

CHROM. 8956

SÉPARATION DE PRODUITS PHARMACEUTIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

INFLUENCE DE L'EAU. II.

C. GONNET et J. L. ROCCA

Équipe de Recherches Associée au C.N.R.S. (E.R.A. 474: MM. Porthault et Lamotte), Laboratoire de Chimie Analytique III, Université Claude Bernard, Lyon I, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69621 Villeurbanne (France)

(Reçu le 22 septembre 1975; manuscrit modifié reçu le 1 décembre 1975)

SUMMARY

Separation of pharmaceutical compounds using high-performance liquid chromatography. Influence of water. II.

The use of ternary solvent systems as mobile phases in combination with highly efficient chromatographic columns is of particular interest for the analysis of pharmaceutical and biological compounds. The solute-silanol group interactions decrease when the eluent is blended with water. Good selectivities are found with such systems.

INTRODUCTION

La chromatographie en phase liquide à haute performance a connu ces dernières années un essor considérable résultant principalement de l'amélioration de l'efficacité des colonnes chromatographiques. Cette technique d'analyse, au même titre que la chromatographie en phase gazeuse, devient dès lors un outil extrêmement précieux pour la séparation de divers produits. Compte tenu du nombre croissant de travaux rapportés dans la littérature ces dernières années, c'est certainement dans les domaines pharmaceutique et biologique que cette technique a fait le plus grand nombre d'adeptes¹⁻⁴. Il faut cependant souligner les problèmes de détection de tels produits ainsi que leurs dosages (nécessité de synthétiser des dérivés absorbant en ultraviolet, nombreuses incompatibilités avec les phases mobiles etc., sensibilités des détecteurs). L'analyse de milieux biologiques (sang, urine, cellules, etc.) nécessite parfois des extractions préalables pour l'analyse quantitative des produits intéressants ce qui peut rendre plus délicat le problème de la détection. L'existence de différentes voies métaboliques contribue encore parfois à augmenter la complexité de ces problèmes de dosage et de détection. Il reste un grand nombre de cas pour lesquels cette technique de séparation peut apporter une solution rapide et efficace aux problèmes sinon impossibles, du moins difficiles à résoudre jusque là.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à la mise au point de systèmes simples pour l'analyse de stéroïdes, barbituriques, phénothiazines, benzodiazépines, dibenzazépines et bases pyrimidiques. Les séparations sont faites à partir de produits purs (milieux synthétiques); nous n'avons pas abordé, dans cette étude de mise au point de systèmes simples, l'analyse des milieux biologiques (milieux naturels).

L'importance des différentes classes de produits cités ci-dessus nécessite une technique d'analyse rapide, efficace, sensible, reproductible et ne détruisant pas les composés étudiés. La grande majorité des travaux relatifs à ces produits et publiés à ce jour⁴⁻³¹ portent sur l'utilisation de supports échangeurs d'ions ou de supports greffés.

Nous avons cherché à simplifier les méthodes d'analyse existant jusque là. Huber *et al.*³¹ a déjà développé l'emploi de systèmes ternaires comme phases mobiles. Nous avons déjà montré que l'eau³², constituant de la phase mobile, a un rôle très important, d'une part en modifiant l'activité de l'adsorbant et d'autre part, en améliorant la sélectivité du système chromatographique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Chromatographie sur couches minces

La séparation envisagée est en général mise au point sur couches minces avant d'être abordée en colonnes. Les couches de silice utilisées Kieselgel 60 F₂₅₄, de dimensions 20 × 20 cm et de 0.25 mm d'épaisseur (diamètre de pores 60 Å) sont commercialisées par Merck (Darmstadt, R.F.A.). Elles contiennent un révélateur UV (254 nm) incorporé dans la couche de silice.

Les plaques sont utilisées telles qu'elles sans activation préalable. Les développements sont réalisés dans une cuve Vario K.S. selon Geiss et Schlitt (Camag 4132; Muttenez, Suisse). Elle permet de tester cinq phases mobiles simultanément lors de la recherche du système³³. Dans tous les cas, un temps de présaturation de 30 min avec la phase mobile est observé pour éviter tout phénomène de démixion^{34,35}. Le développement est ensuite réalisé en absence de vapeurs de solvant par introduction d'une tôle sandwich entre la cuve de présaturation et la couche de silice.

Le volume des dépôts est de 2 µl environ pour les solutés en solution à 2% dans le méthanol pour les phénothiazines, benzodiazépines et stéroïdes, dans l'eau pour les pyrimidines et purines.

La révélation est faite sous lampe UV (254 ou 336 nm) ou aux vapeurs d'iode; dans ce cas, la plaque de silice développée et séchée est placée dans une enceinte close contenant des cristaux d'iode. La détection peut être améliorée en vaporisant ensuite de l'eau sur la couche pour améliorer le contraste entre les spots et le fond.

Chromatographie en colonnes

Les chromatographes en phase liquide utilisés ont été soit un appareil Varian 8500, soit un appareil Chromatem 38. La détection est réalisée avec un photomètre UV Varian ou Altex à 254 nm ou avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer. L'injection est faite par seringue (0.5 à 5 µl) à travers une tête d'injection (type Varian ou Chromatem) soit à la pression atmosphérique (technique du "stop-flow"), soit à la pression de fonctionnement de la colonne (à travers septum).

