

# ANGEWANDTE CHEMIE

91. Jahrgang 1983

Heft 7

Seite 515–578

## Ein Vierteljahrhundert Dünnschicht-Chromatographie – eine Zwischenbilanz

Von Egon Stahl\*

Seit 1958 wird die Dünnschicht-Chromatographie (DC, TLC) allgemein angewendet. Voraussetzungen dafür waren die Verwendung eines sehr feinkörnigen Materials zur Schichtherstellung und der Nachweis, daß nicht nur die Trennung lipophiler Stoffgemische, sondern auch von Herzglycosiden, Alkaloiden, Zuckern, Aminosäuren etc. auf dünnen Silica-geschichten schnell und einfach möglich ist. Beeindruckt von den Trennleistungen der Methode versuchte man später, Sorptionsmittel mit geringer und eng fraktionierter Korngröße auch in der Säulen-Chromatographie zu benutzen. Um genügend Durchfluß zu erreichen, brauchte man höhere Drücke: Die Hochdruck- oder Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) war somit aus der Taufe gehoben. In apparativer Hinsicht stand ihr die Gaschromatographie (GC) Pate. – Die chromatographischen Verfahren werden heute nach der Transportphase eingeteilt: Flüssigkeits-, Gas- und „Elektro“-Chromatographie. Oft erfordert die Probenvorbereitung mehr Zeit als die eigentliche Chromatographie. Für die DC-Methode haben thermische Schnellabtrenn- und Auftrageverfahren wesentliche Vorteile erbracht. Die Kunst des Chromatographierens besteht nach wie vor darin, die stationäre Phase auf die mobile Phase und beide auf die Trenntechnik abzustimmen. Neue Möglichkeiten bietet die Gradient-DC, z. B. lassen sich mit Gradientschichten selektiv Informationen über einzelne Komponenten eines Gemisches erhalten und auch beachtliche Fokussierungseffekte erzielen. Die Sequenz-DC und die Zentrifugal-DC haben weitere Fortschritte angebahnt. Es stellt sich die Frage, ob die vor 25 Jahren formulierten Standardbedingungen der DC noch gelten und wie die Variationen zu beurteilen sind. Neben den universellen werden gruppen- oder substanzspezifische Detektionsmöglichkeiten diskutiert. Die quantitative Auswertung wird kritisch untersucht, wobei sich im Vergleich für die HPLC-Methoden bessere Zukunftschancen abzeichnen. Kombinations- und Kopplungsverfahren erleichtern eine sichere Substanzidentifizierung. In einem Ausblick werden die Gründe untersucht, warum DC das einfachste, vielseitigste, unter dem Kosten-Nutzen-Aspekt günstigste und am meisten angewendete chromatographische Trennverfahren ist und auf lange Sicht bleiben wird.

### 1. Historische Einleitung

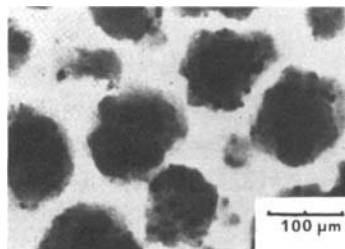
Das Prinzip der Dünnschicht-Chromatographie, nämlich eine dünne Trennschicht auf einer Glasplatte, ist nun

schon nahezu 100 Jahre bekannt (vgl. Tabelle 1). Man fragt sich, warum weder die Pionieruntersuchung von *Bey-erinck*<sup>[1]</sup> noch die danach veröffentlichten Beiträge zu einer allgemeinen Anwendung der Methode führten. Auch meine erste Arbeit über dieses physikalisch-chemische Stofftrennungsverfahren aus dem Jahre 1956<sup>[6]</sup> mit dem damals neuen Titel „Dünnschicht-Chromatographie“ blieb

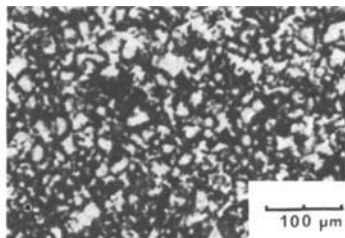
[\*] Prof. Dr. E. Stahl  
Pharmakognosie und Analytische Phytochemie der Universität  
D-6600 Saarbrücken

ebenso unbeachtet wie ihre Vorläufer. Der Durchbruch gelang erst, als die Firma Merck zur Herstellung eines speziellen Silicagels (Kieselgels) für die Dünnschicht-Chromatographie (DC, TLC) und die Firma Desaga zur Herstellung einer sogenannten Grundausrüstung mit Zubehör bewogen werden konnten. Beides wurde erstmals 1958 auf der Internationalen Chemie-Ausstellung (ACHEMA) in

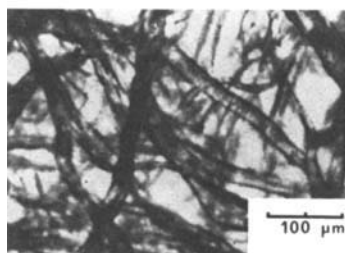
Säulenchromatographie  
auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$



Dünnschicht - Chromatographie auf Kieselgel



Papierchromatographie



auf Cellulose

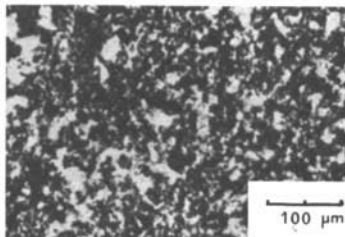


Fig. 1. Größenvergleiche zwischen Sorptionsmitteln der klassischen Säulenchromatographie, der Papierchromatographie und der Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel (rechts oben) und Cellulose (rechts unten).

Frankfurt am Main präsentiert und erregte großes Interesse. Die Dünnschicht-Chromatographie wurde bald unter den vorgeschlagenen Standardbedingungen allgemein benutzt<sup>[7]</sup>. Der eigentliche wissenschaftliche Fortschritt besteht aber nicht etwa in der Möglichkeit zur Herstellung dünner Schichten, sondern vielmehr darin, daß aufgrund unserer jahrelangen Versuche ein sehr viel feinkörnigeres Material als je zuvor in der Chromatographie als stationäre Phase verwendet wurde (vgl. Fig. 1). Die ersten handelsüblichen Sorptionsmittel für die DC entsprachen allerdings noch nicht allen Wünschen; hinderlich waren insbesondere die schwierigen Herstellungstechniken für feinkörnige und enge Fraktionen.

Tabelle 1. Entwicklung der Dünnschicht-Chromatographie.

Jahr	Autoren	Versuch/Methode/Fortschritt	Lit.
1889	Beyerinck	Einfacher Diffusionsversuch	[1]
1938	Izmailov, Schraiber	Tropfenchromatographie	[2]
1949	Meinhard, Hall	Surface-Chromatographie	[3]
1951	Kirchner, Miller, Keller	Chromatostrip-Technik	[4]
1954	Reitsemä	Chromatoplate-Technik	[5]
1956	Stahl	Dünnschicht-Chromatographie	[6]
1958	Stahl	DC-Standardisierung, Grundausrüstung, Kieselgel G Merck	[7]
1962	Stahl (Hrsg.), Bolliger, Brenner, Gänshirt, Mangold, Seiler, Waldi	DC-Laboratoriumshandbuch	[8]

Ein weiterer Fortschritt auf dem Gebiet der DC besteht darin, daß die Methode nicht auf Terpene<sup>[4]</sup> beschränkt blieb, sondern auch eine Art Verteilungschromatographie, z. B. von Herzglycosiden, Saponinen, Alkaloiden, Aminosäuren und Zuckern auf dünnen Silicagelschichten möglich ist. So konnte der Anwendungsbereich auf zahlreiche Stofftrennungsprobleme der Chemie, der Biologie und der Medizin erweitert werden. 1962 erschien das erste Laboratoriumshandbuch der Dünnschicht-Chromatographie, ein Gemeinschaftswerk von Spezialisten, das zur weiteren Verbreitung der DC wesentlich beitrug<sup>[8]</sup>.

Nahezu parallel mit der Weiterentwicklung der Dünnschicht-Chromatographie ging die instrumentelle Entwicklung der Gaschromatographie (GC) vor sich. Es brauchte seine Zeit, bis man erkannte, daß die GC keine Universal-Trennmethode ist und es auch noch die klassische Tswettische Säulenchromatographie gibt. Stimuliert von der Trennleistung der feinkörnigen Trennschichten der DC blieben Versuche nicht aus, mit diesem Material auch Säulen zu füllen. Da durch derartig enggepackte Säulen natürlich fast nichts mehr hindurchläuft, mußte man das Lösungsmittel mit Druck hindurchpressen: Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie war also eine zwangsläufige Folge der feinkörnigen Sorptionsmittel. Ohne Zweifel hat die Dünnschicht-Chromatographie auf diese Weise die Weiterentwicklung der Chromatographietechniken wesentlich beeinflusst. Ein Karikaturist sieht vielleicht die Entwicklung, wie sie in Figur 2 veranschaulicht ist.

