

CHROM. 5486

QUANTITATIVE *IN SITU*-AUSWERTUNG VON DÜNNSCHICHT-  
CHROMATOGRAMMEN MIT ÜBERTRAGBAREN EICHKURVEN

R. KLAUS

*Analytisches Zentrallaboratorium der Fa. E. Merck\*, Darmstadt (B.R.G.)*

(Eingegangen am 15. April 1971)

## SUMMARY

*Quantitative in situ evaluation of thin-layer chromatograms with transferable calibration curves*

Possibilities of simplifying quantitative fluorometric or absorption photometric *in situ* analyses are discussed. Statistical investigations of test mixtures based on the technique of application in bands demonstrated that a transfer of values between various thin-layer plates is permissible for low application quantities. In an earlier piece of work dealing with the quantitative evaluation of non-quantitative application the use of an internal standard as reference was discussed. Using this reference there exists, furthermore, the possibility of a transfer of measured value quotients between re-emission and transmission at low application quantities.

## EINLEITUNG

In neuerer Zeit wurden von verschiedenen Autoren Verfahren ausgearbeitet, die eine Vereinfachung der quantitativen *in situ*-Auswertung von Dünnschicht (DC)-Chromatogrammen zum Ziele haben. So verwendet KOKRÉM<sup>1</sup> eine aus der Kubelka-Munk-Theorie resultierende Beziehung, die nach einer Messung des Remissionsgrades des z.B. in einer kreisförmigen Messflächenbegrenzung justierten Analysenfleckes dessen Konzentrationsbestimmung erlaubt. Die ebenfalls in die Gleichung eingehende Fläche der belegten Zone wird durch Planimetrieren bestimmt. Dies dürfte, wie chromatographische Erfahrungen zeigen, in vielen Fällen nur unter Inkaufnahme einer gewissen Ungenauigkeit möglich sein.

Einen gänzlich anderen Weg zeigen GOLDMANN UND GOODALL<sup>2,3</sup>. Ausgehend von der Kubelka-Munk-Theorie lichtstreuender Medien leiten die Autoren eine Gleichung für ein Flächenelement ab, mit deren Hilfe unter Einbeziehung des Streulichtes der Adsorptionsschicht die Flächenelementbelegung bestimmt werden kann. Hierzu erforderliche Operationen wie Untergrundinterpolation, Messwertumrechnung bzw. die Integration der einzelnen Flächenelementbelegungen machen jedoch den Einsatz eines Computers erforderlich, eine Tatsache, die zwar eine schnelle Auswertung der Analyse erbringt, aber mit einem hohen Kostenaufwand verbunden ist.

\* Leiter: Abt.-Dir. Dr. J. Friess.

Eine weitere Möglichkeit zur Verminderung des analytischen Umfanges wird von KLAUS in einer früheren Publikation<sup>1</sup> angedeutet. So wird unter anderem indirekt darauf hingewiesen, dass bei Anwendung der Bandentechnik die integrierten Extinktionsortswerte bei konstanten Substanzmengen unter Einhaltung gewisser Bedingungen weitgehend unabhängig von der jeweiligen Bandenausbreitung sein sollten. Damit in Zusammenhang stehend konnte ferner gezeigt werden, dass durch den Bezug auf einen inneren Standard eine quantitative Auswertung auch bei einer nicht-quantitativen Auftragung möglich ist.

Die Einbeziehung dieses Effektes in die Analyse sollte ausreichend sein, um eine Universalität von Eichkurven insbesondere hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit von Platte zu Platte erwarten zu lassen. Trifft dies für eine Substanz zu, so können mit einer einmal erstellten Eichkurve alle weiteren Analysen der gleichen Substanz ausgeführt werden. Dies würde ohne zusätzliche Kosten zu einer wesentlichen Verringerung sowohl des chromatographischen als auch des messtechnischen Aufwandes führen.