Les colonnes chromatographiques sont des tubes d'acier inoxydable de 1/4 de

pouce (4.6 mm de diamètre interne), de longueur variable suivant les analyses (10 à 20 cm). Elles sont terminées par un fritté en acier inoxydable de porosité $2 \mu\text{m}$. Une pastille de polyéthylène poreux de 1 mm d'épaisseur est placée sur le support en tête de colonne. Toutes les expériences ont été menées à température ambiante et selon un mode d'élution isocratique. Les supports de remplissage sont des particules de silices entièrement poreuses de fine granulométrie, de forme irrégulière: Lichrosorb SI 60 ($5 \mu\text{m}$) (Merck) ou Partisil 5 (Whatman-Reeve Angel, S.A.R.L. Ferrières, France). Les colonnes sont remplies par voie humide, la bouillie de remplissage étant faite dans le tétrachlorure de carbone. Les détails de cette technique ont été précisés dans une précédente publication³⁶.

TABLEAU I
PHÉNOTHIAZINES

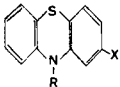
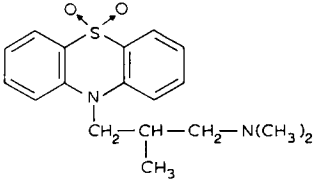
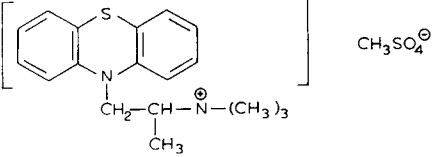
		Dénomination commune	Nom de marque
Substituant R	Substituant X		
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Cl	Chlorpromazine	Largactil
$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	H	Alimémazine	Théralène
$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3 \text{ (lévogyre)}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	OCH ₃	Lévomépromazine	Nozinan
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}-\text{CH}_3$	Cl	Prochlorpérazine	Témentil
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$	CF ₃	Fluphénazine	Moditen
$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	H	Prométhazine	Phénergan
		Oxoméazine	Doxergan
	CH ₃ SO ₄ [⊖]	Thiazinamium méthyl sulfate	Multergan

TABLEAU II
BENZODIAZÉPINES

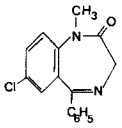
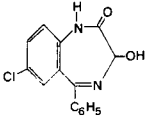
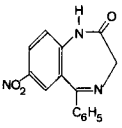
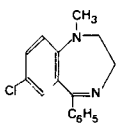
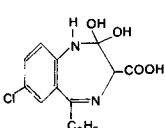
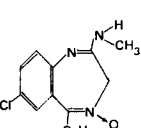
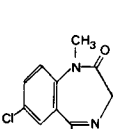
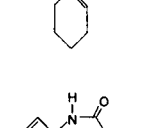
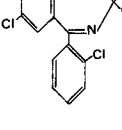
<i>Formule</i>	<i>Dénomination commune</i>	<i>Nom de marque</i>
	Diazepam	Valium
	Oxazepam	Séresta
	Nitrazepam	Mogadon
	Médazepam	Nobrium
	Chlorazepate	Tranxène
	Chlordiazepoxide	Librium
	Tétrazepam	Myolastan
	Lorazepam	Témesta
	Clobazam	

TABLEAU III
BARBITURIQUES

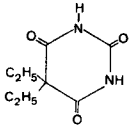
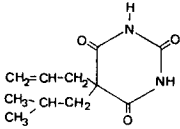
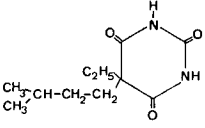
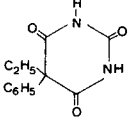
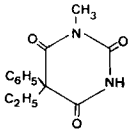
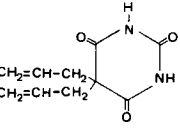
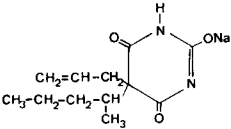
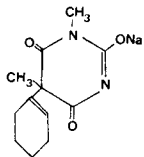
Formule	Nom	Formule	Nom
	Barbital		Tétralobarbital
	Amobarbital		Phénobarbital
	Prominal (mephobarbital)		Allobarbital
	Secobarbital		Hexobarbital

TABLEAU IV
PYRIMIDINES

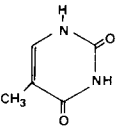
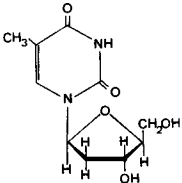
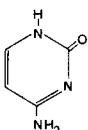
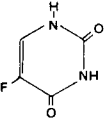
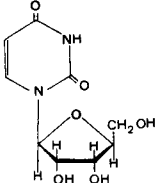
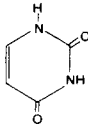
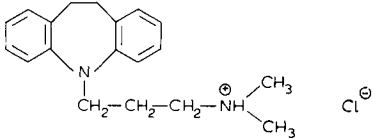
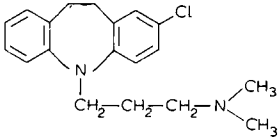
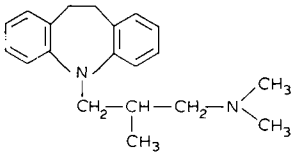
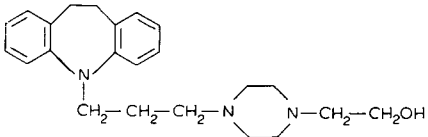
Formule	Nom	Formule	Nom
	Thymine		Thymidine
	Cytosine		
	5-Fluorouracile		Uridine
	Uracile		

TABLEAU V
5-H DIBENZAÉPINES

Formule	Dénomination commune	Nom de marque
	Imipramine	Tofranil
	Chlorimipramine	Anafranil
	Triméprimine	Surmontil
	Opipramol	Insidon

Solvants et préparation des phases mobiles

Les solvants utilisés sont des produits de qualité "zur Analyse" (Merck): dichlorométhane (réf. 6050), isoctane (réf. 4727), isopropanol (réf. 9634). Ils sont utilisés sans purification ultérieure. Les phases mobiles saturées en eau sont préparées de la façon suivante: le mélange dichlorométhane-isopropanol est ajusté à la composition voulue puis un certain volume d'eau est additionné dans une ampoule à décanter. Pour plus de commodité de cet ajustement nous avons normalisé l'apport d'eau en ajoutant un volume moitié de celui de la phase organique initiale (mélange dichlorométhane-isopropanol). Après agitation soutenue, la phase organique est prélevée et utilisée comme phase mobile.

