

CHROM. 7085

## GRUNDLAGEN ZUR RATIONELLEN ANWENDUNG DER QUANTITATIVEN DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

W. GRIMM

Firma Dr. Karl Thomae GmbH\*, Biberach an der Riss (B.R.D.)

(Eingegangen am 27. August 1973)

---

### SUMMARY

*Basic considerations for a rational application of quantitative thin-layer chromatography*

Using the Lambert–Beer law one obtains for transmission measurements for quantitative thin-layer chromatography calibration curves according to the function  $y = ax$ , if oversaturation of the spots to be measured is avoided. Once the optimal conditions for the starting spot have been attained, they can be easily reproduced with an automatic spot applicator. Up to nine samples can be applied simultaneously in a very short time. The diameter of the starting spots can be chosen. The calibration curve according to the Lambert–Beer law and the automatic applicator permit rational utilisation of quantitative thin-layer chromatography. The coefficient of variation for this method lies between 0.8 and 3.5%.

---

### EINLEITUNG

Die Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen ist ein Analysenverfahren, das wegen seines breiten Anwendungsbereichs immer grössere Bedeutung gewinnt. So lassen sich im Prinzip alle Verbindungen mit Eigenfluoreszenz oder Absorption im UV- und sichtbaren Spektralbereich quantitativ bestimmen. Hinzu kommen die Substanzen, bei denen die Fluoreszenz oder die Absorption durch eine chemische Reaktion auf der Dünnschichtplatte erreicht wird. Es ist deshalb sehr wichtig, die Voraussetzungen für eine rationelle Anwendung dieser Methode zu erreichen.

Eine wesentliche Aufgabe besteht darin, geeignete funktionelle Zusammenhänge zwischen der Konzentration und dem Messwert zu finden, die lineare Eichgeraden liefern. Am einfachsten liegen die Verhältnisse bei der Fluoreszenzmessung. Wie Seiler<sup>1,2</sup> gezeigt hat, ist die integrale Fluoreszenzintensität eines Flecks, unabhängig von dessen Form, in niedrigen Konzentrationen direkt der Substanzmenge proportional. Es kann in Reflexion oder in Transmission gemessen werden.

Wesentlich komplizierter liegen die Verhältnisse bei der quantitativen Analyse absorbierender Verbindungen. Als einer der ersten hat Jork<sup>3</sup> mit Hilfe der Kubelka–Munk-Funktion quantitative Bestimmungen in Remission durchgeführt. Da diese Methode recht aufwendig ist, hat man nach einfacheren empirischen Beziehungen gesucht. Eich *et al.*<sup>4</sup> verwenden für ihre Bestimmungen die Beziehung zwischen den

\* Eine Firma der Unternehmensgruppe C.H. Boehringer Sohn, Ingelheim, B.R.D.

Quadraten der Fläche unter der Absorptions-Ortskurve und den Substanzmengen der Flecke. Für einen begrenzten Konzentrationsbereich erhalten sie eine Gerade. Sie gehorcht der Funktion  $y = ax + b$ . Das bedeutet, die Eichgerade geht nicht durch den Nullpunkt. Treiber *et al.*<sup>5</sup> haben die Kubelka-Munk-Funktion mit dem Lambert-Beerschen Gesetz kombiniert, um durch eine simultane Remissions- und Transmissionsmessung die Platten quantitativ auszuwerten. Diese Methode ist jedoch mit grossem mathematischem Aufwand verbunden.

In dieser Arbeit wird gezeigt, wie es generell möglich ist, das Lambert-Beersche Gesetz für quantitative Bestimmungen anzuwenden. Die dabei erarbeiteten optimalen Bedingungen für den Startfleck können jederzeit mit Hilfe eines automatischen Auftragegerätes reproduziert werden.

## EXPERIMENTELLES

Zur Chromatographie werden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub> der Fa. Merck, Darmstadt, B.R.D., verwendet. Die Proben werden mit Hamilton Mikroliterspritzen (Hamilton, Reno, Nev., U.S.A.) bzw. mit einem automatischen Auftragegerät aufgetragen. Bei diesem Gerät handelt es sich um eine Eigenkonstruktion der Fa. Dr. Karl Thomae GmbH (Gebrauchsmusterschutz liegt vor).