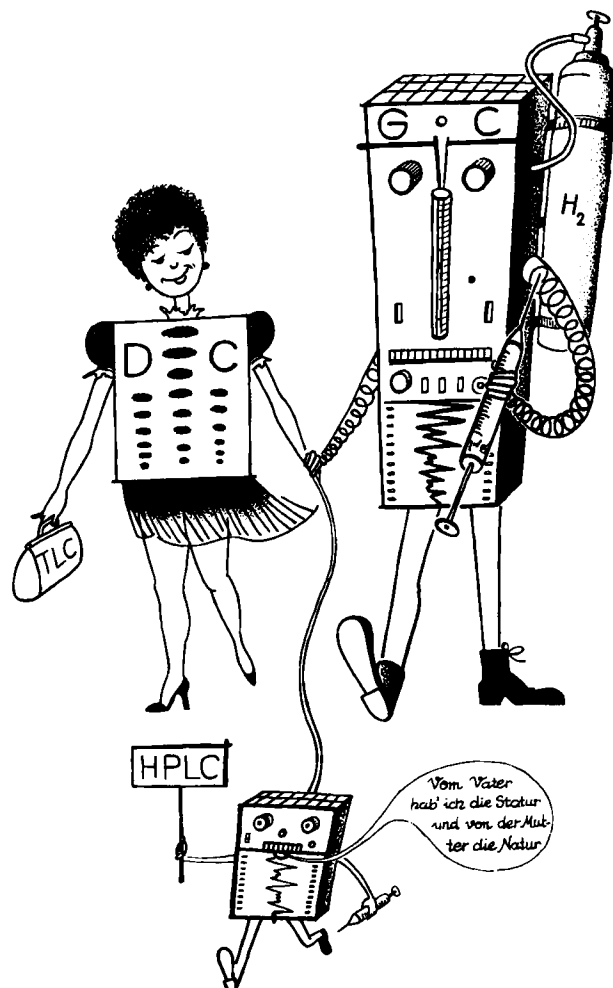


Fig. 2. Eine glückliche Familie.

## 2. Chromatographische Verfahren heute

Für einen aktuellen Überblick über die chromatographischen Verfahren ist es zweckmäßig, sie nach der „Transport“-Phase in drei große Gruppen einzuteilen, nämlich die Flüssig-, Gas- und Elektro-Chromatographie (Fig. 3). Zur Gruppe der Flüssigkeitschromatographie oder Flüssigchromatographie gehören so die klassische Säulenchromatographie, die Papierchromatographie, die Dünnschicht-Chromatographie und die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie sowie die Ausschlußchromatographie.

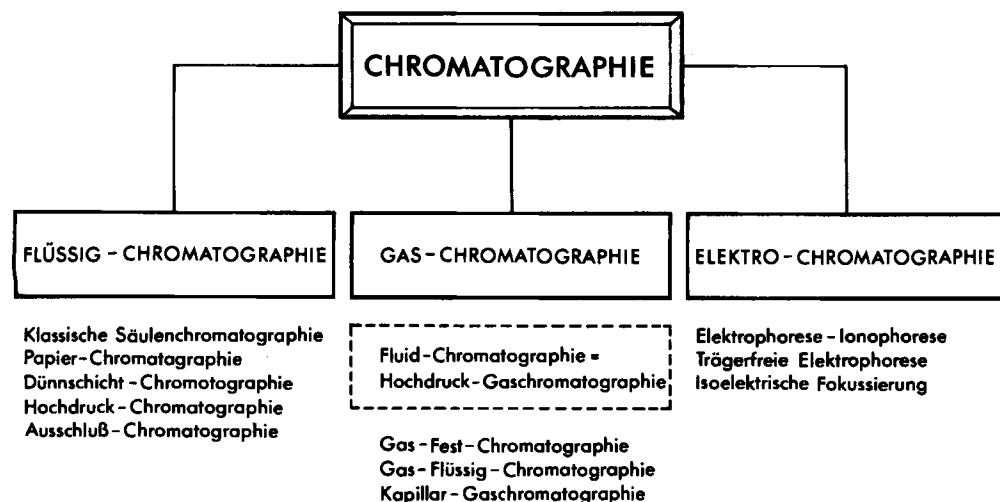


Fig. 3. Einteilung der chromatographischen Verfahren nach der verwendeten mobilen Phase.

Will man die Fortschritte in der Chromatographie objektiv vergleichen, so muß man diese an sich komplexe Methode zunächst in ihre drei Teile zerlegen und jeden Teil für sich analysieren. Figur 4 zeigt die drei Hauptbestandteile jeder Chromatographie und die dazugehörigen Schritte davor und danach. In allen fünf Abschnitten wurden in den letzten Jahrzehnten unterschiedlich große Fortschritte erzielt.

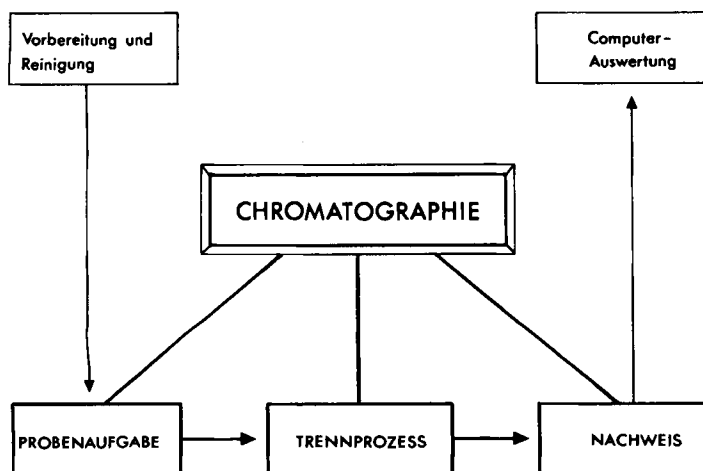


Fig. 4. Die Chromatographie ist ein aus drei Teilen bestehendes Verfahren; hinzu kommen die Probenvorbereitung und die quantitative Auswertung.

Die Erfahrung lehrt, daß oftmals die Probenvorbereitung, die Reinigung und die Herstellung der Aufträge

oder Injektionslösung mehr Zeit beanspruchen als die eigentliche Chromatographie. Dies ist auch der Grund, weshalb wir uns seit 1968 mit Methoden beschäftigten, die ohne Lösungsmittel die Substanzen von der Probe direkt (on line) auf die DC-Schicht transportieren. Unter anderem kommen hierfür thermische Verfahren und die Mikroextraktion mit überkritischen Gasen in Frage. Mit dem Thermo-Mikro-Abtrennverfahren (TAS) kann man neben den ätherischen Ölen aus Drogen auch zahlreiche andere Substanzen in 1–2 min direkt auf die DC-Schicht übertragen<sup>[9,10]</sup>. Die weitere Entwicklung führte zur Thermofrak-

tographie (TFG)<sup>[11]</sup>, einem Verfahren, das bisher relativ wenig angewendet worden ist.

## 3. Die Parameter der Chromatographie

Die *Probenaufgabe* (vgl. Fig. 4) ist für das Gelingen der Chromatographie wichtig und der erste Schritt. Sie muß sich nach den speziellen Problemen und nach der Empfindlichkeit des Nachweises richten. Man kann zwar die Probemenge mehr und mehr verringern, muß sich jedoch dann im klaren sein, daß NebenkompONENTEN zumeist nicht mehr entdeckt werden können, da die Empfindlichkeit des Nachweises dafür nicht ausreicht. Es ist eine Faustregel: Wenn die Reinheit einer Substanz zu prüfen ist, so sollte man relativ viel aufragen, um NebenkompONENTEN zu erkennen; liegen jedoch Substanzgemische vor, so reduziert man die Auftragemenge, um eine bessere Übersicht zu erhalten. Die Auftragegeräte sollen in einer angemessenen Kostenrelation zum gewünschten Erfolg stehen. Bemerkenswert ist, daß das manuelle strichförmige Auftragen, wie es das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) in den meisten Fällen vorsieht, zu verbesserten Chromatogrammen und zu klareren qualitativen Auswertungen führt.

Das eigentliche Herz der Chromatographie ist der *Trennprozeß* (Fig. 4). In Figur 5 ist schematisch die Vielfalt seiner Variablen in der Dünnschicht-Chromatographie angegeben. Die Kunst des Chromatographierens besteht bekanntlich darin, die zahlreichen Möglichkeiten so aufeinander abzustimmen, daß eine optimale Trennung erreicht wird.