Pour les dibenzazépines, l'eau est remplacée par une solution ammoniacale (10 ml d'ammoniaque à 28% en NH_3 pour 250 ml d'eau) puis la phase organique est prélevée comme précédemment.

Dans chaque exemple de chromatogramme, la composition dichlorométhane-isopropanol (v/v) indiquée dans la légende est celle de la phase organique initiale avant saturation par l'eau.

Solutés

Les solutés étudiés appartiennent à différentes familles suivant leur activité

pharmacologique: deux familles de produits psychotropes comme les phénothiazines et les benzodiazépines, puis les dibenzazépines, les barbituriques, les bases pyrimidiques et les stéroïdes. Leurs structures chimiques, dénominations communes et noms de marque sont résumés dans les Tableaux I-V.

Les produits sont disponibles soit sous forme de composés purs, soit sous forme de produits actifs entrant dans la composition de médicaments. Dans ce dernier cas, ils sont extraits, après broyage, dans le dichlorométhane ou le méthanol suivant leur solubilité.

Le valium utilisé en couches minces (Fig. 3) provient d'une ampoule injectable de 10 mg de valium et 31,4 mg d'alcool benzylique (cet alcool laisse une traînée sur le chromatogramme).

RÉSULTATS

Chromatographie sur couches minces

La recherche de la phase mobile la mieux adaptée à un système donné de solutés est en général menée sur couches minces puis ajustée en colonne si nécessaire. D'une manière générale, la polarité du solvant doit être diminuée en passant des couches minces en colonnes^{37,38}.

Les Figs. 1-5 montrent les résultats obtenus en CCM pour les stéroïdes,

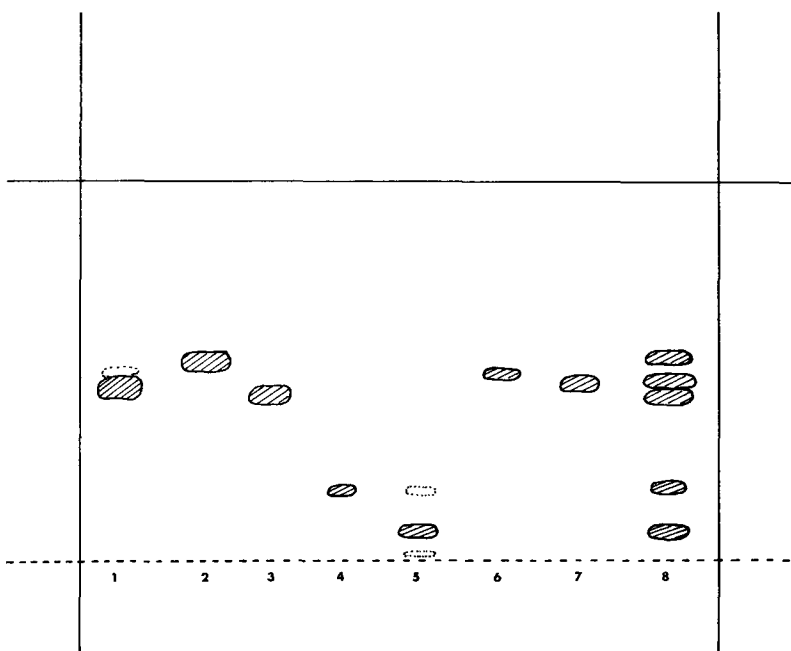


Fig. 1. Chromatographie sur couches minces de stéroïdes. Adsorbant, couche Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,25 mm d'épaisseur (Merck); développement, cuve Vario K.S.; solvant de développement; isooc-tane-dichlorométhane-isopropanol-eau (60:20:20:0,25). Solutés: 1 = Δ -Progesterone, 2 = acétate de testostérone, 3 = *cis*-testostérone, 4 = méthyl prednisolone, 5 = méthyl prednisolone hémisuc-cinate de sodium, 6 = dydrogesterone, 7 = noréthandrolone.