Die quantitative Auswertung erfolgt mit dem Schoeffel Spektrodensitometer Modell SD 3000 (Schoeffel Instrument Corp., Westwood, N.J., U.S.A.) und einem Schreiber mit Integrator von Vitatron, Modell UR 400 (Vitatron, Milton, Mass., U.S.A.). Entwickelt werden die Platten in gesättigten N-Kammern.

Zur Überprüfung der Dosierungsgenauigkeit des Auftragegerätes wurde eine 0.1%ige wässrige Lösung des Lebensmittelfarbstoffes Gelborange verwendet. Die Lösungen wurden gesteuert auf Kieselgelfolien von Macherey, Nagel & Co. (Düren, B.R.D.) aufgetragen. Der Durchmesser der Startflecke betrug 4 mm. Anschliessend wurden die Flecke ausgeschnitten und mit 10 ml Wasser eluiert. In 1-cm Küvetten wurde bei 480 nm gegen Wasser die Absorption der jeweiligen Lösung bestimmt.

Den statistischen Aussagen liegen die folgenden Formeln zugrunde:

$$\text{Standardabweichung, } s: \quad s = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$$

$$\text{Variationskoeffizient, } V: \quad V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

$$\text{Vertrauensbereich des Mittelwertes, } \bar{x}_V: \quad \bar{x}_V = \bar{x} + t_{(n \cdot p)} \cdot s \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Toleranzbereich des Einzelwertes, } x_T: \quad x_T = \bar{x} \pm t_{(n \cdot p)} \cdot s \cdot \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)}$$

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### Eichgerade nach dem Lambert-Beerschen Gesetz

Das Lambert-Beersche Gesetz liefert eine lineare Beziehung zwischen der Extinktion  $E$  und der Konzentration  $C$

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot d \cdot C = K \cdot C$$

Analog ist es möglich, dieses Gesetz in der quantitativen Dünnschichtchromatographie anzuwenden, wenn man in Transmission auswertet. Das Chromatogramm wird mit einem Lichtstrahl gegebener Intensität durchstrahlt.  $I_0$  ist der Anteil der Lichtenergie, der an einer substanzfreien Stelle die Platte durchdringt.  $I$  ist die durch die absorbierende Substanz geschwächte Lichtintensität. Um auch im UV absorbierende Verbindungen bestimmen zu können, verwendet man DC-Platten mit Fluoreszenzindikator. Die Absorption der zu analysierenden Substanz bewirkt eine Fluoreszenzminderung. Gemessen wird hier

$$\log \frac{I_0}{I} = \log \frac{\text{Fluoreszenz}}{\text{verminderte Fluoreszenz}}$$

Indem man Probe- und Vergleichsbahn mit konstanter Geschwindigkeit an je einem Spalt vorbeibewegt, erhält man die Fläche der Extinktionskurve. Das Lambert-Beersche Gesetz liefert jetzt die lineare Beziehung zwischen der Fläche der Extinktionskurve (=Integratoreinheiten) und der Substanzmenge.

Erhält man jedoch eine Eichgerade<sup>6-8</sup> die der Funktion  $y=ax+b$  gehorcht, dann bedeutet es einmal, dass man für exakte quantitative Aussagen mit der Probe eine Konzentrationsreihe von mindestens vier Werten auf die Platte auftragen muss, um den Gehalt mit Hilfe der daraus resultierenden Regressionsgeraden zu bestimmen. Zum anderen ergibt sich aus diesen Ergebnissen ein Widerspruch. Verlängert man die Eichgeraden, die oft nur für einen bestimmten Konzentrationsbereich angegeben sind, bis zum Schnittpunkt mit der y-Achse, dann erhält man nach der Funktions-