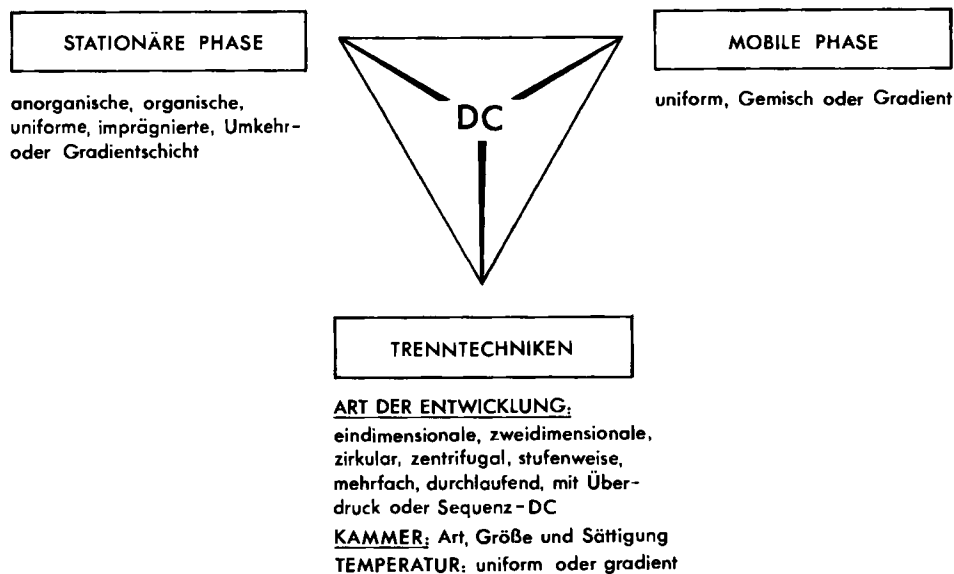


Fig. 5. Die zahlreichen variablen Parameter der Dünnschicht-Chromatographie, die zur Erzielung optimaler Bedingungen aufeinander abgestimmt werden müssen.

Das Schema zeigt, daß zunächst drei Parameter zu beachten sind, nämlich die Wahl der *stationären* und der *mobilen Phase* sowie die Auffindung der am besten geeigneten *Trenntechnik*. Der besondere Vorteil der Dünnschicht-Chromatographie ist, daß man in einfacher Weise diese Parameter aufeinander abstimmen und am Trennerfolg schnell kontrollieren kann. Die Einführung der vorfabrizierten Trennschichten Anfang der sechziger Jahre ist sicherlich ein Fortschritt im Hinblick auf die Weiterverbreitung der Methode. Es bleibt zu wünschen, daß noch mehr und andersartige Schichten mit anderen Trenneigenschaften auf den Markt kommen. Ein Fortschritt in diese Richtung ist die industrielle Herstellung von derivatisiertem Silicagel (RP-Phasen), das eine Phasen-Umkehr-Chromatographie ohne Imprägnierung der Schicht ermöglicht. Derartigen Sorptionsmitteln und Fertigschichten kann man eine gute Zukunft voraussagen. Erwünscht ist auch, daß Gradientschichten industriell herstellbar wären. Ein Schritt in diese Richtung sind die Schichten mit einer sogenannten Konzentrierungszone. Die Einführung von Gra-

dientschichten war ein Meilenstein in der Weiterentwicklung der Dünnschicht-Chromatographie<sup>[12-14]</sup>. Welche neuen Möglichkeiten dadurch erschlossen wurden, sei an wenigen Beispielen im folgenden demonstriert.

Auf einer Gradientschicht stehen bekanntlich drei Laufrichtungen zur Verfügung: Man kann quer zum Gradientenverlauf oder in zwei Richtungen im Verlauf des Gradienten chromatographieren. Besonders interessant sind die pH-Gradientschichten. Chromatographiert man hierauf z. B. ein Gemisch aus sieben Sulfonamiden, so ist am Verlauf der Kurven zu erkennen, daß es sich bis auf das Sulfanilamid und das Sulfaguanidin um amphotere Substanzen handelt. Das pH-T-Chromatogramm (Fig. 6) zeigt ferner, daß es keinen pH-Bereich gibt, in dem alle sieben Substanzen voneinander getrennt werden können.

Interessant ist auch die Trennung der sieben meist verwendeten Benzodiazepine auf einer pH-T-Gradientschicht<sup>[15]</sup>. Im entwickelten Chromatogramm (Fig. 7) wird der basische Charakter der Substanzen deutlich, die Trennung erfolgt in der Reihenfolge der  $pK_a$ -Werte.

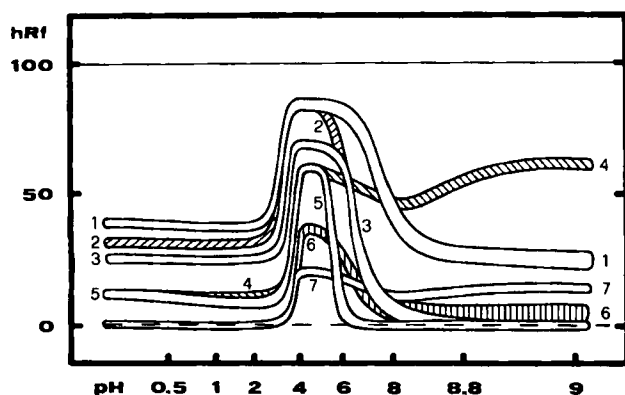


Fig. 6. pH-T-Gradient-DC von sieben Sulfonamiden: 1 Sulfaphenazol, 2 Sulfisoxazol, 3 Sulfacetamid, 4 Sulfanilamid, 5 Sulfathiazol, 6 Sulfisomidin, 7 Sulfaguanidin. Fließmittel: Benzol-2-Propanol (80+20), 2 x 12 cm, KS. Nachweis: Fluorescamin, UV<sub>365</sub>.

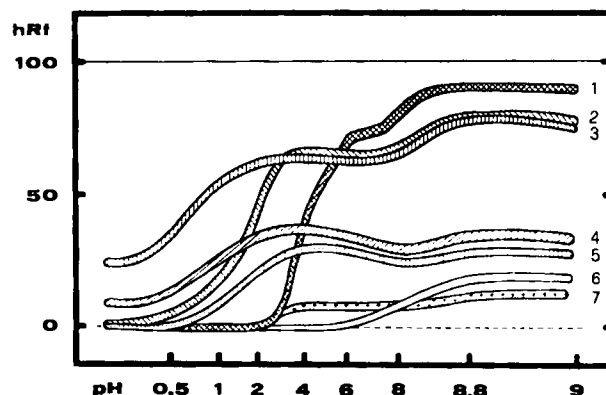


Fig. 7. pH-T-Gradient-DC von sieben Benzodiazepinen nach Besprühen mit Schwefelsäure im langwelligeren UV-Licht: 1 Medazepam, 2 Diazepam, 3 Flunitrazepam, 4 Clonazepam, 5 Nitrazepam, 6 Flurazepam, 7 Chlordiazepoxid. Fließmittel: Chloroform-Aceton (90+10), 2 x 10 cm, KS. Nachweis: 8 N Schwefelsäure, UV<sub>365</sub>.

Sehr gut eignet sich diese pH-T-Gradiententechnik auch zum Studium von Zersetzungserscheinungen, von Metabolisierungen und zum Nachweis von Verunreinigungen aus der Synthese. Keine andere Technik der Chromatographie läßt solche Feinheiten erkennen. Als weitere Möglichkeit kommt noch die Entwicklung im Verlauf des Gradienten hinzu. Wir haben hierbei einen Fokussierungseffekt entdeckt<sup>[14, 16]</sup>: Während normalerweise mit zunehmender Laufstrecke die Zonen breiter werden, tritt bei der DC-Fokussierung analog zur isoelektrischen Fokussierung eine zum Teil ausgeprägte Verringerung der Zonenbreite auf. Wie Figur 8 zeigt, lassen sich z. B. für das gleiche Substanzgemisch im Gradienten (von sauer nach basisch entwickelt) über 20 Zonen erkennen, hingegen nur 9 Zonen im konventionellen Chromatogramm auf einer Schicht ohne Gradient. Das Problem, Gradientenschichten industriell herzustellen, ist sicherlich lösbar.