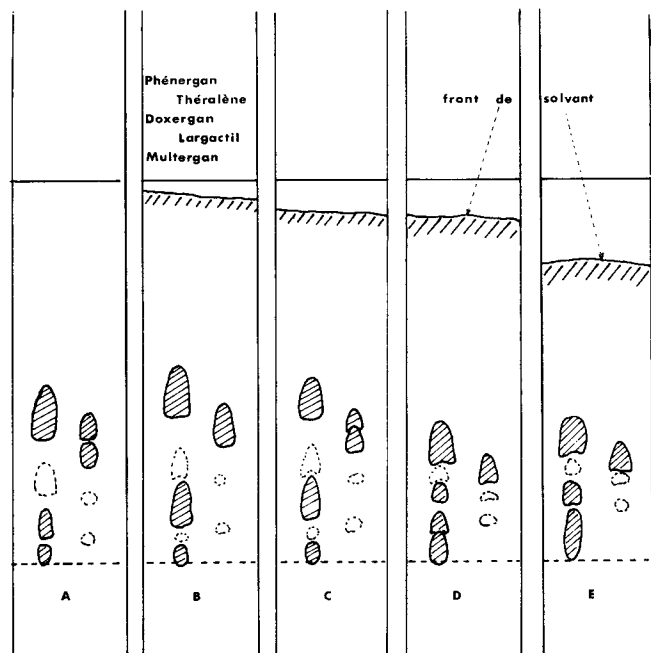


Fig. 2. Chromatographie sur couches minces de phénothiazines. Adsorbant, couche Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.25 mm d'épaisseur; développement, cuve Vario K.S. Solvants de développement: A, dichlorométhane-isopropanol-eau (60:25:15); B, dichlorométhane-isopropanol-eau (60:30:10); C, dichlorométhane-isopropanol-eau (60:35:5); D, dichlorométhane-isopropanol-eau (50:45:5); E, dichlorométhane-isopropanol-eau (40:50:10).

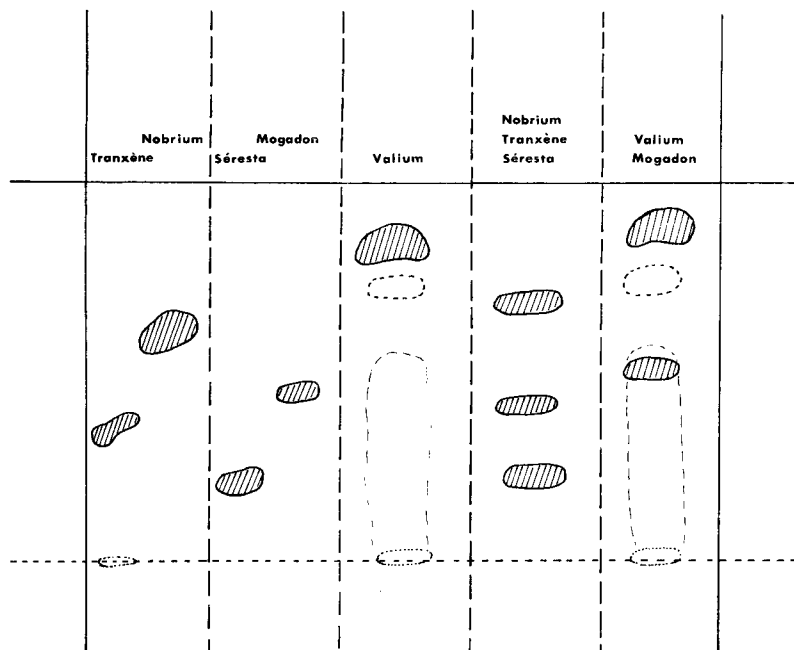


Fig. 3. Chromatographie sur couches minces de benzodiazépines. Adsorbant, couche commerciale Kieselgel 60 F₂₅₄, épaisseur 0.25 mm; développement, cuve Vario K.S.; solvant de développement, dichlorométhane-isopropanol (95:5) saturé en eau. Solutés: Valium, Nobrium, Megadon, Tranxène, Séresta.

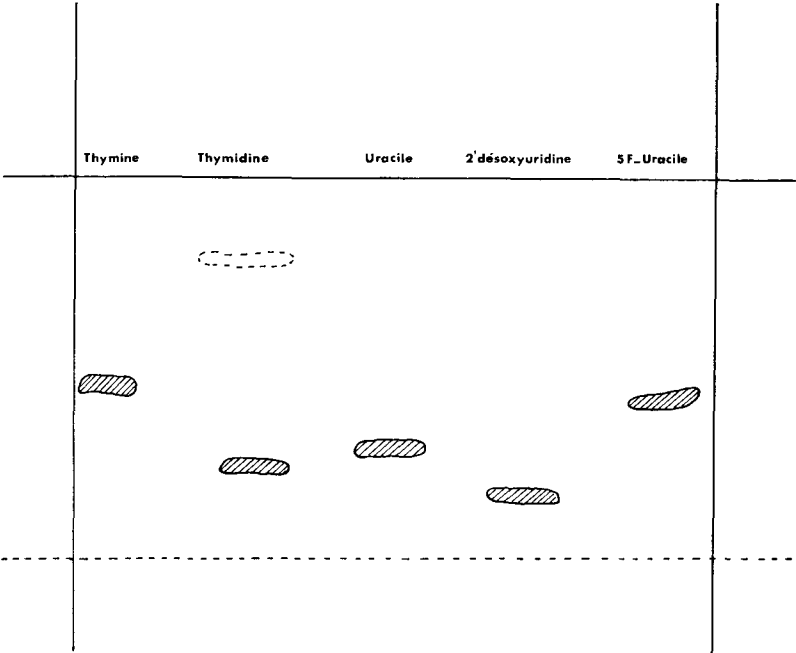


Fig. 4. Chromatographie sur couches minces de pyrimidines. Adsorbant, couche Kieselgel 60 F₂₅₄ épaisseur 0.25 mm; développement, cuve Vario K.S.; solvant de développement, dichlorométhane-isopropanol (75:25) saturé en eau. Solutés: thymine, thymidine, uracile, 2'-désoxyuridine, 5-fluoro-uracile.