#### ALLGEMEINBESCHREIBUNG DER CHROMATOGRAPHISCHEN TECHNIK

Die Untersuchungen, die zur Bestätigung dieser Theorie vorgenommen wurden, setzten sich sowohl aus Analysen mit fluoreszierenden Substanzen als auch aus solchen mit Farbstoffen zusammen. Für die aufzutragenden Lösungen wurden Modellsubstanzen verwendet, welche neben einer variablen Komponente, entsprechend einem zu bestimmenden Substanzbestandteil, eine konstante Komponente als inneren Standard enthielten. Die Konzentrationen der Lösungen wurden so gewählt, dass sich beim Auftragen von jeweils 50–100  $\mu$ l auf einem etwa 1,5 cm langen Band in einem günstigen Messbereich liegende Messwerte ergaben. Das Auftragen der Banden erfolgte mit dem Gerät "Linomat" der Firma Camag, Muttenz (Schweiz). Chromatographiert wurde auf DC-Fertigplatten Kieselgel F. Bei einigen Messreihen wurden, um die Grenzen einer erforderlichen Normierung zu erkennen, die Versuchsbedingungen bewusst variiert, z. B. wurden Chromatogrammen mit verschiedener Kammer-sättigung hergestellt, bzw. Aluminiumoxid als Adsorptionsmaterial verwendet.

#### ALLGEMEINE MESSTECHNISCHE ANGABEN

Zur Photometrierung stand ein Chromatogramm-Spektralphotometer der Fa. C. Zeiss, Oberkochen, einschliesslich einer Registriereinheit zur Aufzeichnung der Messwertortskurven zur Verfügung. Aufgrund der Bandenform der belegten Zonen wurde mit einer spaltförmigen Messfläche (0,5  $\times$  10 mm) gearbeitet. Während bei fluorimetrischen Analysen eine lineare Registrierung des Messsignals  $F$  angebracht ist, bieten sich für Absorptionsanalysen neben zwei Messmöglichkeiten verschiedene Messgrössen an. Nach eigenen Versuchen bzw. theoretischen Arbeiten von GOLDMANN UND GOODALL<sup>2,3</sup> zeichnen sich *in situ*-Messungen im durchfallenden Licht gegenüber Remissionsanalysen durch eine grössere Empfindlichkeit aus. Jedoch im Hinblick darauf, dass direkte UV-Analysen die Remissionstechnik voraussetzen, ist beiden Möglichkeiten bei den Versuchen Rechnung getragen worden. Als Messgrössen werden die Differenzen zwischen den logarithmisch registrierten Durchlässigkeitswerten bzw. Remissionswerten und der jeweiligen 100 %-Linie eingesetzt:  $A \lg D$  bzw.  $A \lg R$ . Wenn sich

auch bei Remissionsmessungen von Banden eine Umrechnung der Remissionswerte nach Kubelka-Munk anbietet, so ist dem geringeren rechnerischen Aufwand beim Arbeiten mit den logarithmischen Remissionswerten bei etwas ausgeprägteren Kurvenkrümmungen der Vorzug gegeben worden.

Sowohl bei Fluoreszenz- als auch bei Absorptionsanalysen werden im allgemeinen die Spektren der variablen Komponente und der Bezugskomponente nicht identisch sein. Hierauf ist bei der Festlegung der Wellenlänge für die Registrierung der Ortskurven zu achten. Letztere kann erfolgen:

(a) bei den Wellenlängen der für die beiden Banden charakteristischen Messwertmaxima und

(b) bei einem Überschneiden der Fluoreszenz- bzw. Absorptionsspektren mit einer zwischen den beiden Messwertmaxima liegenden Wellenlänge.

Bei fluorimetrischen Bestimmungen unter Anwendung des Verfahrens (a) erfährt die Übertragbarkeit der Messwertquotienten allerdings *a priori* eine gewisse Einschränkung: Die in den Photometern verwendeten Strahlungsempfänger unterliegen einem Alterungsprozess, der unter anderem in einer von der Wellenlänge abhängigen Empfindlichkeitsverminderung besteht. Für den Messwertquotienten muss daher über grössere Zeiträume mit einer gewissen gerätebedingten Inkonzanz gerechnet werden. Diese Unsicherheit kann durch Arbeiten nach dem Verfahren (b) umgangen werden.

Für die Eichkurven selbst werden schliesslich die Quotienten der integrierten Messwertortskurven der variablen Komponente A und des inneren Standards B

$$q_F = \frac{(\sum F_\lambda)_A}{(\sum F_\lambda)_B}$$

für Fluoreszenzanalysen und

$$q_D = \frac{[(\sum 1/gD)_\lambda]_A}{[(\sum 1/gD)_\lambda]_B}$$

bzw.

$$q_R = \frac{[(\sum 1/gR)_\lambda]_A}{[(\sum 1/gR)_\lambda]_B}$$

für Absorptionsanalysen in Abhängigkeit der prozentualen Zusammensetzung der Eichsubstanzen graphisch aufgetragen.