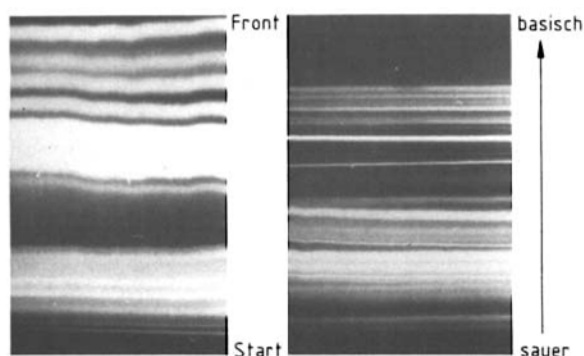


Fig. 8. Fokussierung eines Fluoreszenzfarbstoffgemisches bei der Dünnschicht-Chromatographie in einem Gradienten von sauer nach basisch (rechts); zum Vergleich (links) DC auf einer normalen Silicagelschicht.

Sowohl bei den Gradientenschichten als auch bei den normalen Schichten ist die Haft- und Abriebfestigkeit sehr wichtig. Sie sollte nicht zu hoch und nicht zu niedrig sein. Ein spezielles Gerät zur quantitativen Ermittlung der Abriebfestigkeit von Schichten<sup>[17]</sup> hat sich auch zur Prüfung von Bindemitteln bewährt<sup>[17]</sup>. Optimal erscheinen uns „Abriebgewichte“ von 200 g. Nach wie vor sind im Handel geeignete organische Kunststoff„binder“ für die Selbsthersteller von DC-Schichten nicht erhältlich.

Bei den *mobilen Phasen* gab es eigentlich keine besonderen Überraschungen. In der Adsorptions-DC hat sich die elutrope Reihe bewährt und der Hinweis, daß eine Ordnung der Elutionsmittel nach der Polarität und näherungsweise nach der Dielektrizitätskonstante vorteilhaft sein kann. Man sollte auf Benzol aufgrund seiner inzwischen erkannten Toxizität als Lösungsmittel verzichten und statt dessen Toluol oder das etwas stärker polare Dichlormethan verwenden. Der Versuch, Lösungsmittelgemische mit steigenden DK-Werten in den Handel zu bringen, hatte keine Resonanz. Die seit langem bekannte Gradient-Elutionstechnik hat sich in der Dünnschicht-Chromatographie ebenfalls nicht durchsetzen können.

Die meisten Freiheitsgrade in der Dünnschicht-Chromatographie hat man bei der Wahl der *Trenntechniken*. Neben den Möglichkeiten der aufsteigenden und der absteigenden Entwicklung gibt es bekanntlich die der horizontalen Entwicklung in speziellen Kammern. Weitere Möglich-

keiten sind neben der eindimensionalen die zweidimensionale, die Zentrifugal- und die Zirkular-Entwicklung. Als recht nützlich hat sich auch die stufenweise Entwicklung erwiesen, ebenso die Mehrfachentwicklung. Um Lösungsmittel zu sparen, findet in letzter Zeit die horizontale Entwicklung in sogenannten Minikammern wieder Interesse. Neu sind eine DC-Kammer mit Überdruck (Chrompres 10)<sup>[18]</sup> und die ideenreiche Sequenz-DC<sup>[19]</sup>. Alle diese Techniken bieten besondere Vorteile, und man muß sie genau kennen, um sie richtig zu nutzen.

Die klassischen DC-Trogkammern haben sich wenig geändert. Hinzugekommen sind sehr schmale Kammern, die als Tauchkammern verwendet werden<sup>[20]</sup>. Neben der seit langem bekannten Tieftemperatur-DC<sup>[21]</sup> wurde die Anwendung eines Temperatur-Gradienten<sup>[22]</sup> während der Entwicklung untersucht. Der Temperaturgradient führt unter zunehmendem Abdampfen von Lösungsmittel zu einer Fokussierung der Zonen<sup>[23, 24]</sup>. Für Trennungen von Substanzen, die bei Raumtemperatur nahezu unlöslich sind, wie z. B. viele organische Pigmente und Farben, empfiehlt sich die DC bei 150 °C auf Silicagelschichten mit geeigneten mobilen Phasen, die man auch nach der Elutionswirkung ordnen kann<sup>[25]</sup>. Die Zentrifugal-DC hat in den letzten Jahren ein größeres Interesse gefunden. In USA wurde hierzu das „Chromatotron“ entwickelt, in dem das Gemisch auf einer rotierenden runden Scheibe ( $\varnothing = 24$  cm) getrennt wird. Die Scheibe trägt eine 1 bis 4 mm dünne Trennschicht. Der Vorteil der Zentrifugal-DC besteht darin, daß man im präparativen Maßstab Substanzgemische von etwa 0.1 bis 1 g schnell trennen kann (Fig. 9). Auch wir haben uns mit dieser Trenntechnik beschäftigt<sup>[26]</sup>, um die Vor- und Nachteile kennenzulernen.

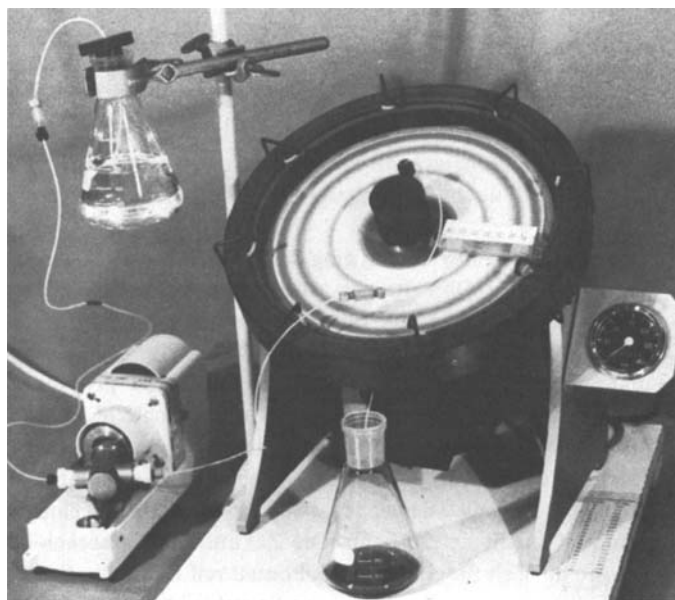


Fig. 9. Zentrifugal-DC mit dem Chromatotron zur präparativen Trennung von Substanzgemischen.

#### 4. Standardbedingungen und Variationen

Nach unserer Diskussion der drei Parameter der Dünnschicht-Chromatographie und ihres Entwicklungspotentials stellt sich die Frage, ob die vor 25 Jahren formulierten Standardbedingungen noch heute ihre Gültigkeit haben.

Das Schema in Figur 10 zeigt die inzwischen bekannt gewordenen Variationen. Bei der damaligen Auswahl der Standardbedingungen strebten wir ein möglichst handliches, quadratisches Plattenformat an, das alle Möglichkeiten offen läßt. Als Maß schlugen wir 20 × 20 cm vor, als Schichtdicke 0.25 mm und als Trennstrecke 10 cm. Die frühzeitige Einführung dieser DC-Standardbedingungen vereinfachte allen Geräteherstellern die Produktion von Zubehör bis hin zum teuren Scanner.

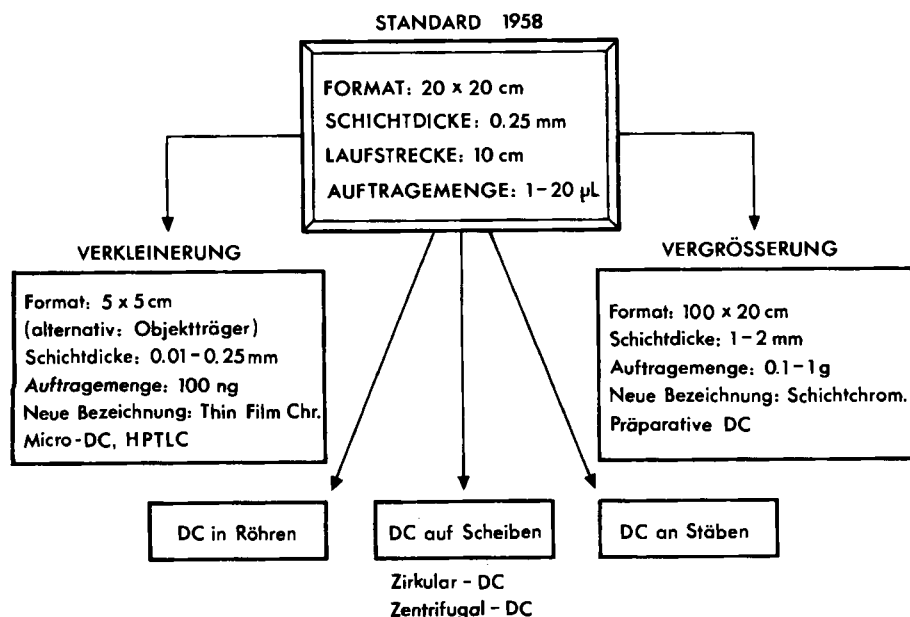


Fig. 10. Variationen zu den 1958 aufgestellten DC-Standardbedingungen.

