

CHROM. 3916

DIREKTE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON SCILLAGLYKOSIDEN AUF DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMMEN DURCH REMISSIONSMESSUNG

K. KRAUS, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER

Pharmazeutisches Institut der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz (Deutschland)

(Eingegangen am 13. Dezember 1968)

SUMMARY

Direct quantitative determination of Scilla glycosides on thin-layer chromatograms by means of remission measurements

Different methods of direct quantitative evaluation of thin-layer chromatograms for the determination of bufadienolides were examined. The evaluation of remission measurements yielded errors of $s_{\text{rel}} < \pm 5\%$ for all determinations. Therefore this method seemed to be superior to transmission measurements of eluates, not only because it is faster, but also because it is more precise.

EINLEITUNG

Vor kurzem berichteten wir über eine verbesserte Arbeitsweise zur quantitativen Bestimmung von Scillaglykosiden in Extrakten und anderen Zubereitungen der Meerzwiebel durch spektralphotometrische Transmissionsmessung nach dünnschichtchromatographischer Trennung^{1,2}. Für Serienanalysen war der Zeitaufwand jedoch noch immer erheblich. Wir versuchten daher, die entwickelten Chromatogramme direkt auszuwerten, um die Zeitdauer der Analysen weiter zu verkürzen. Durch vergleichende Untersuchung verschiedener Messverfahren sollte geprüft werden, welche Methode sich für die quantitative Erfassung von Bufadienoliden am geeignetsten erweist.

DENSITOMETRIE

Die densitometrische Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen wurde in den vergangenen Jahren von verschiedenen Autoren intensiv in zwei Richtungen bearbeitet: als Transmissionsmessung^{5,6} und als Reflexionsmessung⁷. Die Transmissionsmessung schied bei unseren Arbeiten aus, weil das vorgesehene Adsorbens Kieselgel mit einfachen Mitteln nicht transparent zu machen war. Ausserdem hatten INGLE UND MINSHALL^{8,9} festgestellt, dass die Messungen bei reflektiertem Licht günstiger sind als bei transmittiertem Licht. Mit der reflexionsdensitometrischen

Technik auf Dünnschichtplatten wurden die verschiedensten Naturstoffgruppen wie Harze und Balsame¹⁰, Alkaloide¹¹⁻¹³ und Steroide¹⁴⁻¹⁶ dünn-schichtchromatographisch untersucht. Ausserdem wurde über lebensmittelchemische¹⁷ und biochemische¹⁸ Untersuchungen berichtet. Speziell für die Densitometrie wurden verschiedene Geräte entwickelt, wie z.B. das Elphor-¹⁹, das ERI 10-¹¹, das Eppendorf-¹⁴, das Beckman-Spinco-Analytrol-²⁰ und das Chromoscan-Gerät^{10,13,17,21,22}.

Die zum Teil beachtlichen Erfolge, welche in bestimmten Fällen mit reflexionsdensitometrischen Messungen erzielt werden konnten, können jedoch nicht über die schon von WIEME²³ beschriebenen Schwierigkeiten hinwegtäuschen, welche dadurch gegeben sind, dass die entwickelten Flecken eines Chromatogrammes häufig ungleichförmig sind. Eigene Untersuchungen mit dem Chromoscan-Gerät bei der densitometrischen Auswertung der Dünnschichtchromatogramme von Mischungen aus Scillaglykosiden und Scillaextrakten ergaben für die Mischungen der Glykoside einen relativen Fehler von etwa 10% und für die Scillaextrakte von 15%. Bei Chromatogrammen von Scillarohextrakten wuchs der Fehler bis zu 20%. Dieser hohe Messfehler ist nicht zuletzt dadurch bedingt, dass die Detektionsmittel, z.B. Antimontrichlorid, häufig nicht zu stabilen Umsetzungsprodukten führen und auch der Reagenzüberschuss u.U. die Messung stört.

