

CHROM. 8182

RELATIONS STRUCTURE-MOBILITÉ EN CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES

APPLICATIONS À QUELQUES PROGESTATIFS

A. PUECH, G. KISTER et J. CHANAL

Laboratoire National de Contrôle des Médicaments, 14, Rue École de Pharmacie, 34000-Montpellier (France)

(Reçu le 31 janvier 1974; manuscrit modifié reçu le 10 janvier 1975)

SUMMARY

Structure-mobility relationships in thin-layer chromatography. Applications to some progestogens

A study has been made on the quantitative relationship between the chromatographic mobility and the structure of progestogenic steroids. The coefficient K , corresponding to the fundamental skeleton, and the parameters of different substituents were calculated from the R_M values. The results obtained with eighteen steroids tested in two solvent systems of low dielectric constant and low polarity have been improved satisfactorily.

INTRODUCTION

La chromatographie sur couches minces a très rapidement remplacé la chromatographie sur papier dans le cas des stéroïdes, en raison d'une plus grande souplesse d'emploi. Toutefois, procédant à la fois de phénomènes d'adsorption, de partage et d'échanges d'ions, elle s'accommode relativement moins bien des considérations théoriques qui s'appliquent avec d'assez bons résultats à la chromatographie sur papier. Aussi, les travaux relatifs à la corrélation structure-mobilité en chromatographie sur couches minces présentent un intérêt certain pour l'analyste.

RAPPEL DE LA THÉORIE RELATIVE À LA RELATION STRUCTURE-MOBILITÉ

Le problème de la corrélation structure-mobilité a été étudié sur le plan théorique par Martin¹ et repose sur deux points:

(i) La relation qui relie la variation du potentiel chimique ($\Delta\mu$) d'un soluté A lors du transfert d'un soluté 1 à un soluté 2, au coefficient de partage α :

$$\Delta\mu_A = RT \frac{(N_{A2})}{(N_{A1})} \ln \alpha$$

(ii) L'additivité des potentiels chimiques élémentaires relatifs aux groupes constitutifs d'une molécule donnée

$$\Delta\mu_A = x \Delta\mu_{C=O} + y \Delta\mu_{OH} + \dots$$

L'intérêt de ces formules prend toute sa signification lorsqu'on se souvient que la chromatographie sur papier est une chromatographie de partage dans laquelle le R_F et α sont liés par la relation

$$\frac{R_F}{1 - R_F} = \alpha$$

De très nombreux travaux théoriques et pratiques ont alors été réalisés pour tenter de prouver le bien-fondé de la théorie de Martin, appliquée à la chromatographie sur papier, parmi lesquels nous citerons ceux de Bate-Smith *et al.*² et de Reichl³.

Avec l'introduction de la chromatographie sur couches minces où le R_F peut encore être lié à un pseudo-coefficient de partage, de nouvelles recherches ont été effectuées et nous citerons les travaux de Lisboa⁴, qui a attiré l'attention sur la complexité des phénomènes mis en jeu, ceux de Feher⁵, de Hara et Mibe⁶ et ceux de Hakl⁷, qui se rapportent aux molécules stéroïdiques.

Hakl a, en particulier, attiré l'attention sur les précautions à prendre lors de l'utilisation de l'équation de Bate-Smith *et al.*

$$R_M = \log \frac{1 - R_F}{R_F}$$

Il faut rappeler, en effet, que si le R_F prend ses valeurs dans l'intervalle $|0,1|$, R_M prend ses valeurs dans un intervalle $|+\infty, 0|$. Une erreur constante dans la mesure des R_F entraîne une erreur dans la détermination des R_M , variable en fonction de la valeur du R_F et Hakl précise que les valeurs de $R_F < 0.05$ ou > 0.90 ont peu d'intérêt, l'intervalle valable se réduisant à $|0.15, 0.75|$. Certains auteurs semblent oublier ce point fondamental et les résultats qui échappent à cette règle seront donc peu significatifs.

Malgré les difficultés à priori prévisibles, il nous a paru opportun, dans un travail dont le but était d'identifier d'une manière rapide et sûre certains stéroïdes à effet progestatif utilisés actuellement dans le domaine pharmaceutique, d'intégrer nos résultats à l'ensemble des recherches effectuées dans le but d'approfondir la relation structure-mobilité en chromatographie sur couches minces.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Matériel

Compte tenu des objectifs fixés et des renseignements apportés par des travaux précédents, nous avons tenté de réduire au minimum l'erreur instrumentale en utilisant des cuves type Sandwich Camag et un lot de Gel de Silice HF₂₅₄ Merck.