Die Veränderungen der Bedingungen gingen in fünf Richtungen (vgl. Fig. 10). Für präparative Zwecke wurde z. B. das Plattenformat auf 100 cm Breite vergrößert und die Schichtdicke auf 1–2 mm; man gab dem Verfahren den Namen „präparative DC“ oder „Schichtchromatographie“<sup>[27]</sup>. Heute neigt man mehr dazu, die Normalplatten (20 × 20 cm) auch für präparative Zwecke zu verwenden<sup>[28]</sup>.

Eine andere Entwicklung ging dahin, das Format zu verkleinern bis zu Objektträger- oder Diagröße (5 × 5 cm). Dies wirft die Frage auf, ob die Trennstrecke noch ausreicht. Bei dieser „Mikro-DC“ oder „Thin-Film Chromatography“<sup>[29]</sup>, die letztthin in die „HPDC“ oder „Nano-DC“<sup>[30]</sup> mündete, muß man die Vor- und Nachteile auch unter Kostengesichtspunkten betrachten. So wird zum Beispiel manchmal nicht bedacht, daß häufig bei Kopplungsverfahren µg-Substanzmengen benötigt werden, die eine Nano-DC nicht liefern kann. Die Zukunft wird entscheiden, ob die Zeit für ein kleineres Format reif ist. Sollte dies der Fall sein, so wird man sich an Szekely<sup>[31]</sup> erinnern, der darauf hinwies, daß dies kostengünstig dadurch zu erreichen ist, daß man käufliche 20 × 20 cm-Platten vierteilt und so zu dem durchaus noch handlichen 10 × 10 cm-Format kommt. Entsprechend kleine, lösungsmittelsparende Trogkammern aus Glas sind handelsüblich.

Auch DC in Röhren wurde eine Zeitlang propagiert, inzwischen ist allerdings diese Variante nahezu wieder vergessen. Die DC auf Glasstäben wird ebenfalls kaum noch angewendet. Aus historischen Gründen sei eingeflochten,

daß ich vor 33 Jahren eine Chromatographie auf Magnesiastäbchen und -rinnen betrieb und daß dies letztlich zur DC führte.

Zur DC auf Scheiben ist anzumerken, daß schon vor der „Rundfilter-Papierchromatographie“ eine Zirkular-DC von Ismailov und Schraiber<sup>[2]</sup> verwendet wurde. Den Versuchen von zahlreichen anderen Autoren – und auch von uns –, dieser Technik zum Durchbruch zu verhelfen, blieb der Erfolg bisher versagt.

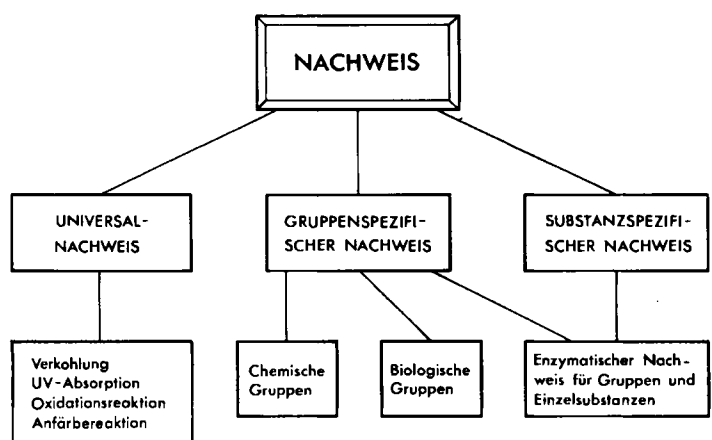
## 5. Detektion in der Dünnschicht-Chromatographie

Für jede Chromatographie ist die Erkennung der getrennten Substanzen unabdingbar. Man kann zwar heute chromatographisch ein Molekül A von einem Molekül B oder einem Molekül C trennen, es gelingt aber nicht, diese Trennung nachzuweisen, da die Detektoren zu unempfindlich sind.

Die Detektionsprobleme sind bei den verschiedenen chromatographischen Verfahren recht unterschiedlich: Bei der Gaschromatographie und bei der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie muß man mit relativ hohem Kostenaufwand die getrennten Substanzen in einem fließenden System erfassen. Man benötigt hierzu Durchflußdetektoren und mV-Schreiber. Die Zahl der Möglichkeiten bei diesen beiden Verfahren ist hierdurch stark eingeschränkt. Anders ist es dagegen bei der Dünnschicht-Chromatographie. Hier erfolgt der Nachweis nach der Trennung, d. h. stationär. Die Möglichkeiten sind hier zahlreich, und dies ist ein außerordentlicher Vorteil der Methode.

Grundsätzlich stehen bei der DC sowohl zahlreiche zerstörungsfreie als auch die sogenannten zerstörenden Nachweise mit aggressiven Reagentien zur Verfügung. Als Regel hat sich herausgebildet, daß man zunächst mit einer oder mehreren nicht zerstörenden Detektionen beginnt, z. B. Auswertung des Chromatogramms mit verschiedenwelligem UV-Licht, eventuell auf Fluoreszenzschichten, und danach erst eine oder mehrere zerstörende Reaktionen anwendet, die z. B. zu einer Farbbildung führen.

Zur objektiven Bewertung kann man nun die zahlreichen Nachweisreaktionen in drei große Gruppen einteilen (Fig. 11). Je nach der Problemstellung wird man die eine oder andere Möglichkeit vorziehen oder sie nacheinander anwenden. Bei unbekannten Gemischen sind zunächst Verfahren wünschenswert, um möglichst alle getrennten Stoffe zu erfassen; man benötigt einen Universaldetektor. Dieses Ziel kann man in der DC nur teilweise erreichen, z. B. durch UV-Absorption auf Fluoreszenzschichten, durch Oxidationsreaktionen, die zu Farbbildung führen und letztendlich durch Verkohlungen aller organischen Materials.



ANFORDERUNGEN: Spezifität Empfindlichkeit Reproduzierbarkeit Handlichkeit

Fig. 11. Einteilung und Gliederung der zahlreichen Nachweismöglichkeiten (Detektoren!) in der DC.

Am häufigsten werden zur Zeit zum Nachweis der Trennung von Naturstoffgemischen Schwefelsäure-Aldehyd-Reagentien benutzt. Kürzlich wurde gezeigt, daß die Reaktion in Teilschritten abläuft und daß von vielen untersuchten Aldehyden der Anisaldehyd am besten geeignet ist<sup>[32]</sup>. Ein erheblicher Fortschritt wurde auch auf dem Gebiet des Nachweises reaktionsträger Lipide, Kohlenwasserstoffe und Fette sowie Weichmacher durch Anwendung des sogenannten ANSA-Reagens (8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure) erreicht<sup>[33]</sup>. Erst im letzten Jahr wurde für dieses an sich schon empfindliche Reagens eine Weiterentwicklung beschrieben, das TNS-Reagens<sup>[34]</sup> (6-*p*-Toluidino-2-naphthalinsulfonsäure). Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist auch das INPTC-Reagens, ein Tetrazoliumchloridderivat, das mit Weichmachern, langkettigen Fettsäuren, höheren aliphatischen Aldehyden und anderem verschiedenfarbig reagiert<sup>[35]</sup>.

Neben den „Universal“-Reagentien verdienen die gruppenspezifischen Detektionsmöglichkeiten Beachtung. Die eine Reihe reagiert auf bestimmte funktionelle chemische Gruppen, beispielsweise auf phenolische oder alkoholische oder Carbonyl-Gruppen, die andere Reihe kann man unter dem Begriff „Biologische Nachweise“ zusammenfassen.