FLUOROMETRIE

Eine weitere Möglichkeit zur direkten Auswertung von Chromatogrammen bietet die Fluorometrie. Bereits 1961 berichteten WELLS *et al.*²⁴ über fluorometrische Bestimmungen von cardiotonischen Steroiden. KNY²⁵⁻²⁷ bestimmte mit einem Fluorometer der Firma VEB Zeiss Digitalis-Glykoside am Papierchromatogramm. Mit einem Trichloressigsäure-Chloramin-Reagenz erhielt er gute Fluoreszenzwerte. SEILER *et al.*²⁸ führten quantitative Bestimmungen von fluoreszierenden Substanzen auf Dünnschichtchromatogrammen mit einem Zusatzgerät zum Zeiss-Spektralphotometer PMQ II durch. KLAUS²⁹ setzte sich 1964 kritisch mit den Möglichkeiten der Auswertung fluorometrischer Messungen von Dünnschichtchromatogrammen auseinander und wies auf die infolge der oft beträchtlichen Abweichungen der Fleckenformen und -grössen gegebenen Grenzen dieses Messverfahrens hin, welche KNY²⁵ durch mathematisch statistische Überlegungen zu erweitern versucht. Fast gleichzeitig mit der Spektrophotofluorometrie wurde für die Analyse aromatischer Verbindungen auf Dünnschichtchromatogrammen eine Spektrophotophosphorimetrie entwickelt³⁰. Für eigene Versuchsbestimmungen wurde das von mehreren Autoren³¹⁻³⁴ beschriebene Turner-Fluorometer herangezogen. Da Scillaglykoside im U.V.-Licht keine Fluoreszenz aufweisen und sich beim Besprühen der Chromatogramme zur Fluoreszenzbildung mit dem Trichloressigsäure-Chloramin-Reagenz nach KAISER³⁵ sich dieselben, schon bei der Densitometrie geschilderten Schwierigkeiten ergaben, konnte nur die Fluoreszenzlöschung auf Dünnschichten mit Fluoreszenzindikator gemessen werden. Hierbei ergab sich bei der Auswertung der Messungen von Mischungen aus Scillareinglykosiden ein relativer Fehler von etwa 10% und bei der Auswertung von vorgereinigten Scillaextrakten ein solcher von etwa 15%. Die Chromatogramme von Scillarohextrakten auf fluoreszierenden Dünnschichten konnten mit dieser Methode überhaupt nicht ausgewertet werden, da die Begleitstoffe die Messungen störten.

U.V.-REMISSIONSMESSUNGEN

In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Autoren Untersuchungen darüber angestellt, wie man durch die Funktion nach KUBELKA und MUNK^{36,37} mit Hilfe von Remissionsmessungen Dünnschichtchromatogramme direkt quantitativ auswerten könnte. Als Grundlage dafür dienten auch Arbeiten von KORTÜM, SCHREYER u.a.³⁸⁻⁴¹ über Reflexionsspektren von Pulvern. Diese Autoren untersuchten u.a. auch die Abhängigkeit der Kubelka-Munk-Funktion von der Korngröße des reflektierenden Pulvers. Während KORTÜM UND VOGEL⁴² diese Erkenntnisse zunächst für eine quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen durch densitometrische Reflexionsmessungen zu verwenden versuchen, ist es bei der weiteren Entwicklung dieser Messmethode vor allem die Gruppe um FRODYMA⁴³⁻⁴⁹, die sich zunächst densitometrisch, später fluorometrisch und mit U.V.-Remissionsmessungen um die quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen bemüht. Mit dem von diesen Autoren angewandten Verfahren können zwar relativ gute Messwerte erreicht werden, jedoch ist damit der Nachteil verknüpft, dass die einzelnen Flecken des Chromatogrammes zur quantitativen Auswertung von der Dünnschichtplatte abgeschabt und homogenisiert werden müssen. Erst dann wird die Substanz in einer Zelle gegen einen Bezugsstandard, z.B. MgO, gemessen. Diese Methode erfordert immer noch zeitraubende Operationen und bedeutet keine wesentliche Verkürzung der Analysendauer gegenüber Transmissionsmessungen nach Eluierung der Substanz. JORK⁵⁰ berichtete 1964 erstmals über ein Chromatogramm-Spektralphotometer der Firma Zeiss für die Dünnschichtchromatographie. In weiteren Arbeiten^{4,51,52} untersuchte er, wie auch KLAUS⁵³, die sich aus diesem Gerät ergebenden Möglichkeiten, die vor allem darin bestehen, dass die Chromatogramme nach der Entwicklung ohne weitere Vorbereitungen direkt ausgewertet werden können. Das ist dadurch möglich, dass das Chromatogramm mit monochromatischem Licht unter einem Winkel von 0° (bezogen auf die Flächennormale) angestrahlt und das diffus zurückgestrahlte, nicht absorbierte Licht unter einem Winkel von 45° gemessen wird. Dabei kann die Dünnschichtplatte zur Aufsuchung und Zentrierung der Substanzflecken auf einem Kreuztisch in x - und y -Richtung bewegt werden. Da diese Messmethode eine beträchtliche Zeitersparnis bringt, schien sie für die hier besprochenen Untersuchungen am besten geeignet zu sein.