Les plaques, de 20 × 20 cm et de 0.25 mm d'épaisseur, ont été activées 30 min avant l'emploi.

Stéroïdes utilisés

Une série de treize molécules retenues en fonction de leur structure relativement simple doit permettre de calculer les paramètres se rapportant aux groupements rencontrés dans les stéroïdes progestatifs.

Solvants

Nous n'avons retenu que des systèmes binaires, constitués d'un solvant apolaire et d'un solvant polaire. Le système apolaire peut être choisi parmi les hydrocarbures ou parmi certains organochlorés: Nous avons utilisé le benzène, qui avait déjà été retenu par de nombreux auteurs. Le choix du solvant polaire et l'influence de sa concentration sont les points essentiels des conditions opératoires.

Nous avons dû écarter les cétones qui ne permettaient pas une interprétation satisfaisante des résultats et les alcools qui, bien que préconisés par certains auteurs, entraînent soit des phénomènes de démixion importants à faible concentration, soit des séparations peu efficaces à forte concentration.

Les systèmes qui nous ont donné les meilleurs résultats sont des systèmes à faible constante diélectrique et relativement chimiquement inertes, du type benzène-acétate d'éthyle et benzène-éther éthylique. L'influence de la concentration a été étudiée en utilisant trois solutions benzéniques contenant respectivement 15-30 et 45 % de solvant polaire.

RÉSULTATS ET CALCULS DES PARAMÈTRES

Les résultats concernant les stéroïdes de référence sont rassemblés dans les Tableaux I et II. Les R_F sont les R_F moyennés à partir de quatre essais, l'erreur absolue pouvant être considérée comme constante et égale à 0.005. Les R_M sont calculés à partir de la formule de Bate-Smith *et al.*

Calcul des paramètres

Nous considérons que le R_M est donné par la formule générale établie par Bate-Smith *et al.* et reprise par Hakl:

$$R_M = \log \frac{1 - R_F}{R_F} = K + \sum(\Delta R_M, a)$$

où K représente le coefficient lié au squelette et $\Delta R_M, a$ représente la variation de la fonction R_M lorsqu'on introduit un groupement fonctionnel (a) sur le squelette.

Calcul de K . Le calcul de K est effectué à partir de deux stéroïdes présentant respectivement un et deux fois le même groupement fonctionnel. Nous avons effectué ce calcul en émettant deux hypothèses de travail: (i) l'influence du site est sensiblement nulle sur la valeur ΔR_M d'un groupement fonctionnel et (ii) l'interaction de deux groupements fonctionnels identiques, mais distants de plus de deux carbones est sensiblement nulle.

Calcul de ΔR_M . Nous distinguerons ceux obtenus directement à partir de deux stéroïdes et ceux déterminés indirectement, en faisant appel à des paramètres déjà préalablement calculés et qui sont donc moins précis. Les résultats obtenus pour les différents paramètres sont rapportés dans les Tableaux III et IV.

TABLEAU I

VALEUR DES R_F TROUVÉS ET DES R_M CALCULÉS DES STÉROÏDES DE RÉFÉRENCE

Système: benzène-éther éthylique.

No.	Stéroïde	Éther éthylique (%)					
		15		30		45	
		R_F	R_M	R_F	R_M	R_F	R_M
I	5 α -Androstane-17 one	0.725	-0.421	0.845	-0.736	0.890	-0.908
II	5 α -Androstane-3,17 dione	0.370	0.231	0.565	-0.113	0.655	-0.278
III	Δ^4 -Androstane-3,17 dione	0.190	0.629	0.350	0.268	0.460	0.069
IV	5 α -Androstane-3 β ol-17 one	0.160	0.720	0.290	0.388	0.380	0.212
V	5 α -Androstane-3 α ol-17 one	0.175	0.673	0.330	0.307	0.450	0.087
VI	5 α -Androstane-3 one-17 β ol	0.180	0.658	0.340	0.288	0.460	0.069
VII	9 β ,10 α -Pregnadiène-4,6 dione-3,20	0.220	0.549	0.405	0.167	0.480	0.035
VIII	Hydroxy-17 α méthyl-6 α pregnen-4 one acétate-20	0.680	-0.327	0.810	-0.629	0.860	-0.788
IX	4-Androsten-17 β ol-17 α éthylnyl-3 one	0.200	0.602	0.385	0.203	0.500	0
X	19-Nor-17 α éthylnyl-4 androsten-17 β ol-3 one	0.165	0.704	0.340	0.288	0.455	0.078
XI	4-Estren-17 α éthylnyl-17 β ol-3 one acétate	0.345	0.278	0.555	-0.096	0.630	-0.231
XII	5 α -Androstane-3 one-17 α méthyl-17 β ol	0.220	0.549	0.365	0.240	0.465	0.061