Unter den zahlreichen Reagentien, die auf chemische Gruppen ansprechen, erregte ohne Zweifel das Fluorescamin (Fluram-Roche) das größte Aufsehen im letzten Jahrzehnt. Es wurde von *Weigle et al.*<sup>[36]</sup> zum Nachweis pri-

märer Aminogruppen beschrieben und verdrängt zum Teil die klassische Ninhydrin-Farbreaktion. Die Möglichkeiten seiner Anwendung (z. B. <sup>[37–40]</sup>) sind keineswegs ausgeschöpft. Dies sei mit dem folgenden Beispiel erläutert: In den vergangenen Jahren gab es in Spanien über 300 Tote und mehr als Zehntausend Erkrankte infolge der Verwendung von Speiseöl, das mit Anilin (2 ppm) und mit Aniliden (bis zu 2000 ppm) kontaminiert war. Man tat sich schwer mit dem Nachweis von Anilin und insbesondere der Anilide. So hatte man eine umständliche Probenvorbereitung und zog dann die GC-MS-Kopplung zur Analyse und zum Nachweis heran, oder man verwendete andererseits unspezifische DC-Nachweise, wie z. B. Kaliumpermanganat. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß es mit nur 10 µL einer Ölprobe möglich ist, die Anilide innerhalb von 90 s mit Natronkalk thermisch zu spalten (TAS-Verfahren), und das freigesetzte Anilin mit dem Fluorescamin-Reagens in einer Konzentration bis 1 ppm sicher nachzuweisen<sup>[41]</sup>. Etwas weniger empfindlich ist die Fluoreszenzreaktion von Anilin mit *o*-Phthalaldehyd. Hätte man dieses Verfahren gleich nach Beginn der Katastrophe gehabt, so wäre es möglich gewesen, Hunderte von Proben pro Tag zu analysieren und große Mengen kontaminierten Speiseöls schnell sicherzustellen.

Recht interessant ist in diesem Zusammenhang ein weiteres gruppenspezifisches Reagens, das schon lange bekannte 4-Nitrobenzylpyridin (NBP). Mit ihm ist es möglich, alkylierende Verbindungen auf dem Chromatogramm zu erkennen<sup>[42–45]</sup>. Bekanntlich gelten „Alkylantien“, wie z. B. Epichlorhydrin, als stark cancerogene Verbindungen. Erst kürzlich haben *Braun et al.* mit diesem einfachen Test die alkylierende Wirkung der Valepotriate aus Baldrianarten nachgewiesen<sup>[46]</sup>.

Durch systematische Entwicklung von Reagentien, die mit funktionellen Gruppen unter Fluoreszenz- oder Farbbildung reagieren, sind weitere wesentliche Fortschritte auf dem Gebiet der DC-Detektoren möglich.

Die Anwendung sogenannter biologischer Detektionsmöglichkeiten ist bei manchen Problemstellungen sehr nützlich, da man mit entsprechenden Versuchsanordnungen bestimmte biologische Wirkungen noch im Mikrogramm-Maßstab erfassen kann. Liegt beispielsweise das Gemisch aus einer Mikroorganismenkultur vor, so läßt sich nach der DC feststellen, welche Substanzen des Gemischs eine antibiotische Wirkung haben und gegen welche Mikroorganismen die einzelnen Substanzen wirksam sind. In einem Parallelversuch kann man auch ermitteln, welche Substanzen auf dem Chromatogramm hämolytisch wirken (vgl. <sup>[47]</sup>).

Auf dem Gebiet derartiger biologischer Detektoren ist noch ein weites Arbeitsfeld. Die Verwendung von Kleinstorganismen als „Versuchskaninchen“ in ähnlicher Art wie etwa die *Aedes*-Larven zum Nachweis der Insektizidwirkung von Pyrethrinumwandlungsprodukten nach der DC (TRT-Technik)<sup>[48]</sup> ist nur ein Beispiel.

Viel zu wenig beachtet wurden in der DC bislang die substanzspezifischen Detektionsmöglichkeiten. Zur Lösung mancher Probleme ist es vorteilhaft, eine Substanz aus einem Gemisch spezifisch nachweisen zu können, beispielsweise Glucose in einem Zuckergemisch. Hier kann man nun anhand einer Fermentreaktion mittels der Glucose-Oxidase dieses Ziel erreichen. Gerade die Möglichkeit

der substanzspezifischen Erkennung wird wohl auch in Zukunft enzymatischen Detektionssystemen vorbehalten bleiben.

Erhebliche Fortschritte wurden auf dem Gebiet des Nachweises von Pflanzenschutzmitteln mit Hilfe enzymatischer Reaktionen insbesondere von Geike gemacht<sup>[49,50]</sup>. Er konnte so z. B. mit enzymatischen Reaktionen insektizide Carbamate nachweisen, Phosphatase-Hemmer erkennen oder Schwermetalle auffinden. Auch Amylase-Inhibitoren konnten auf diesem Weg erkannt werden. Eine Übersicht hierüber bis 1974 gab Mendoza<sup>[51]</sup>.

In diesem Zusammenhang ist noch eine neue Arbeit über eine empfindliche enzymkatalysierte Farbreaktion für Wasserstoffperoxid und andere Peroxide auf DC-Platten zu erwähnen<sup>[52]</sup>. Auch die Möglichkeit der Umsetzung von Substraten mit Enzymen am Startpunkt und der anschließende DC-Nachweis ist von Interesse. Mit gutem Erfolg werden hierzu die DC-Platten mit sogenannter Konzentrierungszone verwendet. Auf diesem Wege gelang ein Beitrag zur Strukturaufklärung höhermolekularer Glycosphingolipide auf DC-Schichten<sup>[53]</sup>.

Abschließend noch einige Anmerkungen zur Empfindlichkeit der Detektion in der DC: Trotz an sich einfacher Tatbestände herrscht oft Unklarheit. Die Empfindlichkeit der verwendeten Nachweise für eine Substanz kann um den Faktor 100, ja sogar 1000, verschieden sein. Ein einfaches Diagramm veranschaulicht diesen Sachverhalt (Fig. 12). Ein aus nur vier Stoffen bestehendes Gemisch, das die

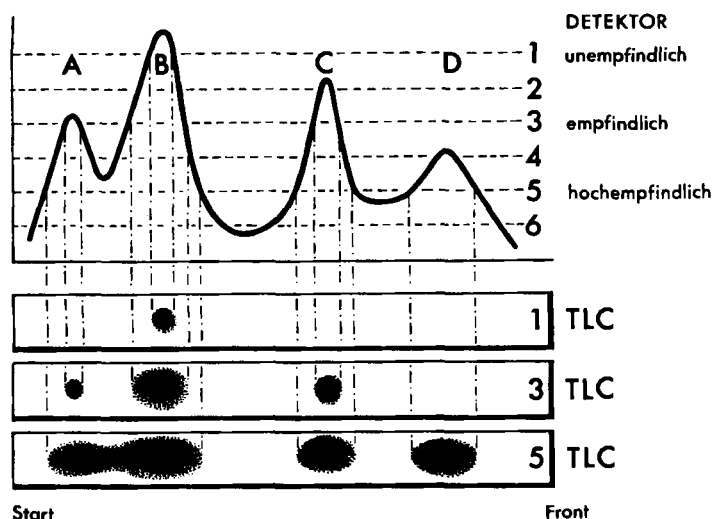


Fig. 12. Schematische Darstellung der Empfindlichkeit einer Detektion am Beispiel von vier Substanzen eines Gemischs und unterschiedlich empfindlichen Nachweisreaktionen.

Substanzen A, B, C und D in unterschiedlicher Konzentration enthält, wurde getrennt und die Komponenten mit drei verschieden empfindlichen Reagentien (1, 3 und 5) nachgewiesen. Mit dem empfindlichen Reagens Nr. 3 lassen sich – wie das Schema zeigt – drei Zonen erkennen, mit dem weniger empfindlichen Nr. 1 jedoch nur eine. Mit dem hochempfindlichen Reagens Nr. 5 erkennt man, daß Substanz A und B zusammenliegen, und man findet neben C noch die in kleinen Mengen und stark verdünnt vorliegende Substanz D. Man kann also hier je nach Problemstellung wählen, was man sehen will.

## 6. Quantitative DC-Auswertung

Neben dem Abschaben der Zone und der Elution der Substanz mit anschließender quantitativer Bestimmung wurden am Anfang der Dünnschicht-Chromatographie Photometer, wie sie zur Auswertung von Papierchromatogrammen und Elektrophoresestreifen dienten, verwendet. Danach hat man in den sechziger Jahren spezielle Photometer für die DC hergestellt, die in den siebziger Jahren immer weiter ausgebaut wurden. Ein Spitzengerät auf diesem Gebiet war sicher das rechnergesteuerte DC-Spektralphotometer von Zeiss. Bei den Kosten für derartig hochgezüchtete Geräte und der inzwischen erfolgten Weiterentwicklung der HPLC drängt sich natürlich die Frage auf, welcher Methode man im Hinblick auf das Endergebnis im Routinebetrieb den Vorzug gibt. Ohne Zweifel hat man bei der DC-Auswertung den Vorteil, zahlreiche Proben nebeneinander auf dem Chromatogramm zu haben, während bei der HPLC immer nur eine Probe vorliegt. Bei der HPLC sind aber die Probenaufgabe und die Vorrichtung zur quantitativen Auswertung ein integrierter Bestandteil des Gerätes, und es bedarf nicht der Errichtung eines kostenaufwendigen, speziellen Meßplatzes. Die besseren Argumente im Hinblick auf die Effizienz liegen meines Erachtens bei der HPLC. Dies wird durch die Möglichkeit einer rund um die Uhr laufenden automatischen Probenaufgabe begünstigt.

