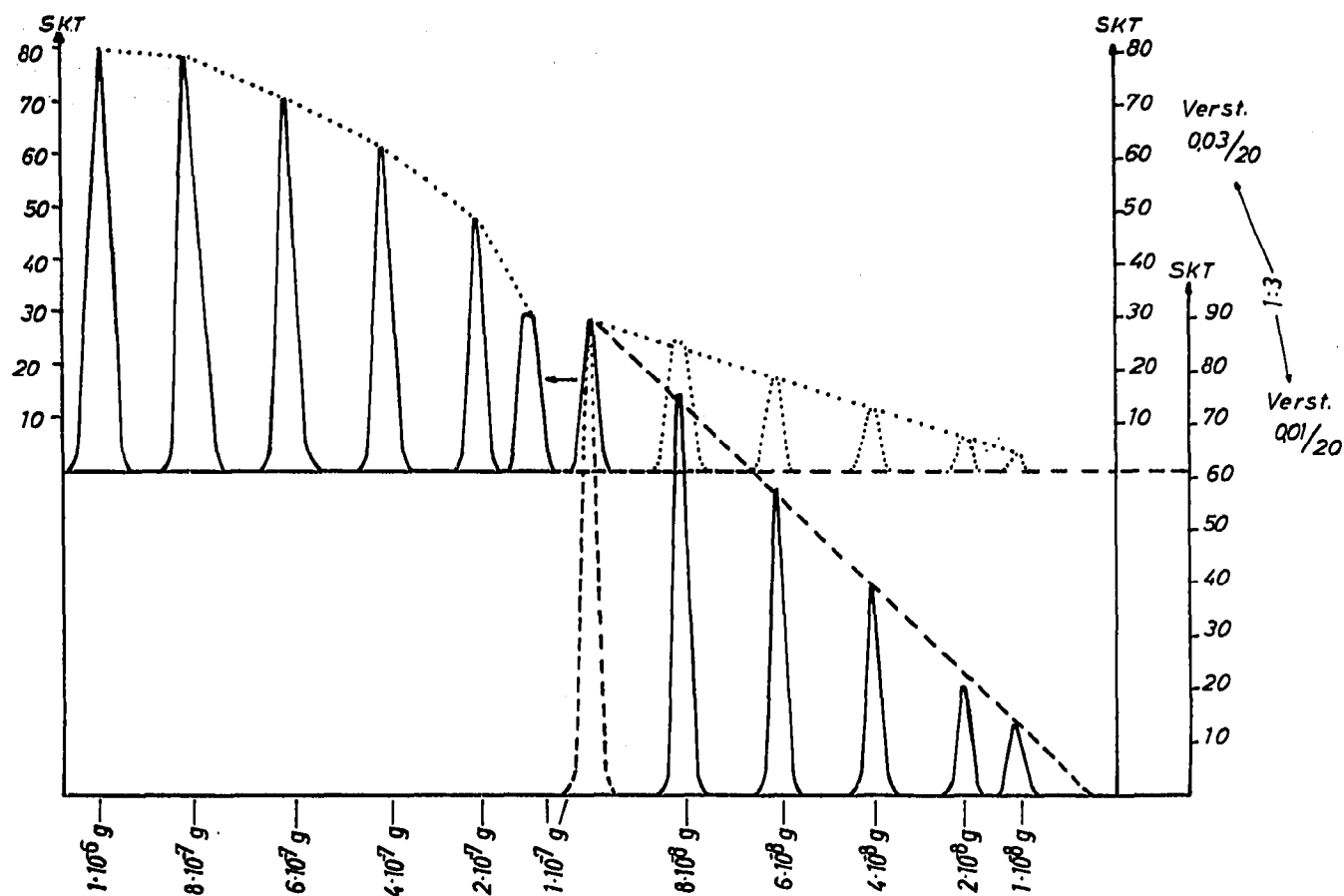


Fig. 4. Proportionalität zwischen Mengen von 3,4-Benzpyren und ihre Fluoreszenzortskurven (bei 10^{-7} g/Bande wurde die Verstärkung verdreifacht).