TABLEAU II

VALEUR DES R_F TROUVÉS ET DES R_M CALCULÉS DES STÉROÏDES DE RÉFÉRENCE

Système: benzène-acétate d'éthyle.

No.	Stéroïde	Acétate d'éthyle (%)					
		15		30		45	
		R_F	R_M	R_F	R_M	R_F	R_M
I	5 α -Androstane-17 one	0.700	-0.368	0.830	-0.688	0.910	-1.00
II	5 α -Androstane-3,17 dione	0.330	0.307	0.645	-0.249	0.82	-0.658
III	Δ^4 -Androstane-3,17 dione	0.165	0.704	0.435	0.113	0.67	-0.307
IV	5 α -Androstane-3 β ol-17 one	0.150	0.753	0.360	0.249	0.55	-0.087
V	5 α -Androstane-3 α ol-17 one	0.160	0.720	0.410	0.158	0.63	-0.231
VI	5 α -Androstane-3 one-17 β ol	0.160	0.720	0.415	0.149	0.63	-0.231
VII	9 β ,10 α -Pregnadiène-4,6 dione-3,20	0.185	0.644	0.480	0.034	0.70	-0.368
VIII	Hydroxy-17 α méthyl-6 α pregnen-4 one acétate-20	0.70	-0.368	0.840	-0.720	0.905	-0.980
IX	4-Androsten-17 β ol-17 α éthylnyl-3 one	0.20	0.602	0.465	0.061	0.70	-0.368
X	19-Nor-17 α éthylnyl-4 androsten-17 β ol-3 one	0.160	0.720	0.410	0.158	0.645	-0.259
XI	4-Estren-17 α éthylnyl-17 β ol-3 one acétate	0.330	0.307	0.625	-0.222	0.82	-0.658
XII	5 α -Androstane-3 one-17 α méthyl-17 β ol	0.190	0.629	0.430	0.122	0.680	-0.327

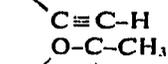
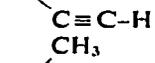
L'examen du Tableau III permet de constater que, dans le cas du mélange benzène-éther éthylique, la valeur des ΔR_M , a est assez peu affectée par la concentration du solvant en éther éthylique. Par contre, l'examen du Tableau IV traduit un effet très important de la concentration en acétate d'éthyle qui influence considérablement la valeur des ΔR_M , a.

APPLICATIONS ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les valeurs des ΔR_M calculées à partir des groupements fonctionnels précé-

TABLEAU III

VALEURS DE K ET DES $R_{M,a}$ ÉTABLIS À PARTIR DES STÉROÏDES DE RÉFÉRENCE
 Systeme: benzène-éther éthylique.

Structure	Éther éthylique (%)		
	15	30	45
	Valeur de K		
	-1.073 ± 0.021	-1.359 ± 0.025	-1.54 ± 0.033
	ΔR_M des groupements fonctionnels		
Calcul direct			
-C=O sur cycle	0.652 ± 0.022	0.623 ± 0.025	0.630 ± 0.033
-C=C-C=O sur cycle	1.050 ± 0.025	1.00 ± 0.025	0.976 ± 0.030
-OH en 3β	1.141 ± 0.028	1.126 ± 0.020	1.120 ± 0.035
-OH en 3α	1.094 ± 0.026	1.043 ± 0.026	0.995 ± 0.035
-OH en 17β	1.079 ± 0.026	1.024 ± 0.020	0.977 ± 0.030
-H en C-19	0.102 ± 0.030	0.085 ± 0.019	0.078 ± 0.020
Calcul indirect			
C=O sur chaîne	0.452 ± 0.070	0.417 ± 0.053	0.510 ± 0.069
-C=C-C=C-C=O sur cycle	1.170 ± 0.135	1.109 ± 0.085	1.060 ± 0.110
O-C-CH ₃	0.192 ± 0.140	0.227 ± 0.097	0.162 ± 0.078
	0.620 ± 0.105	0.560 ± 0.059	0.560 ± 0.070
	0.199 ± 0.099	0.178 ± 0.078	0.250 ± 0.084
	0.97 ± 0.054	0.976 ± 0.060	0.970 ± 0.075