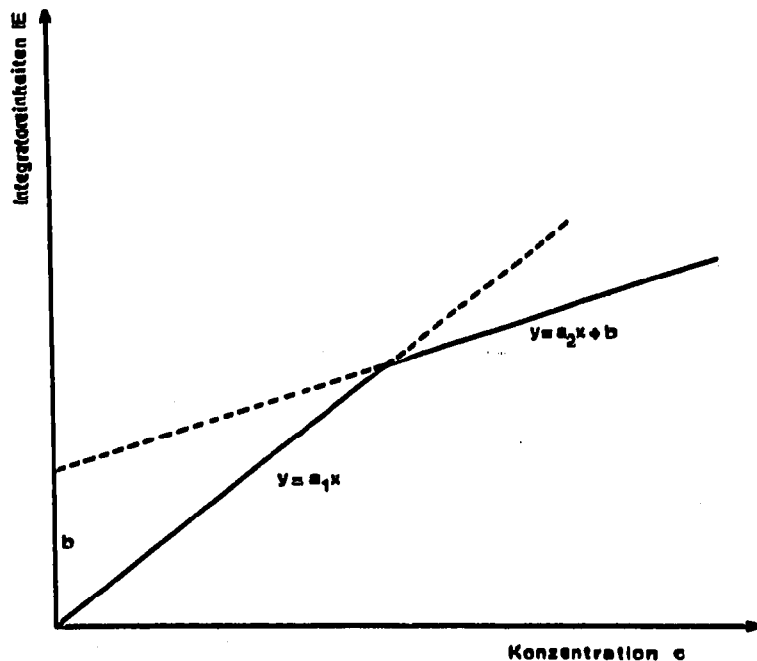


Fig. 1. Gegenüberstellung der beiden Eichgeraden:  $y=a_1x$ , die durch den Nullpunkt geht und  $y=a_2x+b$ , mit dem hypothetischen Wert für  $b$ .

gleichung  $y=ax+b$  bzw.  $IE=aC+b$  ( $IE$ =Integratoreinheiten) den Wert für  $b$  (Siehe Fig. 1). Es kann sich jedoch nur um einen hypothetischen Wert handeln, denn bei  $C=0$  ist die Absorption auch 0. Demnach müsste es zwei Eichgeraden geben; die erste gehorcht der Funktion  $y=a_1x$  und läuft von  $C=0$  bis zum Schnittpunkt mit der zweiten Eichgeraden, die durch die Funktion  $y=a_2x+b$  beschrieben wird. Verlängert man die erste Eichgerade über den Schnittpunkt hinaus, dann erhält man für die einzelnen Konzentrationen grössere Integratorwerte, da  $a_1 > a_2$ .

Dieser Widerspruch hebt sich auf, die beiden Eichgeraden fallen zusammen, wenn man die unterschiedlichen Konzentrationen nicht auf gleiche Flächen, sondern pro Flächeneinheit die gleichen Konzentrationen aufträgt. Das heisst, mit zunehmender Konzentration muss der Durchmesser der Startfleck steigen. Danach zeigt der Schnittpunkt der beiden Eichgeraden den Beginn einer Art Übersättigung an. Von hier ab wird nicht mehr die eigentliche Konzentration sondern nur noch die Fleckgrösse gemessen. Da der Fleck immer bis zu einem gewissen Grad diffundiert, steigt die Eichgerade nach der Funktion  $y=ax+b$  mit zunehmender Konzentration trotz Übersättigung an. Aus dem gleichen Grund gibt es auch keinen scharfen Knick, sondern einen kontinuierlichen Übergang.

Es hat sich gezeigt, dass alle bis jetzt untersuchten Substanzen unter Berücksichtigung der gleichen Flächenbelastung für einen bestimmten Konzentrationsbereich eine Eichgerade nach der Funktion  $y=ax$  liefern.

Die Begrenzung erfolgt durch die Spaltbreite der Auswertegeräte. Beim Schoeffel Spektrodensitometer beträgt sie 1 cm. Damit der entwickelte Fleck voll erfasst wird, muss sein Durchmesser kleiner als 1 cm sein.