AUSWERTUNG DER ORTSKURVEN

Zur quantitativen Auswertung der Ortskurven ist die Kenntnis der Beziehungen zwischen Substanzmenge und Grösse der Ortskurven unerlässlich. Fig. 4 zeigt die Ortskurven unterschiedlicher Mengen an 3,4-Benzpyren. Eine lineare Beziehung zwischen Höhe der Ortskurven und Substanzmenge ist nur im Bereich von 0.01 bis 0.1 μg /Bande zu beobachten. Ab 0.2 μg wird der Höhenunterschied immer kleiner, die Breite der Ortskurven nimmt dagegen zu. Da sich die Breite der einzelnen Banden— und somit der Ortskurven— auch von Platte zu Platte verändert, wobei Durchmesser der Auftraglinie, Laufstrecke, Zahl der Entwicklungen usw. eine Rolle spielen, muss die Breite der aufgezeichneten Ortskurven zur Auswertung herangezogen werden.

Wir fanden, dass durch Multiplikation der gemessenen Fluoreszenzintensitätsmaxima (in Skalenteilen) und der korrigierten Fussbreite der Ortskurven B (in cm; Fig. 5) ein zur quantitativen Berechnung geeigneter Flächenwert (FIW) entsteht. Um die durch unterschiedliche Dicke der Schicht und der Glasplatte und durch unvermeid-

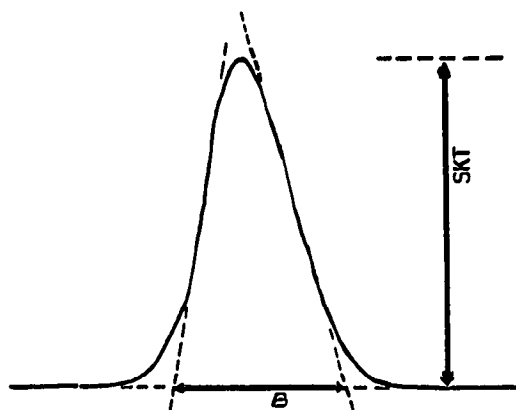


Fig. 5. Auswertung der Fluoreszenzortskurven nach Höhe (in SKT = Skalenteilen) und korrigierter Fussbreite (B , in cm).

liche apparative Veränderungen (z.B. bei der Xenonlampe, Photomultiplier usw.) bedingten Abweichungen zu kompensieren, müssen die Flächenwerte mit einem aus dem auf derselben Platte mitchromatographierten Standard (0.1 μg 3,4-Benzpyren) berechneten Faktor (F) multipliziert werden.

$$F = \frac{100}{\text{FIW des Standards}}$$

Bei 15 Messungen schwankte dieser Faktor z.B. zwischen 0.96 und 1.31 (Mittel 1.08).

Bei den von uns gewählten Messbedingungen ist zur Registrierung der Fluoreszenzintensität des Standards eine Abschwächung der maximalen Verstärkung von 1 zu 10 erforderlich. Zur Berechnung der Gesamtfluoreszenzintensität (GFI = Intensität bei maximaler Verstärkung) für 0.1 μg 3,4-Benzpyren muss der auf 100 korrigierte Flächenwert mit 10 multipliziert werden. Somit weist er eine GFI von 1000 auf (Fig. 6).

Die Berechnung der Gesamtfluoreszenzintensität aus den Ortskurven unbekannter Mengen erfolgt wie beim Standard:

$$\text{GFI} = \text{SKT} \times B \times F \times \text{Abschwächung.}$$

Zur Ermittlung der Substanzmengen, welche auf der Dünnschicht vorliegen, werden die Eichkurven verwendet (Fig. 6).

Zur Aufstellung der Eichkurven haben wir die einzelnen Substanzen in verschiedenen Mengen nach der beschriebenen Methode mehrfach chromatographisch ausgewertet und die Ergebnisse in ein doppeltlogarithmisches System eingetragen. Je nach Fluoreszenzintensität der einzelnen polycyclischen Aromaten verlaufen die Kurven zwar in unterschiedlichen Messbereichen, aber alle mit einer Neigung von *ca.* 45°, wenn ihre Menge unterhalb der 0.1 μg /Bande liegt. Bei grösseren Mengen flachen die Kurven ab, wie es nach Angaben von DANCKWORTT UND EISENBRAND¹⁴ bei Messungen in Lösungen zu erwarten ist. Eine quantitative Auswertung ist bei