dents, permettent d'envisager le calcul du R_F théorique du vaste ensemble des stéroïdes présentant le même squelette et certaines combinaisons de ces groupements. La comparaison des R_F théoriques aux R_F effectivement obtenus dans les mêmes conditions expérimentales permettra d'apprécier la validité des hypothèses. Les résultats obtenus pour une série de 18 molécules appartenant à la fois aux progestatifs et à des stéroïdes non progestatifs sont rassemblés dans les Tableaux V et VI.

Systeme benzène-éther éthylique

Dans un solvant à 15% d'éther éthylique, on constate une bonne corrélation entre la structure et la mobilité (17 molécules sur 18 étudiées). Le norgestrel, qui échappe à cette corrélation, présente un squelette légèrement différent de celui de l'androstane.

TABLEAU IV

VALEURS DE K ET DES $R_{M,a}$ ÉTABLIS À PARTIR DES STÉROÏDES DE RÉFÉRENCE
 Systeme: benzène-acétate d'éthyle.

Structure	Acétate d'éthyle (%)		
	15	30	45
	<i>Valeur de K</i>		
	-1.038 ± 0.020	-1.13 ± 0.025	-1.35 ± 0.040
	<i>ΔR_M des groupements fonctionnels</i>		
Calcul direct			
-C=O sur cycle	0.670 ± 0.020	0.438 ± 0.025	0.350 ± 0.040
-C=C-C=O sur cycle	1.070 ± 0.025	0.801 ± 0.025	0.690 ± 0.035
-OH en 3β	1.123 ± 0.026	0.938 ± 0.025	0.920 ± 0.035
-OH en 3α	1.088 ± 0.026	0.846 ± 0.025	0.770 ± 0.035
-OH en 17β	1.088 ± 0.026	0.837 ± 0.025	0.770 ± 0.035
-H en C-19	0.118 ± 0.030	0.097 ± 0.018	0.108 ± 0.020
Calcul indirect			
C=O sur chaîne	0.493 ± 0.057	0.250 ± 0.058	0.160 ± 0.085
-C=C-C=C-C=O sur cycle	1.125 ± 0.092	0.915 ± 0.091	0.822 ± 0.130
O-C-CH ₃ O	0.058 ± 0.11	0.06 ± 0.11	0.100 ± 0.170
OH C	0.570 ± 0.059	0.390 ± 0.058	0.290 ± 0.085
C≡CH O-C-CH ₃ O	0.157 ± 0.085	0.001 ± 0.078	0.100 ± 0.110
C≡CH CH ₃ C	0.998 ± 0.054	0.814 ± 0.060	0.675 ± 0.090
OH C			

Dans le système à 30% d'éther éthylique, le lynestrénol et l'éthinyl-5 estrénol s'écartent des prévisions théoriques sans qu'aucune explication satisfaisante n'ait pu être proposée. Le pregnanediol, qui échappe également aux prévisions, présente une chaîne latérale en C-17 dont l'influence était prévisible.

Les résultats obtenus dans le système à 45% n'attirent aucune remarque supplémentaire.

Système benzène-acétate d'éthyle

Dans le système benzène-acétate d'éthyle, deux molécules seulement s'écartent des prévisions théoriques: le norgestrel déjà évoqué et l'acétate d'étyndiol pour lequel le R_F calculé est trop élevé. Ceci est probablement lié au fait que le site du groupement acétate interfère et que la transposition au C-3 de la valeur calculée pour un groupement en C-18 n'est pas rigoureusement superposable.

TABLEAU V
COMPARAISON ENTRE RÉSULTATS THÉORIQUES ET EXPÉRIMENTAUX
Système benzène-éther éthylique.