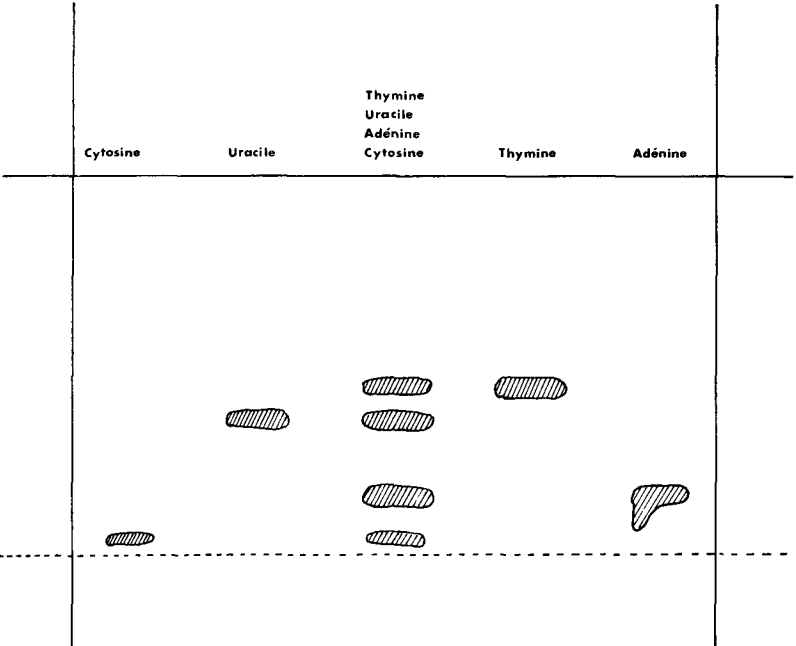


Fig. 5. Chromatographie sur couches minces de pyrimidines et purines. Adsorbant, couche Kieselgel 60 F₂₅₄, épaisseur 0.25 mm; développement, cuve Vario K.S.; solvant de développement, dichlorométhane-isopropanol (60:40) saturé en eau. Solutés: thymine, uracile, adénine, cytosine.

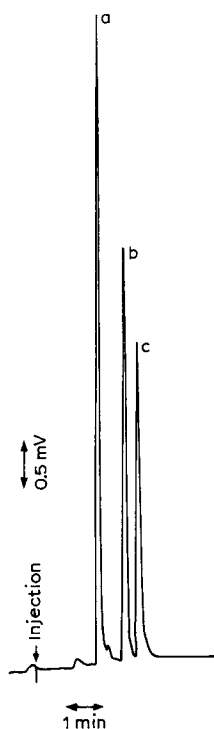


Fig. 6. Séparation de stéroïdes. Colonne de Lichrosorb SI 60 ($5\ \mu\text{m}$), longueur $15\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$ (diamètre interne); élution isocratique; température ambiante. Phase mobile, isooctane (80)-dichlorométhane (10)-isopropanol (10) + 0.25% eau. $\Delta P = 120$ bars; enregistrement, 10 mm/min; détection, UV (236 nm); vitesse linéaire, 0.21 cm/sec. a = acétate de testostérone, b = Δ -progestérone, c = *cis*-testostérone.

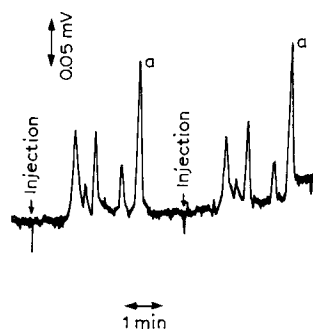


Fig. 7. Chromatogramme obtenu pour une injection de 10 ng de *cis*-testostérone (a). Conditions identiques à la Fig. 6. Sensibilité, 1 mV pleine échelle.

phénothiazines, benzodiazépines et pyrimidines, respectivement. Certaines séparations comme celle des benzodiazépines ont déjà été effectuées sur couches minces mais l'utilisation en colonnes de ces solvants absorbant fortement en UV [acétone-méthanol-ammoniaque (50:50:1) ou benzène-éther de pétrole-acétone-ammoniaque (35:35:35:1)]^{39,40} est peu compatible avec la détection UV des produits. Une étude chromatographique des phénothiazines a été publiée récemment⁴¹.

Chromatographie en colonnes

Les stéroïdes. De nombreuses études ont déjà été menées sur ces composés. Dans la majorité des cas, la technique utilisée était la chromatographie de partage⁵⁻¹⁸. La Fig. 6 montre la séparation d'un mélange synthétique d'acétate de testostérone, Δ -progestérone et *cis*-testostérone. Cette séparation est très satisfaisante sur silice avec notre système chromatographique. Des tests de sensibilité ont été réalisés pour la *cis*-testostérone à 238 nm. Une bonne reproductibilité est obtenue pour des quantités injectées de 10 ng.