Zunächst wurden die in Scillapräparaten hauptsächlich vorkommenden Scillaglykoside Scillaren A, Proscillaridin und Scillirosid dünnschichtchromatographisch getrennt und ihre U.V.-Remissionsspektren aufgenommen. Wie schon früher erwähnt¹, waren bei selbst hergestellten Dünnschichtplatten im Gegensatz zu den Berichten anderer Autoren⁴⁹ Schichtdicke und damit die Schichtstruktur nicht reproduzierbar. Da aber nicht nur die R_F -Werte^{54,55}, sondern auch die Remissionsbedingungen von den verschiedenen Platteneigenschaften abhängen^{41,56}, wurden für alle Bestimmungen Dünnschichtchromatographie-Fertigplatten Kieselgel "Merck"⁵⁷ verwendet. Ausserdem wurde auf Grund früherer Erfahrungen¹ und den Berichten anderer Autoren⁵⁸⁻⁶¹ die Entwicklung der Dünnschichtplatten vor allem hinsichtlich der Kammersättigung, der Temperatur und der Wasserdampfisotherme so reproduzierbar wie möglich gestaltet, indem man in einem Raum bei einer konstanten Temperatur von 25° und einer nahezu völlig konstanten relativen Luftfeuchtigkeit von 30% arbeitete. Die Chromatogramme wurden mit der von GÖRLICH⁶² beschriebenen Mischung Aethylmethylketon-Toluol-Wasser-Methanol-Eisessig (80:10:6:5:2) entwickelt.

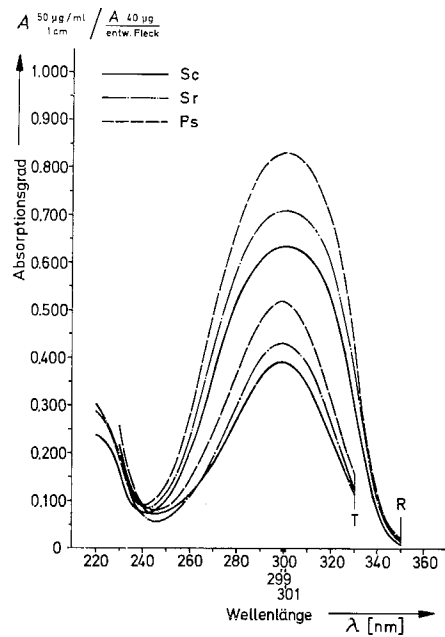
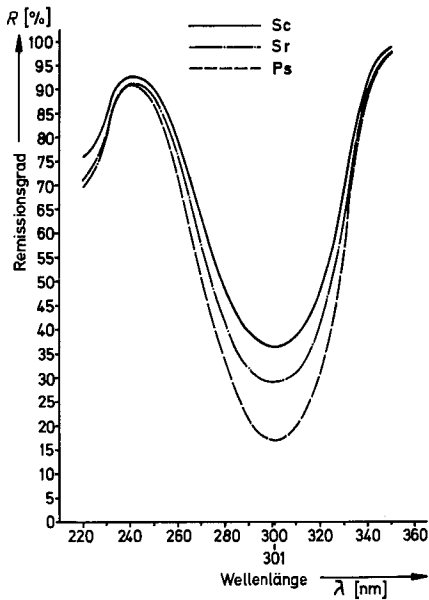


Fig. 1. Remissionsspektren einiger Bufadienolide. Sc = Scillaren A; Sr = Scillirosid; Ps = Proscillaridin.