Bei Abwägung aller Fakten mag man voraussagen, daß sich die aufwendigen computergesteuerten Auswertegeräte für die DC auf die Dauer nicht durchsetzen werden. Meines Erachtens ist der einfache und kostengünstige visuelle Vergleich der Zonengrößen dem Verfahren eher angemessen als teure Auftrage- und Auswerteverfahren. Diese Meinung wird zwar sicher zur Zeit bei einigen Spezialisten, die im Besitz derartiger Geräte sind, und bei den Herstellern auf Kritik stoßen, nicht jedoch beim Gros der Wissenschaftler, die alle chromatographischen Methoden anwenden und nicht auf ein Verfahren fixiert sind. Ich meine, daß sich die verschiedenartigen chromatographischen Verfahren in der Hand eines erfahrenen Analytikers sinnvoll ergänzen, der sie benutzt wie der Dirigent sein Orchester.

## 7. Kombinations- und Kopplungsverfahren

$R_F$ -Werte haben in der DC den Charakter von Richtwerten, nicht aber von physikalisch-chemischen Konstanten. Sie sind somit zur Identifizierung nicht oder nur sehr bedingt geeignet. Aus diesem Grund verdient die Kombination oder Kopplung der DC mit andersartigen und möglichst beweiskräftigeren Verfahren besondere Beachtung.

Im einfachsten Fall hat man zu bedenken, daß die Durchführung und Beobachtung einer oder mehrerer Farbreaktionen, wie sie häufig zum Nachweis verwendet werden, schon ein weiteres Identitätskriterium ist. Dies sollte aber zur Identifizierung nicht genügen. Zunächst bietet sich die Kombination mit anderen chromatographischen Verfahren an. Man wählt solche aus, deren Trennung nach verschiedenartigen Prinzipien verläuft: So führt man z. B. nach der Adsorptions-DC eine Verteilungs-DC oder eine Umkehr-Phasen-DC, gegebenenfalls auch eine DC auf silbernitratimprägnierten Schichten durch. Man



kann natürlich auch je nach Problemstellung und Substanz eine DC-GC-Kopplung durchführen.

Besonders erwünscht ist die Kopplung mit spektroskopischen Methoden. Im einfachsten Fall bietet sich die Kopplung mit der UV-VIS-Spektroskopie an und die Aufnahme eines Spektrums der fraglichen Zone. Sehr viel aussagekräftiger ist jedoch nach einem Mikrotransfer die IR-Spektroskopie der entsprechenden Substanzzone. Am bequemsten in der Handhabung sind zum Transfer der Substanz vom Schichtmaterial die handelsüblichen gepreßten Kaliumbromid-Pyramiden („Wick Stick“, „Spectro-Tip“).

Im Hinblick auf eine sichere Identifizierung ist die Kopplung mit der Massenspektrometrie sehr aussagekräftig. Sie setzt allerdings einen manuellen Transfer voraus. Wichtig bei allen genannten Verfahren ist die Frage nach der zur Verfügung stehenden Substanzmenge pro DC-Zone. Bei der normalen DC und ihrer Belastbarkeit im  $\mu\text{g}$ -Bereich sind alle genannten Kombinations- und Kopplungsverfahren durchführbar.

Die Bedeutung und Wertschätzung einer Methode läßt sich sowohl an der Zahl der Publikationen als auch an der Zahl der Bücher, die hierüber erschienen sind, erkennen. In den sechziger Jahren war es noch einigermaßen möglich, die exponentiell steigende Zahl der Veröffentlichungen, in denen die DC angewendet wurde, zu verfolgen. Dann wurde die Methode zu einem allgemein gebrauchten Handwerkszeug, das man eventuell noch im experimentellen Teil einer Arbeit erwähnt. Anders ist es mit den Büchern<sup>[8, 29, 30, 54–85]</sup>. Ich habe das erste Buch über die DC mit dem Titel „Dünnschicht-Chromatographie“ bewußt als „Laboratoriumshandbuch“ bezeichnet. Gemeinsam mit sechs Kollegen, die ihre speziellen Erfahrungen einbrachten, wurde es zu einem Bestseller und in mehrere Weltsprachen übersetzt. Die eingangs angedeutete Entwicklung machte es notwendig, in einer zweiten Auflage 24 Mitautoren aufzunehmen, die das stark angewachsene Wissen auf den verschiedenen Gebieten zusammenfassend und kritisch darstellten! Inzwischen erscheinen in führenden Zeitschriften oder getrennt spezielle Literaturzusammenstellungen und jährliche Sonderhefte, die der Methode gewidmet sind. Mir schien es nach der 2. Auflage des Laboratoriumshandbuches, das an die 1000 Seiten umfaßt, nicht mehr notwendig, eine dritte Auflage herauszubringen.

Fast ein Jahrzehnt widmete ich mich mit meinen Mitarbeitern thermischen Mikroverfahren, die in Kopplung mit der DC anwendbar sind. Anschließend arbeitete ich auf dem Gebiet der Extraktion von Naturstoffen mit überkritischen Gasen, aber auch hier war die erste Arbeit eine Kopplung dieser Methode mit der Dünnschicht-Chromatographie.

## 8. Rückblick und Ausblick

Es mag vermessen klingen, aber dennoch ist es wahr, daß die DC dem Naturwissenschaftler und Mediziner eine enorme Bereicherung gebracht hat. Sie können nun chemische Reaktionen, Stoffanreicherungen und Isolierungen visuell verfolgen. Die Pharmakognosten erkannten, daß sie nicht nur die Analyse des „Verpackungsmaterials“ mittels der Mikroskopie betreiben mußten, sondern die Wirkstoffe der Drogen schnell trennen und sichtbar machen können.

Abschließend sei noch die Frage nach der Zukunft der DC angesprochen. Die DC ist aus folgenden Gründen das meist verwendete Trennverfahren:

1. Größtmögliche Freiheit in bezug auf die einfache Wahl der stationären und der mobilen Phase.
2. Auswahl zwischen zahlreichen Arbeitstechniken zur Entwicklung.
3. Größtmögliche Zahl an Detektionsmöglichkeiten.
4. Möglichkeit der gleichzeitigen Trennung und Sichtbarmachung von zahlreichen Proben und Vergleichsgemischen.
5. Möglichkeit der einfachen Kombination und Kopplung mit Mikroextraktions- und Identifizierungsverfahren.
6. Die Dünnschicht-Chromatographie ist das einfachste und preisgünstigste Chromatographieverfahren zur schnellen Trennung und visuellen Auswertung.

Diese und weitere Vorteile rechtfertigen die Aussage, daß die DC auch weiterhin ihren festen Platz in den Laboratorien der Welt behaupten wird und an Bedeutung zunimmt. Sie ist wenig spektakulär, aber außerordentlich nützlich. Es bleibt festzustellen, daß uns die stürmische Entwicklung der chromatographischen und spektroskopischen Methoden in den letzten 25 Jahren so zahlreiche Möglichkeiten in die Hand gegeben hat, die bislang im Hinblick auf die Vielzahl der offenen Probleme nur zum kleinsten Teil genutzt werden konnten. Eine große Lücke klafft zwischen dem Arsenal an modernen Methoden und den damit gewonnenen neuen Erkenntnissen. Nutzen wir die gegebenen Möglichkeiten, die Erfolge werden nicht ausbleiben!