No.	Stéroïde	Éther éthylique (%)											
		15			30			45					
		R _F obs.	Intervalle	R _F calc.	C	R _F obs.	Intervalle	R _F calc.	C	R _F obs.	Intervalle	R _F calc.	C
1	Testostérone	0.09	0.07-0.09	0.08	+	0.19	0.16-0.20	0.18	+	0.29	0.24-0.32	0.28	+
2	Nortestostérone	0.085	0.05-0.08	0.065	+	0.17	0.13-0.18	0.15	+	0.25	0.20-0.30	0.24	+
3	Déhydrotestostérone	0.05	0.04-0.09	0.06	+	0.115	0.11-0.18	0.14	+	0.19	0.18-0.32	0.24	+
4	Méthyltestostérone	0.11	0.08-0.12	0.10	+	0.215	0.16-0.24	0.20	+	0.30	0.22-0.35	0.28	+
5	Norméthandrolone	0.09	0.06-0.10	0.08	+	0.19	0.13-0.21	0.17	+	0.26	0.18-0.32	0.25	+
6	Norgestriénone	0.145	0.09-0.19	0.13	+	0.30	0.21-0.38	0.29	+	0.42	0.29-0.54	0.41	+
7	Norgestrel	0.26	0.12-0.23	0.17	-	0.46	0.28-0.41	0.34	-	0.57	0.37-0.54	0.46	-
8	Noréthynodrel	0.34	0.25-0.43	0.335	+	0.54	0.48-0.62	0.55	+	0.65	0.56-0.72	0.65	+
9	Lynestrénol	0.63	0.61-0.76	0.69	+	0.755	0.80-0.86	0.84	-	0.80	0.86-0.91	0.89	-
10	Ethinyl-5 estrénol	0.63	0.61-0.76	0.69	+	0.755			-	0.80			-
11	Etyndiol diacétate	0.675	0.66-0.88	0.78	+	0.815	0.82-0.92	0.88	+	0.85	0.85-0.95	0.92	+
12	Pregnandione	0.45	0.43-0.56	0.48	+	0.65	0.62-0.72	0.67	+	0.71	0.65-0.77	0.71	+
13	Pregnanediol	0.05	0.06-0.08	0.07	+	0.11	0.13-0.18	0.16	-	0.17	0.21-0.31	0.26	-
14	Pregnanetriol	0.015	0	0	+	0.02	0.01-0.02	0.02	+	0.03	0.03-0.05	0.03	+
15	Médroxyprogestérone acétate	0.19	0.12-0.30	0.19	+	0.39	0.25-0.45	0.34	+	0.48	0.32-0.56	0.44	+
16	Mégestrol acétate	0.18	0.08-0.30	0.155	+	0.370	0.18-0.42	0.29	+	0.47	0.25-0.56	0.39	+
17	Chlormadinone acétate	0.195	0.08-0.30	0.155	+	0.375	0.18-0.42	0.29	+	0.46	0.25-0.56	0.39	+
18	Pregnénolone	0.215	0.19-0.28	0.23	+	0.38	0.34-0.45	0.40	+	0.47	0.37-0.53	0.45	+

TABLEAU VI
COMPARAISON ENTRE RÉSULTATS THÉORIQUES ET RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX
Système: benzène-acétate d'éthyle.

No.	Stéroïde	Acétate d'éthyle (%)							
		15		30		45			
		R _F obs.	Intervalle	R _F calc.	C	R _F obs.	Intervalle	R _F calc.	C
1	Testostérone	0.08	0.06-0.08	0.07	+	0.245	0.21-0.27	0.24	+
2	Nortestostérone	0.065	0.04-0.07	0.06	+	0.210	0.17-0.24	0.20	+
3	Dehydrotestostérone	0.045	0.05-0.08	0.06	+	0.180	0.15-0.25	0.19	+
4	Méthyltestostérone	0.085	0.07-0.11	0.085	+	0.280	0.20-0.30	0.25	+
5	Norméthandrolone	0.08	0.05-0.09	0.07	+	0.230	0.16-0.26	0.21	+
6	Norgestérone	0.14	0.10-0.21	0.14	+	0.39	0.26-0.45	0.35	+
7	Norgestrel	0.25	0.12-0.21	0.16	-	0.565	0.34-0.48	0.41	-
8	Noréthynodrel	0.345	0.26-0.39	0.32	+	0.635	0.55-0.68	0.62	+
9	Lynestrénol	0.67	0.63-0.74	0.69	+	0.80	0.78-0.85	0.81	+
10	Éthinyl-5 estrénol	0.67	0.63-0.74	0.69	+	0.80	0.78-0.85	0.81	+
11	Étynodiol diacétate	0.69	0.74-0.90	0.83	-	0.83	0.85-0.94	0.90	-
12	Pregnandione	0.43	0.37-0.48	0.43	+	0.74	0.68-0.78	0.73	+
13	Pregnanediol	0.05	0.06-0.03	0.07	+	0.175	0.19-0.24	0.21	±
14	Pregnanetriol	0.01	0	0	+	0.035	0.03-0.04	0.04	+
15	Médroxyprogestérone acétate	0.18	0.14-0.29	0.20	+	0.495	0.38-0.64	0.51	-
16	Mégestrol acétate	0.18	0.13-0.26	0.19	+	0.475	0.29-0.61	0.45	+
17	Chlormadinone acétate	0.19	0.13-0.26	0.19	+	0.49	0.29-0.61	0.45	+
18	Pregnénolone	0.20	0.17-0.25	0.21	+	0.46	0.41-0.53	0.47	+