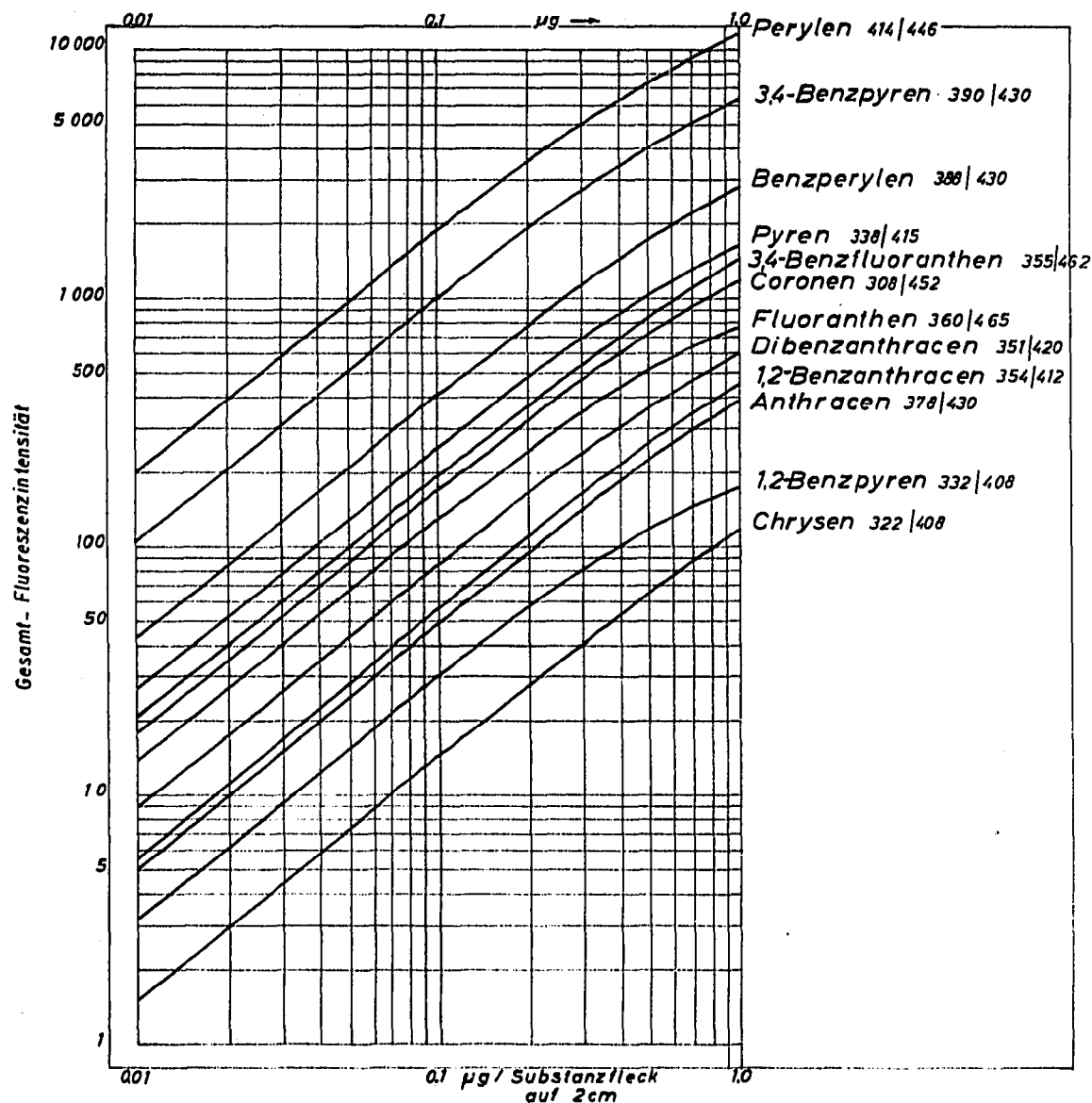


Fig. 6. Eichkurven verschiedener polycyclischer Aromaten im doppeltlogarithmischen System zur Ermittlung ihrer Menge auf den Al_2O_3 -acetylierten Cellulose-Mischplatten, bei 2 cm Breite strichförmiger Auftragung und den angegebenen Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Mengen über 2–3 μg nicht mehr möglich. Falls Substanzmengen unterhalb von 0.01 μg /Bande vorliegen sollten, erfolgt ihre Berechnung aus der in diesem Mengenbereich linearen Beziehung zwischen Gesamtfluoreszenzintensität und Menge. Bei Substanzmengen über 1 μg ist die Trennung mit kleineren Mengen zu wiederholen oder nach Extraktion des Fleckes durch UV- oder Fluoreszenz-Spektroskopie quantitativ zu ermitteln^{1,4}.