Eingegangen am 31. März 1983 [A 458]

- 
- [1] M. W. Beyerinck, *Z. Phys. Chem.* 3 (1889) 110.
  - [2] N. A. Izmailov, M. S. Schraiber, *Farmatsiya (Moscow)* 3 (1938) 1.
  - [3] I. E. Meinhard, N. F. Hall, *Anal. Chem.* 21 (1949) 185.
  - [4] I. G. Kirchner, I. M. Miller, G. I. Keller, *Anal. Chem.* 23 (1951) 420.
  - [5] R. H. Reitsema, *Anal. Chem.* 26 (1954) 960.
  - [6] E. Stahl, *Pharmazie* 11 (1956) 633.
  - [7] E. Stahl, *Chem.-Ztg.* 82 (1958) 323.
  - [8] E. Stahl: *Dünnschicht-Chromatographie, ein Laboratoriumshandbuch*, Springer-Verlag, Berlin 1962 (2. Aufl. 1967).
  - [9] E. Stahl, *J. Chromatogr.* 37 (1968) 99.
  - [10] E. Stahl, *Analyst (London)* 94 (1969) 723.
  - [11] E. Stahl, *Acc. Chem. Res.* 9 (1976) 75.
  - [12] E. Stahl, *Chem. Ing. Tech.* 36 (1964) 941.
  - [13] E. Stahl, J. Müller, *J. Chromatogr.* 189 (1980) 293.
  - [14] E. Stahl, J. Müller, *GIT Fachz. Lab.* 24 (1980) 649.
  - [15] E. Stahl, J. Müller, *J. Chromatogr.* 209 (1981) 484.
  - [16] E. Stahl, J. Müller, *J. Liq. Chromatogr.* 3 (6) (1980) 775.
  - [17] E. Stahl, *Chromatographia* 14 (1981) 673.
  - [18] Bender & Hobein GmbH, Lindwurmstraße 71, D-8000 München.
  - [19] P. Buncak, *GIT Fachz. Lab., Chromatogr. Suppl. Juli* 1982, 3.
  - [20] Desaga GmbH, *GIT Fachz. Lab., Chromatogr. Suppl. Juli* 1982, 49.
  - [21] E. Stahl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 3 (1964) 784.
  - [22] S. Turina, Z. Soljic, V. Marjanovic, *J. Chromatogr.* 39 (1969) 81.
  - [23] S. Turina, V. Jamnicki, *Anal. Chem.* 44 (1972) 1892.
  - [24] I. Kupec, S. Turina, *Chromatographia* 10 (1977) 157.
  - [25] G. Szekely, P. Baumgartner, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 575.
  - [26] E. Stahl, J. Müller, *Chromatographia* 15 (1982) 493.
  - [27] H. Halpapp, *Chem. Ztg. Chem. Appar.* 89 (1965) 835.
  - [28] E. Stahl, *Z. Anal. Chem.* 236 (1968) 294.
  - [29] E. V. Truter: *Thin Film Chromatography*, Cleaver-Hume Press, London 1963.
  - [30] A. Zlatkis, R. E. Kaiser: *High Performance Thin Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam 1977.
  - [31] R. Delley, G. Szekely, *Chimia* 32 (1978) 261.

- [32] E. Stahl, A. Glatz, *J. Chromatogr.* 240 (1982) 518; 243 (1982) 139.
- [33] J. A. Vinson, J. E. Hooyman, *J. Chromatogr.* 135 (1977) 226.
- [34] M. Jones, R. W. Keenan, P. Horowitz, *J. Chromatogr.* 237 (1982) 522.
- [35] N. M. Rascher, J. H. Onley, *J. Chromatogr.* 140 (1977) 109.
- [36] M. Weigle, S. L. DeBernardo, J. P. Teng, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 5927.
- [37] S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Leimgruber, W. Weigle, *Science* 178 (1972) 871.
- [38] K. Imai, P. Böhlen, S. Stein, S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.* 161 (1974) 161.
- [39] A. M. Felix, M. H. Jimenez, *J. Chromatogr.* 89 (1974) 361.
- [40] H. Nakamura, *J. Chromatogr.* 121 (1976) 33, 79; 131 (1977) 215; 152 (1978) 153; 154 (1978) 51; 175 (1979) 153; 200 (1980) 324.
- [41] E. Stahl, C. Zimmer, S. Juell, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 175 (1982) 88.
- [42] I. Epstein, R. W. Rosenthal, R. I. Ess, *Anal. Chem.* 27 (1955) 1435.
- [43] I. A. Guth, L. P. Manner, *J. Chromatogr.* 30 (1967) 514.
- [44] K. Norpoth, H. Schriewer, H. M. Rauen, *Arzneim. Forsch.* 21 (1971) 1718.
- [45] R. Braun, W. Dittmar, M. Machut, S. Weickmann, *Dtsch. Apoth. Ztg.* 122 (1982) 1109.
- [46] R. Braun, persönliche Mitteilung.
- [47] E. Stahl, P. J. Schorn in [8], S. 401.
- [48] E. Stahl, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* 293 (1960) 531.
- [49] F. Geike, *J. Chromatogr.* 44 (1969) 95; 52 (1970) 447; 53 (1970) 269; 58 (1971) 257; 61 (1971) 279; 63 (1971) 343; 64 (1972) 383; 67 (1972) 343; 72 (1972) 153, 333; 87 (1973) 199.
- [50] F. Geike, *Z. Anal. Chem.* 255 (1971) 134; 256 (1971) 203; 258 (1972) 284; 261 (1972) 397; 266 (1973) 286; 270 (1974) 366, 367; 276 (1975) 77.
- [51] C. E. Mendoza, *Res. Rev.* 43 (1972) 105; 50 (1974) 43.
- [52] W. M. Draper, D. G. Crosby, *J. Chromatogr.* 216 (1981) 413.
- [53] M. Doerr, Dissertation, Universität Saarbrücken 1983.
- [54] K. Randerath: *Dünnschicht-Chromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim 1963.
- [55] J. M. Bobbitt: *Thin-Layer Chromatography*, Reinhold, New York 1963.
- [56] G. B. Marini-Bettolo: *Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam 1964.
- [57] K. Macek, I. M. Hais: *Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography*, Publ. House Czech. Acad. Sci., Prag 1965.
- [58] L. Labler, V. Schwarz: *Chromatografie na Tenke Vrstve*, Czech. Acad. Sci., Prag 1965.
- [59] G. Pataki: *Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie*, de Gruyter, Berlin 1966.
- [60] J. Kirchner: *Thin-Layer Chromatography*, Wiley-Interscience, New York 1967.
- [61] M. Šaršunova, V. Schwarz, C. Michalec: *Chromatografie na Tenkych Vrstvach vo Farmacii a v Klinickej Biochemii*, Obzor 1968.
- [62] J. Opienska-Blauth, H. Krackowski, H. Brzuskiwicz: *Zarys Chromatografii Cienkowarstwowej*, Panstwowe Wyd. Rolnicze, Warschau 1967.
- [63] M. Ishikawa, S. Hara, T. Furuya, Y. Nakazawa: *Dünnschicht-Chromatographie, Theorie und Praxis* (japanisch), Nanzando, Tokyo 1968.
- [64] E. J. Shellard: *Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography*, Academic Press, New York 1968.
- [65] G. Vernin: *La Chromatographie en Couche Mince*, Dunod, Paris 1970.
- [66] A. Niederwieser, G. Pataki: *Prog. Thin-Layer Chromatogr. Relat. Methods* 1 (1970); 2 (1972), Ann Arbor-Humphrey Science Publ.
- [67] E. Stahl: *Chromatographische und mikroskopische Analyse von Drogen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1970 (erg. Neudruck 1978).
- [68] F. Geiss: *Die Parameter der Dünnschicht-Chromatographie*, Vieweg, Braunschweig 1972.
- [69] K. Macek: *Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography*, Elsevier, Amsterdam 1972.
- [70] R. M. Scott: *Thin-Layer Chromatography Abstracts 1968-1971*, Ann Arbor Science Publ. 1972.
- [71] W. Christen: *Dünnschicht-Chromatographie*, GIT, Darmstadt 1975.
- [72] H. Auterhoff, K. A. Kovar: *Identifizierung von Arzneistoffen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1971.
- [73] S. Dominguez: *Chromatografia en Papel y en Capa Delgada*, Selbstverlag, Monterrey 1978.
- [74] J. Gasparic, J. Churacek: *Laboratory Handbook of Paper and Thin-Layer Chromatography*, Wiley, New York 1978.
- [75] W. Götz, A. Sachs, H. Wimmer: *Dünnschicht-Chromatographie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1978.
- [76] J. Touchstone, M. Dobbins: *Practice of Thin-Layer Chromatography*, Wiley, New York 1978.
- [77] E. Stahl, W. Schild: *Pharmazeutische Biologie*, Bd. 4, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1981.
- [78] H. Jork, H. Wimmer: *Quantitative Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen* (Literatursammlung), GIT, Darmstadt 1982.
- [79] P. Pachaly: *Dünnschichtchromatographie in der Apotheke*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1982.
- [80] J. Touchstone: *Advances in Thin-Layer Chromatography*, Wiley, New York 1982.
- [81] H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski: *Drogenanalyse, Dünnschicht-chromatographische Analyse von Arzneidrogen*, Springer-Verlag, Berlin 1983.
- [82] A. Baerheim Svendsen, R. Verpoorte: *Chromatography of Alkaloids. Part A: Thin Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam 1983.
- [83] D. Jänchen: *TLC-Abstracts 1965-1977*, Selbstverlag Camag, Muttenz 1977.
- [84] O. H. Masek, M. J. Saxby: *TLC-Abstracts 1971-1979*, PRM Science and Technology, London 1979.
- [85] M. Lederer: Abstracts in *J. Chromatogr.* seit 1964.