#### FLUORESZENZANALYSEN

Fluorimetrische *in situ*-Analysen sind, wie bereits in einer früheren Arbeit<sup>6</sup> mitgeteilt wurde, mit einem relativ geringen photometrischen Schwierigkeitsgrad behaftet. Die Ursache hierfür ist darin zu suchen, dass ausschliesslich die mit Substanz belegten Flächenelemente zu dem jeweiligen Messergebnis beitragen.

Sieht man von gerätebedingten, durch die Lichtführung der Photometer eventuell verursachten Messwertbeeinflussungen ab, so ist in einem gewissen Konzentrationsbereich eine Unabhängigkeit der integrierten Messwerte von der Bandenausbreitung gewahrt. Dieser Effekt wirkt sich im positiven Sinn auf die Übertragbarkeit von *in situ*-Eichkurven aus.

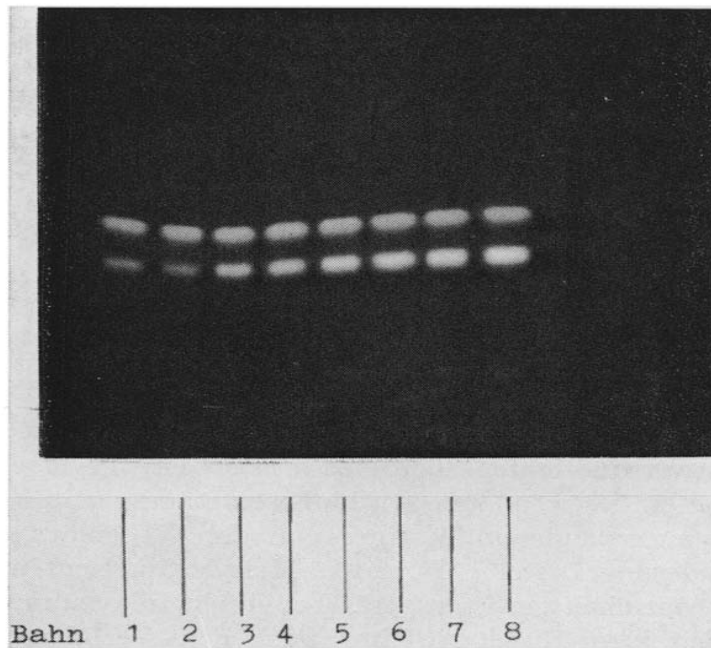


Fig. 1. Photographisches Positiv einer für die Eichkurve Fig. 3 vorbereiteten DC-Platte mit den Komponenten Fluorescein und Eosin. Aufgetragene Mengen: Eosin — Bahn 1–8 je  $5 \mu\text{g}$ ; Fluorescein — Bahn 1 und 2,  $0.1 \mu\text{g}$ ; 3 und 4,  $0.3 \mu\text{g}$ ; 5 und 6,  $0.5 \mu\text{g}$  und 7 und 8,  $0.7 \mu\text{g}$ . DC-Plattiglatte: Kieselgel  $F_{254}$ . Steigmittel: Benzol-Dioxan-Essigsäure (100:25:1). Kammersättigung.

Ein wesentliches Kriterium für eine Übertragbarkeit von Messwerten dürfte mit einer statistischen Analyse zu erbringen sein, welcher wiederholte Messungen der gleichen Probe sowohl auf einer Platte als auch auf verschiedenen DC-Platten zugrunde liegen. Als Modellsubstanz wurde die Kombination Fluorescein-Eosin eingesetzt. Die Einwaage für die Ausgangslösung war so gewählt, dass diese auf den inneren Standard Eosin bezogen 6% Fluorescein enthielt. Eine Nachverdünnung erfolgte derart, dass beim Arbeiten — der Versuch wurde bei achtfacher Wiederholung nach dem angegebenen System durchgeführt — mit jeweils  $100 \mu\text{l}$   $0.3 \mu\text{g}$  Fluorescein bzw.  $5 \mu\text{g}$  Eosin aufgetragen wurden. Weitere chromatographische Parameter sind aus der Legende zu Fig. 1 ersichtlich. Fig. 2 gibt die unkorrigierten Fluoreszenzspektren der Komponenten der Testmischung wieder. Als charakteristische Größe des zu prüfenden Sachverhaltes eignet sich neben dem Mittelwert  $\bar{q}_F$  der jeweiligen Messreihe die Streuung der Einzelwerte, ausgedrückt durch deren Standardabweichung  $s_q$ . Für den beschriebenen Versuch sind die Ergebnisse unter Verwendung der Quotienten