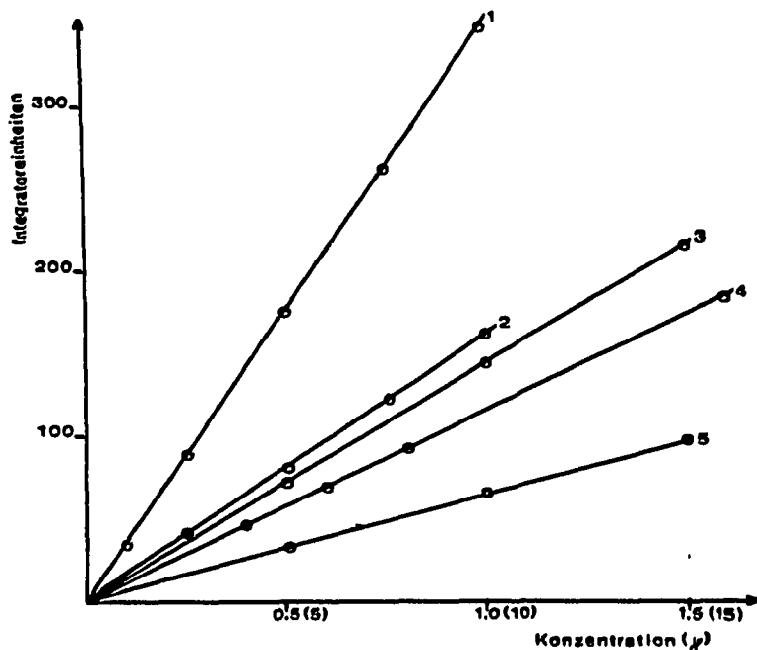


Fig. 2. Eichgeraden von Isopropylantipyrin (1), Novalgin (2), Bisolvon® (3), Prostigminbromid (4) und Codeinphosphat (5).

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse von fünf Substanzen, während in Fig. 2 die Eichgeraden graphisch dargestellt sind. Der grosse Vorteil dieser Eichgeraden besteht darin, dass eine Gehaltsbestimmung nicht mit Hilfe einer Regressionsgeraden sondern durch einen einzigen Vergleichswert durchgeführt werden kann.

#### *Abhängigkeit der Integratorsignale vom $R_F$ -Wert*

Durch die Übersättigung lässt sich auch sehr einfach die in der Literatur<sup>9</sup> mehrfach beschriebene Abhängigkeit der Integratorsignale vom  $R_F$ -Wert erklären. Durch Diffusionsvorgänge während des Entwickelns kommt es zu einer Abnahme der Konzentration pro Flächeneinheit. Deshalb nimmt das Integratorsignal mit steigendem  $R_F$ -Wert zu und erreicht je nach Übersättigung des Startflecks und der Polarität des Fliessmittels ab einem  $R_F$ -Wert von ca. 0.3 seinen Maximalwert. Ab  $R_F$  0.7 kann der Fleck so weit auseinanderdiffundiert sein, dass er beim Ausmessen nicht mehr ganz erfasst wird. Dadurch wird eine Abnahme vorgetäuscht. Wenn es gelingt, den Startfleck homogen und ohne Übersättigung aufzutragen, dann ist das Integratorsignal völlig unabhängig vom  $R_F$ -Wert.

#### *Automatisches Auftragegerät*

Für die quantitative Dünnschichtchromatographie sind die Konzentration pro Flächeneinheit, die Konzentrationsverteilung innerhalb des Flecks, die Fleckform und die Fleckgrösse sehr wichtige Faktoren. Die meisten dieser Kriterien werden entscheidend durch den Startfleck beeinflusst. Für eine rationelle Anwendung dieser Analysenmethode ist es sehr wichtig, dass einmal erarbeitete optimale Bedingungen