Fig. 2. Absorptionsspektren einiger Bufadienolide bei Transmissionsmessung (T) und Remissionsmessung (R). Sc = Scillaren A; Sr = Scillirosid; Ps = Proscillaridin.

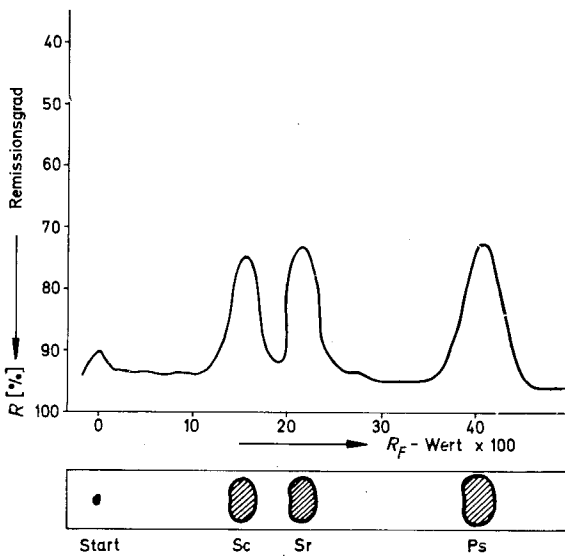


Fig. 3. Remissionsortskurve eines Mischchromatogrammes. Sc = Scillaren A; Sr = Scillirosid; Ps = Proscillaridin.

Nach der Entwicklung wurden die Dünnschichtplatten getrocknet und dann mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer die Remissionsspektren der drei Glykoside aufgenommen (Fig. 1).

Sie wurden mit den Absorptionsspektren von Transmissionsmessungen verglichen (Fig. 2).

Wie bei anderen Substanzen^{63,64} ist auch bei den Scillaglykosiden eine, wenn auch geringe Verschiebung des Absorptionsmaximums sowie eine Verbreiterung der Banden zu beobachten. Diese Erscheinung ist wahrscheinlich durch die von KORTÜM u.a.^{63,65-68} untersuchte Eigenart der molekularen physikalischen Adsorptionsbindung der Substanz an das Sorbens zu erklären. Für die drei untersuchten Herzglykoside Scillaren A, Proscillaridin und Scillirosid wurde bei den Remissionsmessungen ein gemeinsames Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 301 nm gefunden.

Fig. 3 zeigt die bei dieser Wellenlänge registrierte Remissionsortskurve eines entwickelten Mischchromatogrammes der drei Glykoside.

Es ist beachtlich, dass diese Aufnahme mit nur je 4 µg der einzelnen Glykoside gelang. Die quantitative Erfassung wurde sowohl als Flächenberechnung der Halb-

TABELLE I

SCILLAREN A: VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER BESTIMMUNG DES GLYKOSIDES DURCH TRANSMISSIONS- UND REMISSIONSMESSUNGEN

Auftrag am Startfleck (µg)	Transmissions- messung des Eluates		Remissionsmessung der Dünnschichtplatten			
			Fläche $B_h \cdot H$		Fläche planimetriert	
	Verlust (%)	Fehler (± %)	Verlust (%)	Fehler (± %)	Verlust (%)	Fehler (± %)
2.00	4.5	11.3	2.5	4.2	2.5	3.6
4.00	3.7	10.1	2.5	3.6	2.2	3.2
6.00	3.3	8.5	2.0	3.2	1.7	3.1
8.00	2.3	8.3	1.2	3.1	1.2	2.9
10.00	2.1	6.2	1.3	2.9	1.2	2.8

TABELLE II

SCILLIROSID: VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER BESTIMMUNG DES GLYKOSIDES DURCH TRANSMISSIONS- UND REMISSIONSMESSUNGEN