$$q_F = \frac{(\Delta F_{525 \text{ nm}})_{\text{Fluorescein}}}{(\Delta F_{565 \text{ nm}})_{\text{Eosin}}}$$

in Tabelle I zusammengefasst.

Neben der relativ guten Übereinstimmung der beiden Mittelwerte  $\bar{q}_F$  ist die geringe Differenz der Standardabweichungen  $s_q$  der beiden Messreihen a und b hervorzuheben. Die Messwertübertragbarkeit bei fluorimetrischen Analysen soll jedoch mit einer weitergehenden Interpretation dieses Ergebnisses gewertet werden.

Durch die Einordnung des Mittelwertes  $(q_F)_0$  in den berechneten Streubereich  $q_F \pm s_q$  der Mittelwerte der Messreihe a wird bestätigt, dass die Verteilungsfunktionen der beiden Messreihen annähernd identisch sind. Dies ist Voraussetzung für die Übertragbarkeit. In Fig. 3 ist die aus mehreren DC-Platten resultierende Eichkurve mit auf Eosin bezogenen Fluoreszeinkonzentrationen von 2, 6, 10 und 14% wiedergegeben.

TABELLE I

FLUORESZENZMESSWERTQUOTIENTEN  $q_F = (\Delta F_{525 \text{ nm}})_{\text{Fluoreszein}} / (\Delta F_{565 \text{ nm}})_{\text{Eosin}}$  FÜR  $c_{\text{Fluoreszein}} = 0,3 \mu\text{g}$  BZW.  $c_{\text{Eosin}} = 5 \mu\text{g}$

Messreihe a: achtmalige Wiederholung auf einer Platte.  
Messreihe b: Wiederholung auf acht verschiedenen Platten.

Bahn	$q_F$	
	a	b
1	2,71	2,71
2	2,57	2,40
3	2,78	2,60
4	2,77	2,50
5	2,67	2,80
6	2,85	2,70
7	2,73	2,50
8	2,50	2,77
<hr/>		
$q_F$	2,70	2,65
$s_q$ (%)	4,3	4,0
$s_q$ (0,1)	1,5	1,7

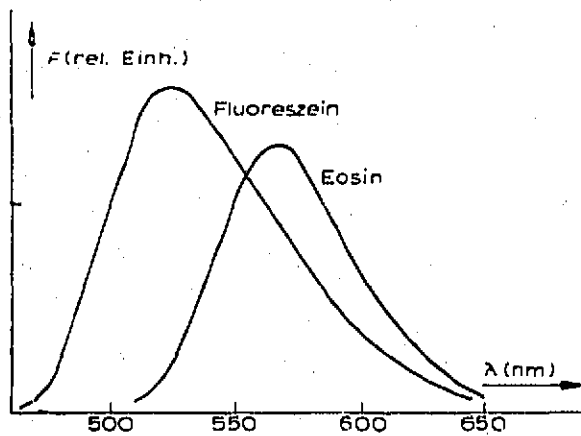
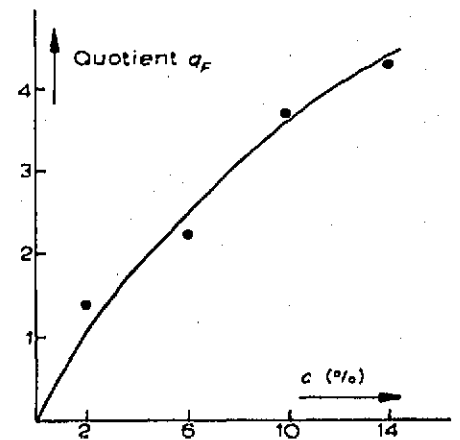


Fig. 2. Fluoreszenzspektren von Fluoreszein und Eosin.

Fig. 3. Fluoreszein-Eichkurve.