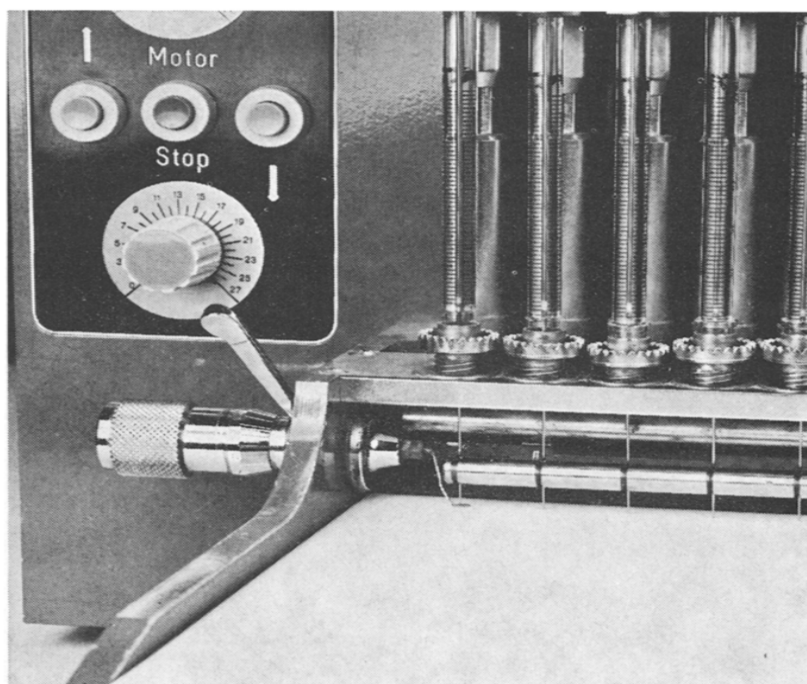


Fig. 3. Detailaufnahme des Auftragegerätes. Der Durchmesser des Startflecks ist durch zwei Elektroden festgelegt.

TABELLE I  
INTEGRATORSIGNAL IN ABHÄNGIGKEIT VON DER SUBSTANZMENGE

| Isopropylantipyrin<br>( $\lambda_{\text{max.}}$ 270 nm) |                          |  | Novalgin<br>( $\lambda_{\text{max.}}$ 270 nm) |                          |  | Bisolvon <sup>*</sup><br>( $\lambda_{\text{max.}}$ 300 nm) |                          |  | Codeinphosphat<br>( $\lambda_{\text{max.}}$ 270 nm) |                          |  | Prostigminbromid<br>( $\lambda_{\text{max.}}$ 260 nm) |                          |  |
|---------------------------------------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------------------|--------------------------|--|------------------------------------------------------------|--------------------------|--|-----------------------------------------------------|--------------------------|--|-------------------------------------------------------|--------------------------|--|
| Substanz-<br>menge ( $\gamma$ )                         | Integrator-<br>einheiten |  | Substanz-<br>menge ( $\gamma$ )               | Integrator-<br>einheiten |  | Substanz-<br>menge ( $\gamma$ )                            | Integrator-<br>einheiten |  | Substanz-<br>menge ( $\gamma$ )                     | Integrator-<br>einheiten |  | Substanz-<br>menge ( $\gamma$ )                       | Integrator-<br>einheiten |  |
| 0.1                                                     | 34                       |  | 0.25                                          | 40                       |  | 0.5                                                        | 72                       |  | 0.5                                                 | 32                       |  | 4.0                                                   | 45                       |  |
| 0.25                                                    | 88                       |  | 0.5                                           | 79                       |  | 1.0                                                        | 144                      |  | 1.0                                                 | 63                       |  | 6.0                                                   | 68                       |  |
| 0.5                                                     | 174                      |  | 0.75                                          | 122                      |  | 1.5                                                        | 208                      |  | 1.5                                                 | 95                       |  | 8.0                                                   | 92                       |  |
| 0.75                                                    | 261                      |  | 1.0                                           | 160                      |  | 2.0                                                        | 282                      |  | 2.0                                                 | 132                      |  | 16                                                    | 183                      |  |
| 1.0                                                     | 345                      |  | 1.5                                           | 218                      |  | 2.5                                                        | 310                      |  | 2.5                                                 | 158                      |  | 24                                                    | 267                      |  |
| 1.2                                                     | 400                      |  |                                               |                          |  |                                                            |                          |  | 3.0                                                 | 182                      |  | 32                                                    | 352                      |  |
| 1.5                                                     | 470                      |  |                                               |                          |  |                                                            |                          |  | 4.0                                                 | 200                      |  |                                                       |                          |  |

\* N-Cyclohexyl-N-methyl-(2-amino-3,5-dibrombenzyl)amin.

für eine Eichgerade oder eine Gehaltsbestimmung jederzeit reproduziert werden können. Dies ist möglich mit Hilfe eines automatisch arbeitenden Auftragegerätes.