Phénothiazines, benzodiazépines et dibenzazépines. Des mélanges synthétiques de

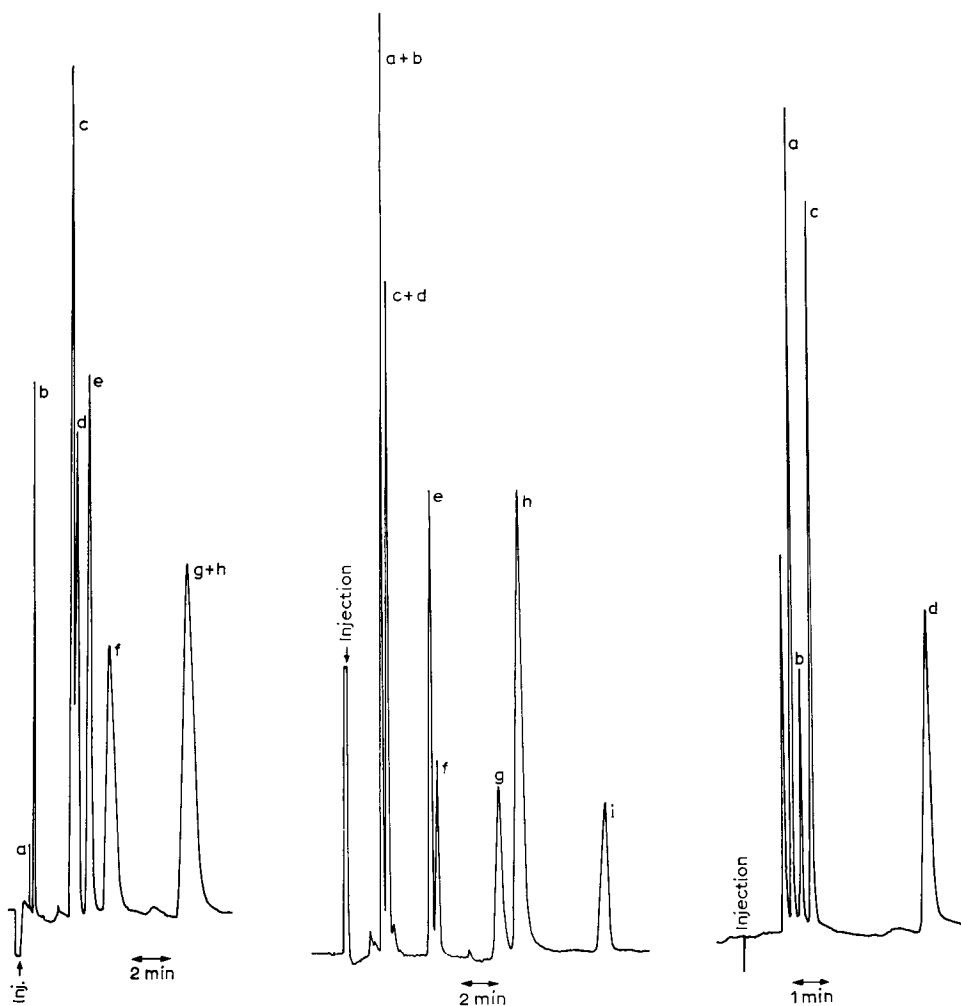


Fig. 8. Séparation de phénothiazines. Colonne de Lichrosorb SI 60 ($5\ \mu\text{m}$), $20\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$ (diamètre interne). Elution isocratique et température ambiante. Phase mobile, dichlorométhane-isopropanol (92:8) saturé en eau. $\Delta P = 260$ bars. Détection, UV (254 nm). Sensibilité, 0.32. Vitesse linéaire, 0.66 cm/sec. Enregistrement 0.5 cm/min. a, b = Théralène, c = Phénergan, d = Nozinan, e = Largactil, f = Doxergan, g = Témencil, h = Moditen.

Fig. 9. Séparation de benzodiazépines. Colonne de Lichrosorb SI 60 ($5\ \mu\text{m}$), $20\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$ (diamètre interne). Elution isocratique et température ambiante. Phase mobile, dichlorométhane-isopropanol (96:4) saturé en eau. $\Delta P = 75$ bars. Enregistrement, 0.5 cm/min. Détection, UV (254 nm). Sensibilité, 0.16. Vitesse linéaire, 0.26 cm/sec. a = Nobrium, b = Clobazam, c = Valium, d = Myolastan, e = Mogadon, f = Tranxène, g = Témesta, h = Séresta, i = Librium.

Fig. 10. Séparation de dibenzazépines. Colonne de Lichrosorb SI 60 ($5\ \mu\text{m}$), $15\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$ (diamètre interne). Elution isocratique et température ambiante. Phase mobile, dichlorométhane-isopropanol (90:10) saturé en eau + NH_3 . $\Delta P = 60$ bars. Enregistrement, 1 cm/min. Détection, UV (254 nm). Vitesse linéaire, 0.25 cm/sec. Sensibilité, 0.32. a = Surmontil, b = Anafranil, c = Tofranil, d = Insidon.