Mit weiteren Versuchen sollten eventuelle messtechnische Auswirkungen bei abweichenden chromatographischen Bedingungen experimentell festgestellt werden.

Es zeigte sich wie erwartet, dass weder eine geringfügige Veränderung der Bandenauftragungsgeschwindigkeit noch der Steigzeit — beide führen zu abweichenden Fleckbelegungen — zu einer Beeinflussung der Messwertquotienten führt.

#### ABSORPTIONSANALYSEN

Während photometrische Absorptionsanalysen mit punktförmiger Auftragung infolge der Inhomogenität der Messflächen nicht unproblematisch sind, z.B. bei Fleckgrößenveränderung durch Plattenrandeffekte, vermindern sich bei bandenförmigem Arbeiten die Störmöglichkeiten erheblich. Hierdurch sind gewisse positive Rückwirkungen auf die zu prüfende Übertragbarkeit von Messergebnissen zu erwarten. Als Kriterium für diese Übertragbarkeit soll wiederum — analog den fluorimetrischen Untersuchungen — der statistischen Analyse einer Probe auf einer DC-Platte (Messreihe a) die derselben auf verschiedenen Platten (Messreihe b) gegenübergestellt werden.

Als Modellsubstanz wurde eine 30%ige Mischung Ceresrot-Fettgelb bei aufgetragenen Absolutmengen von 3  $\mu\text{g}$  bzw. 10  $\mu\text{g}$  gewählt. Zu den weiteren chroma-

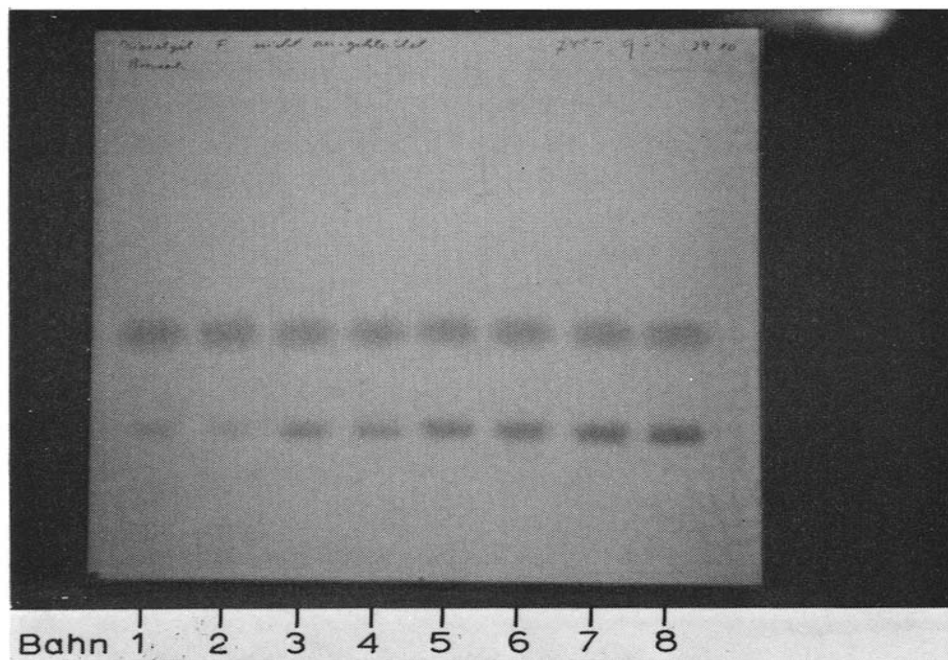


Fig. 4. Photographisches Positiv einer für die Eichkurve Fig. 5 vorbereiteten DC-Platte mit der Farbstoffkombination Ceresrot-Fettgelb. Aufgetragene Mengen: Fettgelb — Bahn 1-8 je 10  $\mu\text{g}$ ; Ceresrot — Bahn 1 und 2, 1  $\mu\text{g}$ ; 3 und 4, 3  $\mu\text{g}$ ; 5 und 6, 5  $\mu\text{g}$  und 7 und 8, 7  $\mu\text{g}$ . DC-Fertigplatte: Kieselgel F<sub>254</sub>. Steigmittel: Benzol. Ohne Kammer sättigung.

tographischen Bedingungen sei auf die Legende der Fig. 4 hingewiesen. Die zu den Quotienten

$$q_R = \frac{[(\sum I)_{500 \text{ nm}}]_{\text{Ceresrot}}}{[(\sum I)_{490 \text{ nm}}]_{\text{Fettgelb}}}$$

umgerechneten Remissionsmesswerte der beiden Messreihen, deren Mittelwerte  $q_R$  und Standardabweichung  $s_q$  bzw.  $s_q$  sind in Tabelle II zusammengefasst. Eine Gegenüberstellung dieser Grössen einschliesslich der Einordnung des Mittelwertes  $q_R$  der Messreihe *b* in den Streubereich  $q_R \pm s_q$  der Messreihe *a* veranschaulicht die Übertragbarkeit der Messwertquotienten.