Es arbeitet nach dem folgenden Prinzip: Eine bestimmte Menge der Probelösung wird aus einer Mikroliterspritze auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Dabei dient die Kanüle der Spritze als eine Elektrode. Mit Hilfe einer zweiten Elektrode kann jeder beliebige Durchmesser für den Startfleck festgelegt werden (siehe Fig. 3). Sobald der Auftragfleck die zweite Elektrode erreicht, fließt ein Strom, der die Zugabe sofort stoppt. Ist der Fleck getrocknet, wird erneut Probelösung zugegeben. Dieser Vorgang wiederholt sich so lange, bis die gewünschte Menge aufgetragen ist.

Das verwendete Lösungsmittel muss gerade so polar sein, dass die Leitfähigkeit gewährleistet ist. Aber hierin liegt ein grosser Vorteil, denn es ermöglicht eine weitgehend homogene Substanzverteilung im Startfleck. Setzt man dagegen ein sehr polares Lösungsmittel ein, dann erhält man einen "Startring", während ein apolares Lösungsmittel einen fast punktförmigen Startfleck liefert. Beides sind Formen extremer Übersättigung und damit ungünstig.

Fig. 4 zeigt den Prototyp des Auftragegerätes. In wesentlich verbesserter Form und Aufmachung wird dieses Gerät durch die Fa. Camag (Muttensz, Schweiz) vertrieben.

Bei diesem Gerät sind neun Spritzen parallel zueinander angeordnet. Will man Proben auftragen, dann werden zunächst das gewünschte Volumen und der Durchmesser für den Startfleck eingestellt. Die Zugabegeschwindigkeit lässt sich durch regulierbares Heizen der DC-Platte von unten oder durch einen einstellbaren Luft- bzw. Stickstoffstrom von oben beeinflussen. Als Ergebnis erhält man automatisch in kürzester Zeit reproduzierbar neun identische Startflecke. Es können aber nicht nur

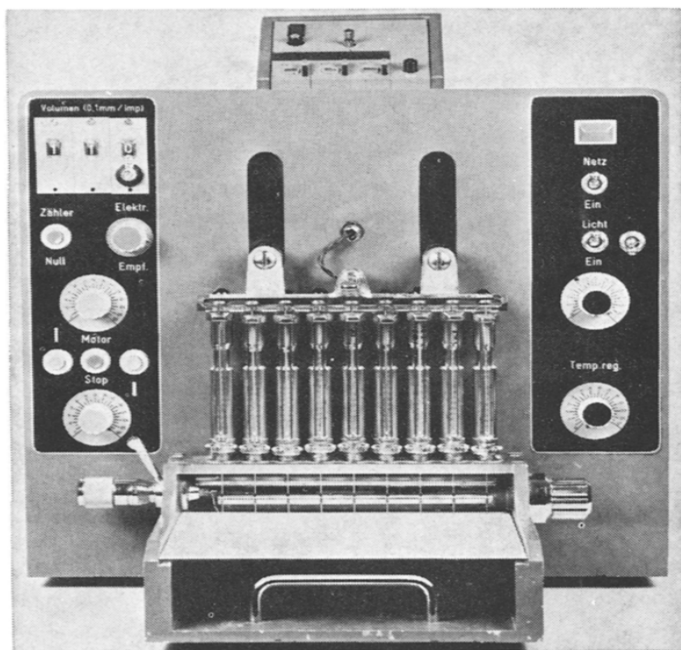


Fig. 4. Auftragegerät zur reproduzierbaren Applikation von neun Proben.

neun vergleichbare Proben, sondern auch Konzentrationsreihen äusserst rationell aufgetragen werden. Wie gezeigt wurde, kommt es ab einer bestimmten Konzentration pro Flächeneinheit zur Übersättigung. Daraus folgert umgekehrt, dass man bei einer Konzentrationsreihe alle Flecken so lange gleich gross auftragen kann, bis die Grenzkonzentration erreicht wird, denn eine "Verdünnung" beeinflusst das Flächenintegral nicht. Zur Aufstellung einer Eichgeraden trägt man steigende Konzentrationen in gleichen Volumina mit dem maximal möglichen Durchmesser auf (der Durchmesser des entwickelten Flecks muss kleiner als 1 cm sein) und stellt fest, bis zu welcher Konzentration die Eichgerade der Funktion  $y=ax$  entspricht.