Auftrag am Startfleck (µg)	Transmissions- messung des Eluates		Remissionsmessung der Dünnschichtplatten			
			Fläche $B_h \cdot H$		Fläche planimetriert	
	Verlust (%)	Fehler (± %)	Verlust (%)	Fehler (± %)	Verlust (%)	Fehler (± %)
2.00	4.4	10.8	2.4	4.4	2.5	3.7
4.00	3.7	10.0	2.4	3.7	2.3	3.2
6.00	3.3	9.6	2.3	3.2	1.8	3.0
8.00	2.2	8.3	1.5	3.2	1.3	3.1
10.00	2.1	5.9	1.3	3.1	1.3	2.7

wertsbreite B_h und der Höhe H als auch durch Planimetrieren der von der Ortskurve umschriebenen Fläche vorgenommen. Der Absorptionswert des Untergrundes wurde jeweils berücksichtigt. Die ermittelten Flächen wurden zur Auswertung quadriert.

Zum Vergleich der Messgenauigkeit des Transmissions- und Remissionsverfahrens wurden von verschiedenen Substanzkonzentrationen je neun Messungen an entwickelten Mischchromatogrammen sowohl durch direkte Remissionsmessung von der Dünnschichtplatte als auch durch Transmissionsmessung von Eluaten der Substanzflecke durchgeführt (Tabellen I–III).

In den Tabellen I bis III ist der Substanzverlust durch die chromatographische Entwicklung, d.h. die Differenz zwischen dem Mittelwert aus mehreren Messungen und dem aufgetragenen theoretischen Wert, und der Messfehler, d.h. die Streuung

TABELLE III

PROSCILLARIDIN: VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER BESTIMMUNG DES GLYKOSIDES DURCH TRANSMISSIONS- UND REMISSIONSMESSUNGEN

Auftrag am Startfleck (μg)	Transmissions- messung des Eluates		Remissionsmessung der Dünnschichtplatten			
			Fläche $B_h \cdot H$		Fläche planimetriert	
	Verlust (%)	Fehler (\pm %)	Verlust (%)	Fehler (\pm %)	Verlust (%)	Fehler (\pm %)
2.00	5.1	11.1	2.7	4.5	2.6	3.9
4.00	4.2	10.3	2.7	3.7	2.5	3.3
6.00	3.7	9.5	2.6	3.3	2.1	3.2
8.00	2.6	8.2	1.7	3.2	1.7	3.1
10.00	2.3	6.3	1.5	3.0	1.6	2.9

oder die relative Standardabweichung der Messungen, angegeben. Die Standardabweichung wurde nach

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - N\bar{x}^2}{N - 1}}$$

die relative Standardabweichung in % nach

$$s_{\text{rel}} = \pm \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

berechnet.

Den Tabellen ist zu entnehmen, dass einerseits die Substanzverluste bei der Remissionsmessung geringer sind als bei der Transmissionsmessung, und dass andererseits auch bei geringen Substanzkonzentrationen die Remissionsmessung noch zu genauen Ergebnissen mit einer relativen Standardabweichung unter 5% führt, während bei der Transmissionsmessung in diesem Fall mit einer relativen Standardabweichung, die ca. 10% beträgt, gerechnet werden muss. Wurden die von der Remissionsortskurve umschriebenen Flächen planimetriert, ist der Streubereich noch geringer. Er beträgt dann maximal 3,8% und erreicht damit einen Wert, wie ihn JORK⁵² bei der quantitativen Auswertung von Trimethylxanthin und Acetylsalicylsäure durch direkte Absorptionsmessung und Berechnung nach der Kubelka–Munk-Funktion erhielt. Die

Messgenauigkeit war somit erheblich besser, als wie sie von STRUCK u.a.³ bei der Bestimmung von Androgenen beschrieben wurde. Diese Autoren erreichten mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer eine Messgenauigkeit von $s = \pm 10\%$.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Messungen auf verschiedenen DC-Platten wurden DC-Fertigplatten "Merck" im vorgesehenen Laufmittel zuerst blind entwickelt, dann in einer möglichst staub- und dampffreien Atmosphäre getrocknet. Auf die so vorbereiteten Dünnschichtplatten wurden die Glykosidgemische aufgetragen und entwickelt. Für jede Entwicklung wurde frisches Laufmittel in die Kammer gegeben. Nach der Entwicklung wurden die Platten mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer ausgewertet und die Fläche unter der Remissionsortskurve, wie besprochen, planimetriert. Es wurden fünf Dünnschichtplatten auf diese Weise miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt.