TABELLE II

REMISSIONSMESSWERTQUOTIENTEN  $q_R = (\sum \lg B)_{300 \text{ nm Ceresrot}} / (\sum \lg B)_{300 \text{ nm Fettgelb}}$  FÜR Ceresrot = 3  $\mu\text{g}$  BZW. Ceresrot = 10  $\mu\text{g}$

Messreihe *a*: achtmalige Wiederholung auf einer Platte.

Messreihe *b*: Wiederholung auf acht verschiedenen Platten.

Bahn	$q_R$	
	<i>a</i>	<i>b</i>
1	0,415	0,303
2	0,395	0,380
3	0,415	0,410
4	0,382	0,410
5	0,425	0,395
6	0,420	0,370
7	0,404	0,390
8	0,390	0,410
$q_R$	0,400	0,392
$s_q$ (%)	4,0	5,0
$s_q$ (%)	1,5	2,1

Fig. 5 gibt die wiederum aus mehreren DC-Platten resultierende Eichkurve für den Farbstoff Ceresrot unter Bezug auf den als inneren Standard verwendeten Farbstoff Fettgelb wieder.

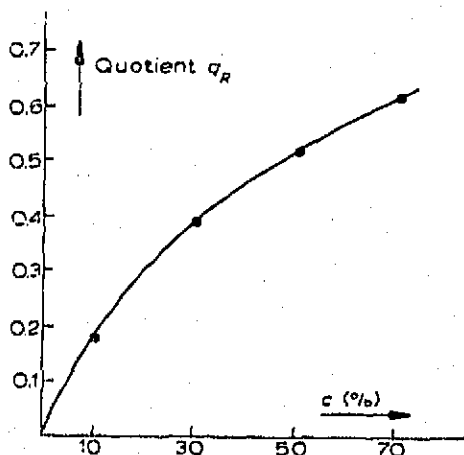


Fig. 5. Ceresrot-Eichkurve.

Zur Abschätzung des erforderlichen Normierungsgrades der chromatographischen Technik für eine Übertragbarkeit von Eichkurven wurden weiterhin mehrere mit zwei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen Ceresrot und Fettgelb als innerem

Standard hergestellte Chromatogrammen in Remission untersucht: Neben einer Variation der Kammersättigung wurde der Einfluss der Adsorptionsmaterialien auf die Messwertquotienten getestet. Fig. 6 gibt in Ergänzung zu Fig. 4 eine Trennung Ceresrot-Fettgelb auf einer Kieselgel  $F_{254}$ -Platte wieder. Abweichend von den in der Legende der Fig. 4 gemachten Angaben ist lediglich der Grad der Kammersättigung.