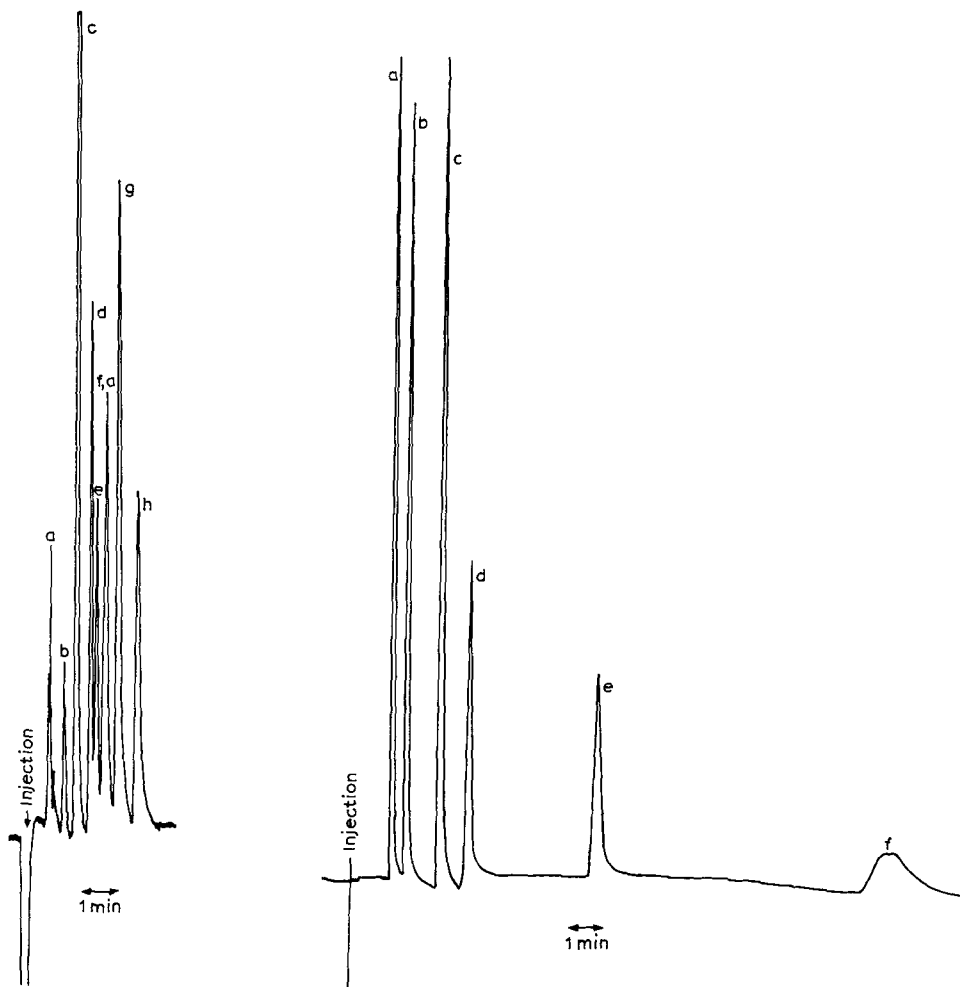


Fig. 11. Séparation de barbituriques. Colonne de Partisil ($6\ \mu\text{m}$), $15\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$ (diamètre interne). Elution isocratique et température ambiante. Phase mobile, dichlorométhane-isopropanol (97.5:2.5) saturé en eau. Enregistrement, $1\ \text{cm}/\text{min}$. Détection, UV ($254\ \text{nm}$). Sensibilité, 0.02. Vitesse linéaire, $0.62\ \text{cm}/\text{sec}$. a = Allobarbital, b = Prominal, c = Hexobarbital, d = Secobarbital, e = Tétrallobarbital, f + a = Amobarbital, g = Phénobarbital, h = Barbital.

Fig. 12. Séparation de pyrimidines. Colonne de Lichrosorb SI 60 ($5\ \mu\text{m}$), $15\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$ (diamètre interne). Elution isocratique et température ambiante. Phase mobile, dichlorométhane-isopropanol (75:25) saturé en eau. $\Delta P = 170\ \text{bars}$. Enregistrement, $5\ \text{mm}/\text{min}$. Détection, UV ($254\ \text{nm}$). Sensibilité, 0.32. Vitesse linéaire, $0.16\ \text{cm}/\text{sec}$. a = Thymine, b = 5-fluorouracile, c = uracile, d = thymidine, e = 2'-désoxyuridine, f = cytosine.

ces trois familles ont été chromatographiés sur silice (Figs. 8–10). Les phases mobiles sont composées des mêmes constituants: dichlorométhane-isopropanol-eau. Dans le cas des dibenzazépines (Fig. 10), de l'ammoniaque a été additionnée à la phase mobile pour améliorer la symétrie des pics chromatographiques (suppression de traînées).

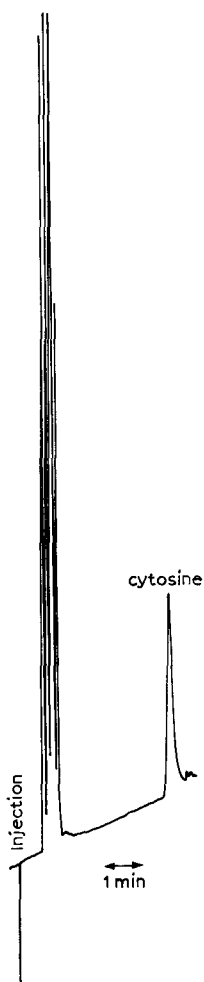


Fig. 13. Séparation de pyrimidines. Conditions identiques à la Fig. 12, sauf phase mobile, acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9). Débit, 120 ml/h. $\Delta P = 60$ bars.

Barbituriques. La séparation des barbituriques est obtenue en 3 min avec une bonne sélectivité du système chromatographique (Fig. 11). Le composé a qui est l'allobarbital donne deux pics dont l'un est élué avec le pic de solvant et le deuxième avec le pic de l'amobarbital.

Pyrimidines. Jusqu'à ce jour, ce type de composés a été étudié principalement en chromatographie d'échange d'ions²⁷⁻³⁰. Sur papier, une méthode de chromatographie bi-dimensionnelle de purines et d'acide urique a été récemment décrite⁴². Une bonne sélectivité est obtenue en utilisant le mélange dichlorométhane-isopropanol (75:25) saturé en eau comme phase mobile (Fig. 12). Cependant, la cytosine possède toujours une rétention importante, en raison de la présence du groupement $-NH_2$. Un autre type de phase mobile a été testé pour les pyrimidines; sa composition est la suivante: acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9). La sélectivité de ce solvant

s'avère moins bonne pour les premiers solutés mais il permet d'éluer la cytosine plus rapidement hors de la colonne (Fig. 13).