TABELLE IV

REPRODUZIERBARKEIT (FEHLER IN %) DER MESSGENAUIGKEIT MIT DEM CHROMATOGRAMM-SPEKTRALPHOTOMETER AUF VERSCHIEDENEN DÜNNSCICHTPLATTEN

Glykosid	Aufgetragene Glykosidmenge (μg)				
	2	4	6	8	10
Scillaren A ($R_F \times 100 = 16$)	5.3	4.9	4.1	3.7	3.6
Scillirosid ($R_F \times 100 = 22$)	5.4	5.2	4.6	4.1	3.9
Proscillaridin ($R_F \times 100 = 41$)	5.9	5.5	5.3	4.9	4.5

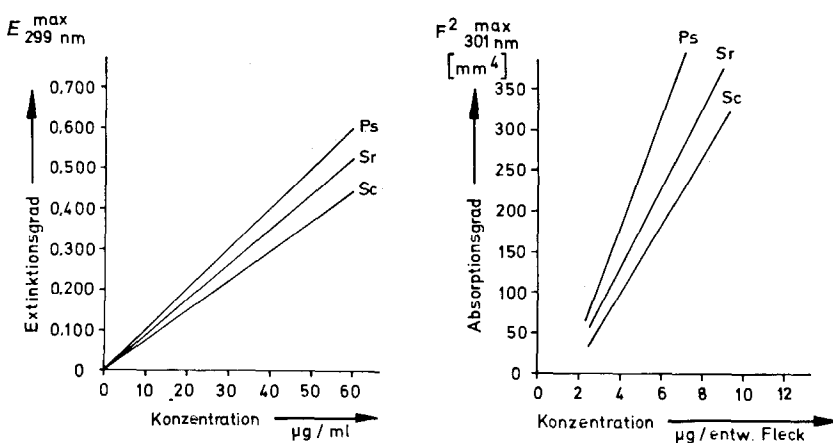


Fig. 4. Eichkurven für Transmissionsmessungen und Remissionsmessungen. Sc — Scillaren A; Sr — Scillirosid; Ps — Proscillaridin.

Die berechneten Fehlerbreiten liegen so günstig, dass es sinnvoll ist, Eichkurven aufzustellen, nach denen vor allem bei Routineuntersuchungen die Substanzkonzentrationen ermittelt werden können (Fig. 4).

Die Eichkurven wurden aus Punktmessungen durch Regressionsberechnungen¹ ermittelt. Für die Remissionsmessungen wurde auf der Ordinate die durch Planimetrieren ermittelte und quadrierte Fläche aufgetragen. Aus den Eichkurven ist zu ersehen, dass mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer die Nachweisgrenze gegenüber der Transmissionsmessung des Eluats unveränderter Glykosidmoleküle um eine Zehnerpotenz erhöht ist. Die Eichkurven bei Remissionsmessung gehen nicht durch den Nullpunkt, und es ist daher zu erwarten, dass sie sich im Bereich sehr kleiner Konzentrationen nicht mehr linear verhalten. Das ist verständlich, weil die registrierten Remissionsmesskurven nicht exakt nach der Kubelka-Munk-Funktion, was die Ermittlung des absoluten Remissionsgrades vorausgesetzt hätte, ausgewertet wurden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Für die zum Vergleich erforderlichen Transmissionsmessungen diente Kieselgel G "Merck" mit Fluoreszenzindikator als Adsorbens. Für die U.V.-Remissionsmessungen wurden DC-Fertigplatten Kieselgel "Merck" ohne Fluoreszenzindikator verwendet.

Selbstbeschichtete Platten wurden bei 140° aktiviert und bis zum Gebrauch im Exsikkator aufbewahrt, Fertigplatten im evakuierten Exsikkator über Phosphor-pentoxid 24 Std. lang teilaktiviert.

Alle vorbereitenden Arbeiten wurden bei einer relativen Luftfeuchtigkeit unter 30% ausgeführt. Die Reinglykoside wurden in einer Mischung aus Methanol und Aethylacetat (50:50) gelöst und je nach Bedarf mit demselben Lösungsmittel für das Auftragen am Startfleck weiterverdünnt. Entwickelt wurde in allen Fällen mit dem Laufmittelgemisch Aethylmethylketon-Toluol-Wasser-Methanol-Eisessig (80:10:6:5:2). Die Laufstrecke betrug 15 cm.