Für die Anwendung dieses Gerätes spielt die Frage nach seiner Dosierungsgenauigkeit eine entscheidende Rolle. Dazu wurden verschiedene Volumina einer farbigen Lösung auf Kieselgelfolien aufgetragen. Die erhaltenen Startflecke wurden ausgeschnitten. Der Farbstoff wurde eluiert und seine Konzentration photometrisch bestimmt. In Tabelle II sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Um in etwa vergleichbare Extinktionen zu erhalten, wurde eine Stammlösung verschieden verdünnt. Mit Erhöhung der Probenmenge wird der Dosierungsfehler erwartungsgemäss kleiner. Aber selbst im ungünstigsten Fall bei 5  $\mu$ l liegt der Toleranzbereich des Einzelwertes unter 1%.

Um das angewandte Verfahren selbst abzusichern, wurden die Extinktionen von drei Farblösungen bestimmt, deren Konzentrationen sich um je 5% unterschieden. Tabelle III zeigt die Ergebnisse, während in Fig. 5 die graphische Darstellung erfolgt.

TABELLE II

# ÜBERPRÜFUNG DER DOSIERGENAUIGKEIT DES AUTOMATISCHEN AUFTRAGEGERÄTES

|                                                        | Zugegebene Menge ( $\mu$ )                                                    |                                                                               |                                                                               |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
|                                                        | 5                                                                             | 20                                                                            | 40                                                                            |
| Gemessene Extinktionen für die Spritzen <sup>1-0</sup> | 0.636<br>0.635<br>0.633<br>0.635<br>0.636<br>0.635<br>0.632<br>0.631<br>0.631 | 0.725<br>0.725<br>0.728<br>0.723<br>0.729<br>0.725<br>0.722<br>0.723<br>0.722 | 0.740<br>0.743<br>0.742<br>0.743<br>0.742<br>0.741<br>0.742<br>0.743<br>0.743 |
| Mittelwert                                             | 0.634                                                                         | 0.725                                                                         | 0.742                                                                         |
| Standardabweichung                                     | 0.0021                                                                        | 0.0022                                                                        | 0.0011                                                                        |
| Vertrauensbereich des Mittelwertes                     | 0.0016                                                                        | 0.0017                                                                        | 0.0008                                                                        |
| In % vom Mittelwert                                    | 0.249                                                                         | 0.228                                                                         | 0.109                                                                         |
| Toleranzbereich des Einzelwertes                       | 0.0049                                                                        | 0.0052                                                                        | 0.0025                                                                        |
| In % vom Mittelwert                                    | 0.787                                                                         | 0.721                                                                         | 0.346                                                                         |

TABELLE III

**ÜBERPRÜFUNG DER ANGEWANDTEN METHODE**

Es wurden jeweils 40  $\mu$ l von drei verschiedenen konzentrierten Lösungen zugegeben.

| <i>Spritzen</i> | <i>Konzentration (%)</i> | <i>Extinktionen</i> | <i>Mittelwert</i> |
|-----------------|--------------------------|---------------------|-------------------|
| 1-3             | 90                       | 0.750, 0.749, 0.748 | 0.749             |
| 4-6             | 95                       | 0.790, 0.790, 0.790 | 0.790             |
| 7-9             | 100                      | 0.831, 0.837, 0.833 | 0.834             |