GENAUIGKEIT DER METHODE

Die Nachweisempfindlichkeit einzelner polycyclischer Aromaten ist durch ihre Fluoreszenzintensität begrenzt. Aromaten, die auf acetylierter Celluloseschicht sehr intensiv fluoreszieren, wie z.B. Perylen, 3,4-Benzpyren, 1,12-Benzperylen, Pyren usw., sind noch in ng-Mengen sehr gut nachzuweisen. Crysen, 1,2-Benzpyren, Anthracen, die nur schwach fluoreszieren, sind erst in Mengen über 0.1 μg , Phenanthren erst ab 1 μg zu erfassen.

Diese sehr unterschiedliche Nachweisempfindlichkeit beeinflusst die Genauigkeit der quantitativen Auswertung *in situ* sehr wesentlich. Die Reproduzierbarkeit der Messung und Auswertung bei der Chromatographie bekannter Mengen wies eine $\pm 10\%$ ige Abweichung auf. Dies ist auf die Schwierigkeit der Auftragung quantitativer Mengen von Testgemischen mit Hilfe der von uns benutzten Mikropipetten zurückzuführen.

Mit der hier beschriebenen Methode konnten 75–85% der eingesetzten polycyclischen Aromaten (0.1 μg je Komponente) wiedergefunden werden. GRIMMER UND HILDEBRANDT¹ geben eine 95–100%ige Wiederfindung bei Anwendung der simultanen UV-spektroskopischen Methode an. Die eingesetzten Substanzmengen betragen allerdings im Gegensatz zu unseren Versuchen mehrere μg je Komponente. Die von uns gefundenen höheren Verluste sind weitgehend mit der Schwierigkeit der quantitativen Übertragung der einzelnen Fraktionen auf die Dünnschicht zu erklären. Bei Anwendung eines automatischen Auftragegerätes dürften sowohl die Reproduzierbarkeits- als auch die Wiederfindungsfehler wesentlich gemindert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Auswertung der auf Dünnschicht (acetylierten Cellulose) getrennten polycyclischen Aromaten mit Hilfe eines Spektralphoto fluorometers *in situ* erlaubt die Aufnahme der Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren und somit ihre sichere Identifizierung, sowie die simultane quantitative Bestimmung einer Grosszahl von Substanzen. Die Nachweisbarkeitsgrenze liegt je nach Fluoreszenzintensität der Aromaten zwischen 0.1 und 0.001 μg . Die Reproduzierbarkeit bei bandenförmiger Auftragung weist 10% Fehler auf. Die angegebenen Eichkurven verlaufen bis ca. 0.2 μg Substanz/Bande weitgehend linear und können bei Benutzung eines externen Standards unabhängig von apparativen Veränderungen verwendet werden.

LITERATUR

- 1 G. GRIMMER UND A. HILDEBRANDT, *J. Chromatog.*, 20 (1965) 89.
- 2 G. GRIMMER UND A. HILDEBRANDT, *Z. Krebsforsch.*, 69 (1967) 223.
- 3 J. BORNEFF UND R. FISCHER, *Arch. Hyg.*, 145 (1961) 241.

- 4 W. FRITZ, *Nahrung*, 12 (1968) 639.
 - 5 M. KÖHLER UND H. J. EICHHOFF, *Z. Anal. Chem.*, 232 (1967) 401.
 - 6 E. SAWICKI, T. W. STANLEY, S. MCPHERSON UND M. MORGAN, *Talanta*, (1966) 619.
 - 7 R. KLAUS, *J. Chromatog.*, 40 (1969) 235.
 - 8 R. KLAUS, *Pharm. Ztg.*, 112 (1967) 480.
 - 9 W. MESSERSCHMIDT, *J. Chromatog.*, 39 (1969) 90.
 - 10 K. POTTHAST UND R. HAMM, *J. Chromatog.*, 42 (1969) 558.
 - 11 *Das moderne Labor*, Nr. 3, Colora Messtechnik GmbH., 7073 Lorch (Württ.), 1966.
 - 12 *Instruction No. 768 G, Aminco Bowman Spectrophotofluorometer*, American Instrument Co., Inc., Silver Springs, Md. U.S.A.
 - 13 J. W. HOWARD, R. T. TEAGUE, R. H. WHITE UND B. E. FRY, JR., *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 49 (1966) 595.
 - 14 P. W. DANCKWORTT UND J. EISENBRAND, *Lumineszenz-Analyse im filtrierten UV-Licht*, 7. Aufl., Geest und Portig, Leipzig, 1964.
- J. Chromatog.*, 50 (1970) 72-82