Die Transmissionsmessungen wurden nach KRAUS u.a.¹ durchgeführt.

Für die Remissionsmessungen wurden die DC-Fertigplatten nach ihrer Entwicklung getrocknet und dann mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer der Firma Zeiss ausgewertet. Die Auswertung erfolgte als Absorptionsmessung:

Anordnung	= M-Pr
Wellenlänge	= 301 nm
Spaltbild	= 14 · 0,5 mm
Verstärkung	= 10/1/1A
Geschwindigkeit	= Tisch 3
Schreiber	= 120 mm/min

Die von der Remissionsortskurve umschriebene Fläche wurde entweder durch Halbwertsbreite mal Höhe berechnet, bezüglich des Untergrundes korrigiert und dann quadriert oder planimetriert und die Planimetereinheiten ebenfalls quadriert.

DANK

Die Verfasser möchten an dieser Stelle Herrn Dr. W. TAUSCH in der Firma Carl Zeiss für wertvolle Beratungen und Auskünfte bestens danken.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden verschiedene Methoden der direkten quantitativen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen für die Bestimmung von Bufadienoliden untersucht. Bei der Auswertung der Remissionsmessungen mit dem Chromatogramm-Spektral-photometer wurde für alle Bestimmungen ein Fehler von $s_{rel} < \pm 5\%$ gefunden. Die Methode schien daher nicht nur wegen des geringeren zeitlichen Aufwandes, sondern auch wegen der grösseren Genauigkeit den Transmissionsmessungen von Eluaten überlegen.

LITERATUR

- 1 K. KRAUS, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Arzneimittel-Forsch.*, im Druck.
 - 2 K. KRAUS, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 108 (1968) 679.
 - 3 H. STRUCK, H. KARG UND H. JORK, *J. Chromatog.*, 36 (1968) 74.
 - 4 H. JORK, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 297.
 - 5 F. W. HEFENDEHL, *Planta Med.*, 8 (1960) 65.
 - 6 D. A. FORSS, P. R. EDWARDS, B. J. SUTHERLAND UND R. BIRTWISTLE, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 460.
 - 7 B. M. JOHNSTONE UND G. P. BRINER, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 513.
 - 8 R. B. INGLE UND E. MINSHALL, *J. Chromatog.*, 8 (1962) 369.
 - 9 R. B. INGLE UND E. MINSHALL, *J. Chromatog.*, 8 (1962) 386.
 - 10 H. JORK, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 102 (1962) 1263.
 - 11 W. POETHKE UND W. KINZE, *Pharm. Zentralhalle*, 103 (1964) 577.
 - 12 K. GENEST, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 531.
 - 13 E. J. SHELLARD UND M. Z. ALAM, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 347.
 - 14 N. ZÖLLNER, G. WOLFRAM UND G. AMIN, *Klin. Wochschr.*, 40 (1962) 273.
 - 15 S. HARA, H. TANAKA UND M. TAKEUCHI, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 12 (1964) 626.
 - 16 G. SEMENUK UND W. T. BEHER, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 27.
 - 17 M. COVELLO UND O. SCETTINO, *Farmaco (Pavia), Ed. Sci.*, 20 (1965) 396.
 - 18 J. RONDELET, *J. Pharm. Belg.*, 47 (1965) 323.
 - 19 G. JAYME UND H. KNOLLE, *Z. Anal. Chem.*, 178 (1960) 84.
 - 20 D. A. KEYWORTH UND R. F. SWENSEN, *Talanta*, 13 (1966) 829.
 - 21 J. C. MORRISON UND J. M. ORR, *J. Pharm. Sci.*, 55 (1966) 936.
 - 22 M. S. J. DALLAS, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 337.
 - 23 R. J. WIEME, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 166.
 - 24 D. WELLS, B. KATZUNG UND F. H. MEYERS, *J. Pharm. Pharmacol.*, 13 (1961) 389
 - 25 L. KNY, *Dissertation*, Halle, 1962.
 - 26 L. KNY, *Pharmazie*, 18 (1963) 209.
 - 27 L. KNY, *Pharmazie*, 18 (1963) 295.
 - 28 N. SEILER, G. WERNER UND M. WIECHMANN, *Naturwiss.*, 50 (1963) 643.
 - 29 R. KLAUS, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 311.
 - 30 E. SAWICKI UND J. D. PFAFF, *Anal. Chim. Acta*, 32 (1965) 521.
 - 31 W. M. CONNORS, UND W. K. BOAK, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 243.
 - 32 D. E. JÄNCHEN, *Symposium Chromatographie Elektrophorese*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1968, S. 194.
 - 33 D. JÄNCHEN UND G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 391.
 - 34 G. PATAKI UND E. STRASKY, *Symposium Chromatographie Elektrophorese*, IV, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1968, S. 317.
 - 35 F. KAISER, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 556.
 - 36 P. KUBELKA UND F. MÜNK, *Z. Techn. Physik*, 12 (1931) 593.
 - 37 P. KUBELKA, *J. Opt. Soc. Am.*, 38 (1948) 448.
 - 38 G. KORTÜM UND P. HAUG, *Z. Naturforsch.*, 8a (1953) 372.
 - 39 G. SCHREYER, *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)*, 18 (1958) 123.
- J. Chromatog.*, 40 (1969) 244-253