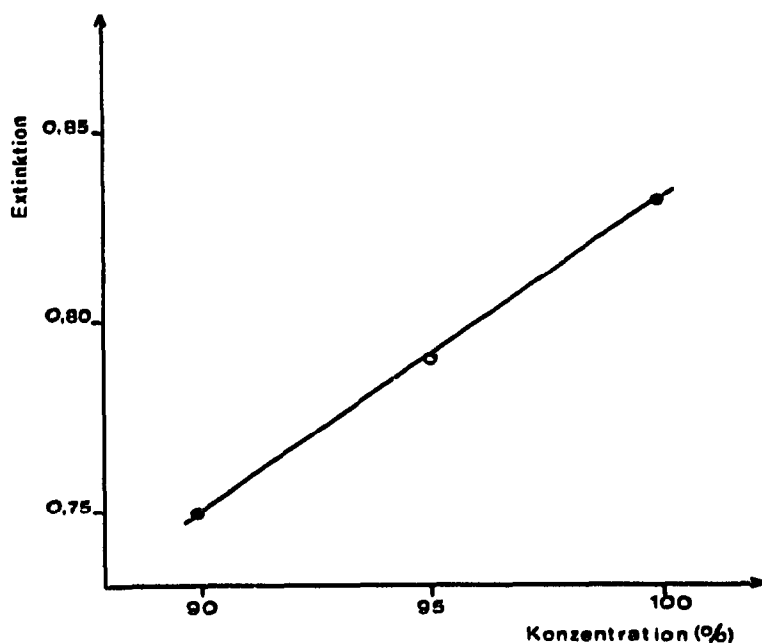


Fig. 5. Überprüfung des Analyseverfahrens, nach dem die Dosierungsgenauigkeit des Auftragegerätes bestimmt wurde.

***Einfluss vorgekühlter Platten auf die quantitative Auswertung***

In vielen Fällen hat es sich für die quantitative Auswertung als günstig erwiesen, die DC-Platte vor der Entwicklung zu kühlen. Bringt man die vorgekühlte Platte (10 min bei 4°) in die gesättigte Normalkammer, dann schlagen sich sofort im Gasraum befindliche Fließmittelmoleküle auf der kalten Schicht nieder. Da sich die Platte schnell auf Zimmertemperatur erwärmt, führt diese Vorbeladung maximal bis zur sorptiven Sättigung der Schicht. Für die quantitative Auswertung ist dabei sehr wichtig, dass man durch eine derartige Behandlung der Platte in vielen Fällen wesentlich homogener verteilte Flecken erhält und eine Schwanzbildung weitgehend unterbindet. Diese Verbesserung wurde in den verschiedensten Fließmittelsystemen beobachtet. Die Hauptursache liegt wohl in einer gleichmässigen Vorbeladung bzw. Desaktivierung der Schicht.

Nach der Standardisierung der Auftragsbedingungen hat man durch diese Vorbelastung die Möglichkeit, die Entwicklung der Platten weitgehend reproduzierbar zu gestalten.

#### *Statistische Beurteilung des Analysenverfahrens*

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Bedingungen liegt der Variationskoeffizient für diese Analysenmethode zwischen 0.8 und 3.5%.

#### DANK

Den Herren J. Ackelbein, H.-J. Dentler und E. Schwortschik sei an dieser Stelle für viele wertvolle Beiträge zu dieser Arbeit gedankt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes erhält man für Transmissionsmessungen in der quantitativen Dünnschichtchromatographie Eichgeraden nach der Funktion  $y=ax$ , wenn man eine Übersättigung der zu messenden Flecke vermeidet. Einmal ermittelte optimale Bedingungen für den Startfleck können mit einem automatisch arbeitenden Auftragsgerät jederzeit reproduziert werden. Es ist möglich, bis zu neun Proben parallel in kurzer Zeit aufzubringen. Für den Startfleck kann man jeden beliebigen Durchmesser vorwählen. Die Eichgeraden nach Lambert-Beer und das Auftragsgerät erlauben eine rationelle Anwendung der quantitativen Dünnschichtchromatographie. Der Variationskoeffizient für diese Methode liegt dabei zwischen 0.8 und 3.5%.

#### LITERATUR

- 1 N. Seiler, G. Werner und M. Wiechmann, *Naturwissenschaften*, 50 (1963) 643.
- 2 N. Seiler und H. Möller, *Chromatographia*, 2 (1969) 470.
- 3 H. Jork, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 17.
- 4 E. Eich, H. Geissler, E. Mutschler und W. Schunack, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 865.
- 5 L. R. Treiber, R. Nordberg und S. Lindstedt, *J. Chromatogr.*, 63 (1972) 211.
- 6 J. C. Touchstone, T. Maruvec, M. Kasparow und W. Wortman, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 490.
- 7 A. P. Schroff und C. J. Shaw, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 509.
- 8 J. L. Martin, *Symp. Quant. Thin-Layer Chromatogr., Loughborough Univ. Technol., Loughborough, Jan., 1971*, p. 63.
- 9 E. J. Shellard (Editor), *Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography*, Academic Press, New York, 1968, pp. 57-70.