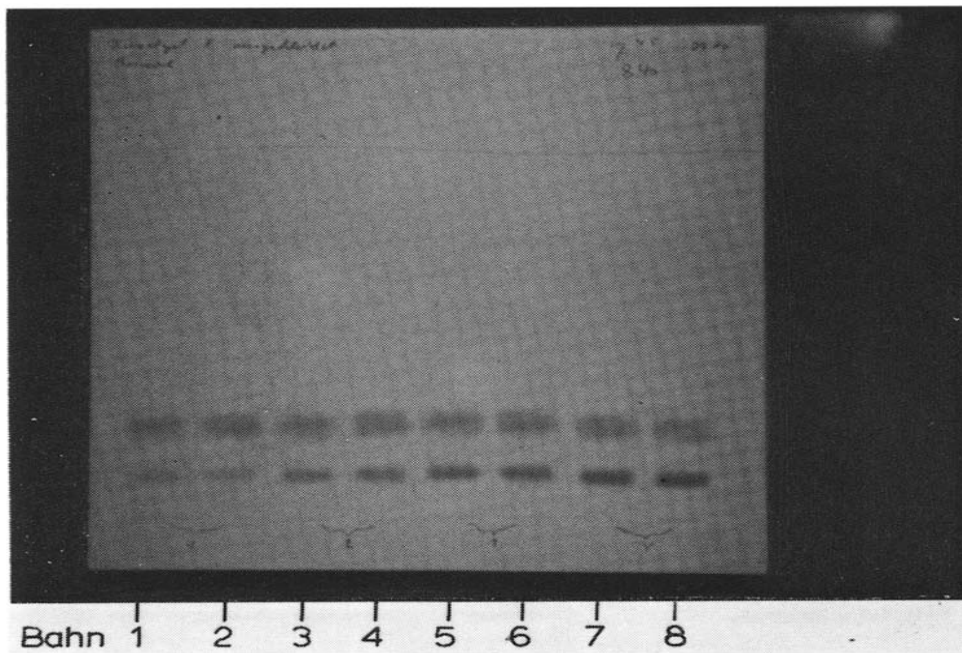


Fig. 6. Photographisches Positiv einer DC-Platte mit der Farbstoffkombination Ceresrot-Fettgelb. Chromatographische Bedingungen analog Fig. 4, jedoch mit Kammersättigung.

TABELLE III

REMISSIONSMESSWERTQUOTIENTEN  $q_R = [(2,1 \mu g R)_{500 \text{ nm}}]_{\text{Ceresrot}} / [(2,1 \mu g R)_{500 \text{ nm}}]_{\text{Fettgelb}}$  FÜR ZWEI VERSCHIEDENE KONZENTRATIONSVERHÄLTNISSE CERESROT-FETTGELB BEI ABWEICHENDEN CHROMATOGRAPHISCHEN BEDINGUNGEN

Chromatographische Bedingungen		$q_R$	
		30% Ceresrot-Fettgelb (3 $\mu g$ : 10 $\mu g$ )	50% Ceresrot-Fettgelb (5 $\mu g$ : 10 $\mu g$ )
Kieselgel $F_{254}$	Ohne Kammersättigung	0,380	0,520
	Mit Kammersättigung	0,382	0,500
Aluminiumoxid	Ohne Kammersättigung	0,498	0,657
	Mit Kammersättigung	0,488	0,688

Aus den in der Tabelle III zusammengefassten Mittelwerten der für jeden Versuch mehrfach durchgeführten Analysen können hinsichtlich einer Normierung unter anderem folgende Aussagen gemacht werden:



(a) Der Umfang der Kammersättigung ist, geringe Auftragsmengen vorausgesetzt, ohne Rückwirkung auf die Messwertquotienten.

(b) Das Adsorptionsmaterial ist von entscheidendem Einfluss auf die Messwertquotienten.

Hiermit dürften mit der einleitend bereits erwähnten Unabhängigkeit der Messwertquotienten von den aufgetragenen absoluten Substanzmengen, geringe Auftragsmengen wiederum vorausgesetzt, wesentliche Normierungsbedingungen aufgezeigt sein.

#### VERGLEICH REMISSION-TRANSMISSION

In den bereits erwähnten Publikation von GOLDMANN UND GOODALL werden unter Bezug auf die Kubelka-Munk-Differentialgleichungen lichtstreuender Medien unter anderem zwei Gleichungen abgeleitet, welche einen funktionellen Zusammenhang herstellen zwischen den Grössen Transmission  $T$  bzw. Reflexion  $R$  einerseits und dem Absorptionskoeffizienten  $K$ , Streulichtkoeffizienten  $S$  bzw. der Schichtdicke  $X$  andererseits. Unter Zugrundelegen dieser Funktionen ermitteln die Autoren zwei Kurvenscharen

$$-\lg \frac{R}{R_0} = f(KX) \text{ und } -\lg \frac{T}{T_0} = f(KX)$$

mit  $SX$  als Parameter (Fig. 7).