DISCUSSION

Tous les systèmes de phases mobiles proposés pour ces différentes analyses sont à la base de dichlorométhane, d'isopropanol et d'eau. Les solutés testés sont en majorité des composés très polaires puisqu'ils renferment le plus souvent des groupements aminés ou hydroxylés. Ce type de soluté n'est en général pas chromatographié sur silice car les adsorptions sont beaucoup trop importantes entre les sites -OH actifs de la silice et les groupements fonctionnels des composés chromatographiés.

Il semble donc, comme il l'a été vu dans un précédent travail³², que l'addition d'eau dans le système chromatographique diminue (voire élimine) la force de certaines interactions adsorbant-soluté. Les sites silanols les plus actifs peuvent être "neutralisés" et les adsorptions des solutés comportant des groupements polaires ne sont plus aussi importantes.

Ce type de phase mobile présente également une bonne sélectivité car des composés possédant de très faibles différences de structure peuvent être séparés. La mise au point de tels systèmes nous apparaît très avantageuse dans la mesure où les efficacités des supports sont en général supérieures à celles obtenues en chromatographie de partage ou d'échanges d'ions. Ces systèmes peuvent préalablement être testés en chromatographie sur couches minces ce qui permet le plus souvent un gain de temps appréciable.

RÉSUMÉ

L'utilisation de systèmes ternaires à base de solvant polaire, d'un solvant peu polaire et d'eau, comme phases mobiles associées à des colonnes chromatographiques de grandes efficacités s'avère particulièrement intéressante pour l'analyse de produits biologiques et pharmaceutiques. La présence de l'eau diminue les adsorptions trop fortes entre adsorbants et solutés et permet d'obtenir de bonnes sélectivités.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. F. Michaelis, D. W. Cornish et R. Vivilecchia, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 1399.
- 2 J. S. Wragg, *Pharm. J.*, (1974) 264.
- 3 R. E. Huettemann, M. L. Cotter, C. J. Shaw, C. A. Janicki, H. R. Almond, E. S. Moyer, A. P. Shroff et F. Vestano, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 233.
- 4 R. A. Henry, J. A. Schmit et J. E. Dieckman, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 513.
- 5 F. A. Fitzpatrick, S. Siggia et J. Dingman, Sr., *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1223.
- 6 J. B. Smith, J. A. Mollica, H. K. Govan and I. M. Nunes, *Amer. Lab.*, 4 (1972) 13.
- 7 R. J. Dolphin, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 421.
- 8 J. F. K. Huber, J. A. R. J. Hulsman et C. A. M. Meijers, *J. Chromatogr.*, 62 (1971) 79.
- 9 N. A. Parris, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 753.
- 10 F. Bailey et P. N. Brittain, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 431.
- 11 S. Siggia et R. A. Dishman, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1223.
- 12 B. L. Karger et L. V. Berry, *Clin. Chem.*, 17 (1971) 757.
- 13 J. C. Touchstone et W. Wortmann, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 244.
- 14 W. Wortmann, C. Schnabel, J. C. Touchstone, *J. Chromatogr.*, 84 (1973) 396.

- 15 F. A. Fitzpatrick et S. Siggia, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 2310.
- 16 A. G. Butterfield, B. A. Lodge et N. J. Pound, *J. Chromatogr. Sci.*, 11 (1973) 401.
- 17 G. Cavina, G. Moretti et A. Cantafora, *J. Chromatogr.*, 80 (1973) 89.
- 18 S. L. Sarkar, K. V. Jogi et A. Mohimen, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 206.
- 19 M. W. Anders, J. P. Latorre, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1430.
- 20 R. W. Roos, *J. Pharm. Sci.*, 61 (1972) 12.
- 21 J. E. Evans, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 2428.
- 22 W. Düniges, G. Naundorf et N. Seiler, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 655.
- 23 D. H. Rodgers, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 743.
- 24 W. Lindner, R. W. Frei et W. Santi, *J. Chromatogr.*, 108 (1975) 299.
- 25 G. Cimbura, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 287.
- 26 C. G. Scott et P. Bommer, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 446.
- 27 J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 72.
- 28 C. Horvath et S. R. Lipsky, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 1227.
- 29 C. A. Burtis, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 183.
- 30 F. Murakami, S. Rokushika et H. Hatano, *J. Chromatogr.*, 53 (1970) 584.
- 31 J. F. K. Huber, E. T. Alderlieste, H. Harren et H. Poppe, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1337.
- 32 C. Gonnet et J. L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 109 (1975) 297.
- 33 F. Geiss et H. Schlitt, *Chromatographia*, 1 (1968) 392.
- 34 M. Viricel, *Thèse*, Université de Lyon I, Lyon, Juillet 1975.
- 35 F. Geiss, *Die Parameter der Dünnschicht-Chromatographie*, Vieweg, Braunschweig, pp. 191, 205.
- 36 B. Coq, C. Gonnet et J. L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 37 J. P. Nicolas, *Thèse*, Université de Lyon I, Lyon, 1974.
- 38 B. Coq, J. P. Nicolas, A. Lamotte et M. Porthault, *J. Chromatogr.*, 97 (1974) 137.
- 39 J. J. Thomas et L. Dryon, *J. Pharm. Belg.*, (1967) 163.
- 40 J. J. Thomas et L. Dryon, *J. Pharm. Belg.*, (1964) 481.
- 41 M. Caude, Le Xuan Phan, B. Terlain et J. P. Thomas, *J. Chromatogr. Sci.*, 13 (1975) 349.
- 42 M. Kryżanowska et W. Niemierko, *J. Chromatogr.*, 100 (1974) 95.