- 40 G. KORTÜM UND J. VOGEL, *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)*, 18 (1958) 110.
41 G. KORTÜM UND J. VOGEL, *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)*, 18 (1958) 230.
42 G. KORTÜM UND J. VOGEL, *Angew. Chem.*, 71 (1959) 451.
43 M. M. FRODYMA, R. W. FREI UND D. J. WILLIAMS, *J. Chromatog.*, 13 (1964) 61.
44 M. M. FRODYMA UND R. W. FREI, *J. Chromatog.*, 15 (1964) 501.
45 M. M. FRODYMA UND R. W. FREI, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 131.
46 M. M. FRODYMA, V. T. LIEU UND R. W. FREI, *J. Chromatog.*, 18 (1965) 520.
47 R. W. FREI UND H. ZEITLIN, *Anal. Chim. Acta*, 32 (1965) 32.
48 R. W. FREI UND M. M. FRODYMA, *Anal. Chim. Acta*, 32 (1965) 501.
49 VAN T. LIEU, R. W. FREI, M. M. FRODYMA UND I. T. FUKUL, *Anal. Chim. Acta*, 33 (1965) 639.
50 H. JORK, *Symposium Chromatographie Elektrophorese, III*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1964, S. 295.
51 H. JORK, *Planta Med.*, 13 (1965) 489.
52 H. JORK, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 17.
53 R. KLAUS, *Pharm. Ztg.*, 112 (1967) 480.
54 M. S. J. DALLAS, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 193.
55 D. JÄNCHEN, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 195.
56 W. HUBER, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 378.
57 H. HALPAAP, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 144.
58 M. BRENNER, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 199.
59 F. GEISS UND H. SCHLITT, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 208.
60 F. GEISS UND M. TH. VAN DER VENNE, *Symposium, Chromatographie Elektrophorese, IV*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1968, S. 153.
61 J. PITRA, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 220.
62 B. GÖRLICH, *Arzneimittel-Forsch.*, 15 (1965) 493.
63 G. KORTÜM, J. VOGEL UND W. BRAUN, *Angew. Chem.*, 70 (1958) 651.
64 H. JORK, *Symposium Chromatographie Elektrophorese, IV*, Presses Académiques Européennes, Brüssel, 1968, S. 227.
65 G. KORTÜM UND W. BRAUN, *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)*, 18 (1958) 242.
66 G. KORTÜM UND J. VOGEL, *Chem. Ber.*, 93 (1960) 706.
67 G. KORTÜM UND V. SCHLICHENMAIER, *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)*, 48 (1966) 267.
68 G. KORTÜM UND W. BRAUN, *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)*, 48 (1966) 282.
69 R. D. SPENCER UND B. H. BEGGS, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 52.
70 F. GEISS UND S. SANDRONI, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 201.