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus avec deux systèmes de solvants de faible constante diélectrique et de faible polarité nous ont permis de trouver une corrélation relativement satisfaisante entre la structure de certaines molécules stéroïdiques et leur mobilité.

Plusieurs points doivent retenir notre attention :

(i) Le facteur concentration en solvant polaire, qui peut avoir ou ne pas avoir, selon le solvant utilisé, d'influence notable sur le ΔR_M d'un groupe. Nous avons d'ailleurs observé que le benzène, essentiellement retenu en fonction de travaux antérieurs utilisés comme référence, ne peut être considéré comme un solvant absolument inerte et doué du seul rôle de support du solvant polaire.

(ii) Le calcul de la valeur des paramètres dont l'imprécision augmente très rapidement lorsqu'il n'est pas possible d'utiliser un couple de stéroïdes identiques au groupement à étudier près.

(iii) Les problèmes d'interférence entre groupements, résolus à l'aide de coefficients par certains auteurs, n'ont pas été envisagés sous cet aspect, par suite d'un nombre beaucoup trop faible de molécules étudiées. On peut cependant considérer, à partir de cette expérimentation, qu'en l'absence d'effets stériques particuliers, l'interaction entre deux groupements non disposés côte-à-côte est sensiblement nulle. Dans le cas où plusieurs groupements sont situés sur le même atome de carbone, il est préférable de considérer l'ensemble ainsi formé comme un nouveau groupement plutôt que d'essayer de rechercher une relation entre le ΔR_M de l'ensemble et ceux des éléments qui constituent cet ensemble. Le cas intermédiaire, groupements situés sur deux carbones adjacents, ne pourrait être abordé qu'à l'aide d'une expérimentation considérable, sans rapport avec le but premier de ce travail.

(iv) Enfin, il nous faut souligner que de nombreux systèmes de solvants ont dû être écartés en raison de l'importance du phénomène de démixion. Ce phénomène, qui n'est pas une gêne absolue pour l'analyste lorsque l'on travaille à front perdu, nous interdit par contre toute étude théorique. Des hypothèses complémentaires seront envisagées pour essayer d'interpréter les résultats expérimentaux déjà acquis avec ces systèmes.

RÉSUMÉ

Une étude sur les relations structure-mobilité en chromatographie sur couches minces a été entreprise pour quelques progestatifs. Le coefficient K lié au squelette de la molécule et l'influence de diverses substitutions ont été calculés à partir des R_M . Des résultats satisfaisants ont été obtenus avec dix-huit stéroïdes testés dans deux systèmes solvant de faible constante diélectrique et de faible polarité.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. J. P. Martin, *Biochem. Soc. Symp.*, 3 (1949) 4.
- 2 E. C. Bate-Smith, R. G. Westall et A. E. Bradfield, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 427.
- 3 E. R. Reichl, *Monatsh. Chem.*, 86 (1955) 69.
- 4 B. P. Lisboa, *J. Chromatogr.*, 19 (1965) 81.
- 5 T. Fehér, *J. Chromatogr.*, 19 (1965) 551.
- 6 S. Hara et K. Mibe, *Chem. Pharm. Bull.*, 15 (1967) 1036.
- 7 J. Hakl, *J. Chromatogr.*, 71 (1972) 319.