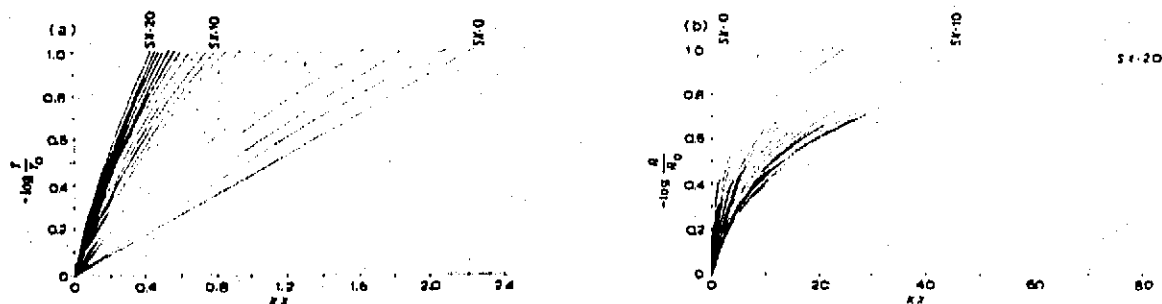


Fig. 7. (a) Absorption durch Transmission,  $-\lg(T/T_0)$ , als Funktion von  $KX$  mit  $SX$  als Parameter nach GOLDMANN UND GOODALL<sup>2</sup>. (b) Absorption durch Reflexion,  $-\lg(R/R_0)$ , als Funktion von  $KX$  mit  $SX$  als Parameter nach GOLDMANN UND GOODALL<sup>2</sup>.

Analysiert man diese Kurvenscharen hinsichtlich zu erwartender Messergebnisse von vergleichenden Remissions- bzw. Transmissionsmessungen bei bandenförmiger Auftragung und Bezug auf einen inneren Standard<sup>3</sup>, so ist die Wahrscheinlichkeit nicht

TABELLE IV

VERGLEICH DER MESSWERTQUOTIENTEN  $q_D = [(\sum \lg D)_{300 \text{ nm}}]_{\text{Ceresrot}} / [(\sum \lg D)_{300 \text{ nm}}]_{\text{Peltgelb}}$  UND  $q_R = [(\sum \lg R)_{300 \text{ nm}}]_{\text{Ceresrot}} / [(\sum \lg R)_{300 \text{ nm}}]_{\text{Peltgelb}}$  FÜR ZWEI VERSCHIEDENE KONZENTRATIONSVERHÄLTNISSE CERESROT-PELTGELB

Konzentrationsverhältnis Ceresrot-Peltgelb	$q_D$	$q_R$
30% (3 $\mu\text{g}$ :10 $\mu\text{g}$ )	0,391	0,381
50% (5 $\mu\text{g}$ :10 $\mu\text{g}$ )	0,545	0,508

auszuschliessen, dass bei nicht zu grossen aufgetragenen Substanzmengen die Messwertquotienten bei Remissionsanalysen bzw. Transmissionsanalysen sich nur geringfügig unterscheiden. Diese Theorie konnte durch einen Versuch, bei welchem auf mehreren DC-Platten zwei verschiedene Konzentrationsverhältnisse Ceresrot-Fettgelb aufgetragen waren und sowohl in Remission als auch in Transmission gemessen wurden, bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefasst.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über Möglichkeiten der Vereinfachung quantitativer fluorimetrischer bzw. absorptionsphotometrischer *in situ*-Analysen berichtet. Ausgehend von der bandenförmigen Auftragstechnik wird mit statistischen Untersuchungen von Testmischungen der Beweis erbracht, dass eine Übertragbarkeit von Messwerten zwischen verschiedenen DC-Platten bei geringen Auftragsmengen zulässig ist. Durch den bereits in einer früheren Arbeit — im Zusammenhang einer quantitativen Auswertung bei nichtquantitativer Auftragung — erwähnten Bezug auf einen inneren Standard wird darüber hinaus eine Übertragbarkeit von Messwertquotienten zwischen Remission und Transmission für geringe Auftragsmengen möglich.

#### LITERATUR

1. G. KORTUM, *Sonderband 75 Jahre Abteilung für optische Messinstrumente 1891-1968*, Carl Zeiss, Oberkochen, 1968, S. 71.
  2. J. GOLDMANN UND R. R. GOODALL, *J. Chromatogr.*, **32** (1968) 24.
  3. J. GOLDMANN UND R. R. GOODALL, *J. Chromatogr.*, **40** (1969) 345.
  4. R. KLAUS, *J. Chromatogr.*, **40** (1969) 235.
  5. R. KLAUS, *J. Chromatogr.*, **16** (1964) 311.
- J. Chromatogr.*, **62** (1971) 99-108