

CHROM. 11,207

HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON CAPSAICIN, DIHYDROCAPSAICIN, NORDIHYDROCAPSAICIN UND HOMODIHYDROCAPSAICIN IN NATÜRLICHEN CAPSAICINOID-GEMISCHEN UND FRUCTUS CAPSICI

O. STICHER, F. SOLDATI* und R. K. JOSHI

Eidgenössische Technische Hochschule, Pharmazeutisches Institut, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich (Schweiz)

(Eingegangen am 29. Mai 1978)

SUMMARY

High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures and Fructus capsici

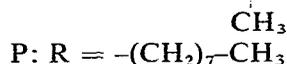
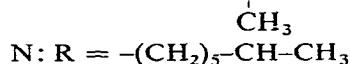
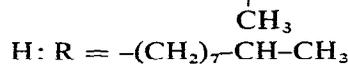
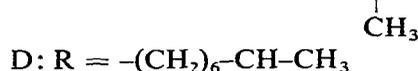
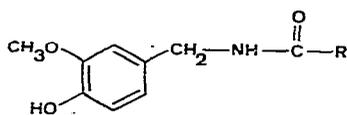
A new method for separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in Fructus capsici with high-performance liquid chromatography was elaborated.

A reversed-phase system with a μ Bondapak C₁₈ column using methanol–water (53:47) as mobile phase was developed. The substances were separated in 40 min. The detection limit for capsaicin was 100 ng at a signal-to-noise ratio of 10:1. The relative standard deviation was 0.54%. The results obtained by the high-performance liquid chromatographic method are well correlated with those obtained by gas chromatographic and thin-layer–colorimetric methods.

EINLEITUNG

Für die Bestimmung von Capsaicinoiden in Fructus capsici hat man bis heute kolorimetrische, gaschromatographische (GC) und massenspektrometrische (MS) Methoden eingesetzt^{1–3}. Diese Methoden liefern entweder Auskunft über den Gesamtgehalt an Capsaicinoiden oder sie erfassen die einzelnen Bestandteile. Müller-Stock *et al.*^{1,2} konnten Capsaicin (C), Dihydrocapsaicin (D), Homodihydrocapsaicin (H), Nordihydrocapsaicin (N) und Pelargonsäure (Nonylsäurevanillylamid) (P) gaschromatographisch trennen, wobei sie nur bestimmte Substanzen auf einer einzelnen Säule mit optimaler Auflösung trennen konnten.

* Teil einer Dissertation: F. Soldati, ETH Zürich, in Bearbeitung.



Lee *et al.*³ konnten durch GC-MS-Kopplung C, D und N bestimmen. Die Substanzen mussten aber vorher silyliert werden.

Nach den Erfolgen, die wir mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bei der Trennung von komplizierten Naturstoffgemischen hatten⁴⁻⁸, haben wir diese Methode auch für die Analyse von Capsaicinoiden eingesetzt. Die Capsaicinoide müssen nicht mehr derivatisiert werden. Es wird direkt ein Extrakt in die Säule gespritzt. Nach etwa 40 min kann der Gehalt der einzelnen Substanzen berechnet oder an einem Integrator direkt abgelesen werden. Die minimale Menge Capsaicin, die nachgewiesen werden kann beträgt 100 ng bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1. Die relative Standardabweichung bei der Gehaltsbestimmung liegt bei 0.5%.

EXPERIMENTELLER TEIL

Apparaturen

Verwendet wurden: Pumpe, Waters Model M-6000 A (Waters Assoc., Milford, Mass., U.S.A.); Injektor, Waters Model U6K; Säulen, Waters μ Bondapak C₁₈ (P/N 27324) und μ Porasil (P/N 27477), 4 mm I.D. \times 30 cm; Detektor, Perkin-Elmer LC 55 (Coleman, Maywood, Ill., U.S.A.); Schreiber, W + W Recorder Series 1100 (W + W Electronic, Basel, Schweiz), Attenuation 0.05, Papiervorschub 5 mm/min; Calculator, Hewlett-Packard Model 9830 A; Analysenwaage, Mikrowaage Mettler Typ M 5.

Reagenzien

Für die HPLC-Versuche wurden Lösungsmittel vom Reinheitsgrad p.a. verwendet. Acetonitril, Chloroform, Essigsäure, Isooctan, *n*-Hexan und Capsaicin synthetisch wurden von der Firma Merck (Darmstadt, B.R.D.) bezogen. Essigsäure-äthylester, Methanol, Methylenchlorid und Petroläther Ph. Helv. VI wurden von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Dihydrocapsaicin synthetisch wurde von Müller-Stock¹ hergestellt. Es wurde frisch destilliertes Wasser verwendet.

Untersuchungsmaterial

Natürliche Capsaicinoid-Gemische (Lot Nr. 501175/51805/553696) wurden von der Firma Fluka und Fructus capsici Ph. Helv. VI (von *Capsicum frutescens* L.) Lot Nr. 038769 von der Firma Siegfried (Zofingen, Schweiz) bezogen.

Chromatographische Bedingungen

Als mobile Phase wurde ein Gemisch von 53% Methanol und 47% Wasser verwendet. Die Analysen wurden bei Raumtemperatur bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1.5 ml/min (2500 p.s.i.) durchgeführt. Als Säule verwendete man μ Bondapak C₁₈, 4 mm I.D. \times 30 cm. Die Substanzen wurden mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 279 nm (Absorptionsmaximum der Capsaicinoide) detektiert.

Herstellung der Eichgeraden

4.33 mg Capsaicin synthetisch wurden in einen 2-ml Messkolben eingewogen und auf 2.00 ml mit Methanol ergänzt. 1.79 mg Dihydrocapsaicin synthetisch wurden in einen 1-ml Messkolben eingewogen und auf 1.00 ml mit Methanol ergänzt. Von diesen Lösungen injizierte man 1–7 μ l. Es wurden 12 Werte für Dihydrocapsaicin und 9 Werte für Capsaicin bestimmt.

Prozentuale Anteile der Homologen und Analogen des Capsaicins in natürlichen Capsaicinoid-Gemischen

9.88 mg Capsaicinoid-Gemisch von Lot Nr. 501175 wurden in einen 2-ml Messkolben eingewogen und auf 2.00 ml mit Methanol ergänzt. 24.81 mg Capsaicinoid-Gemisch von Lot Nr. 51805 wurden in einen 5-ml Messkolben eingewogen und auf 5.00 ml mit Methanol ergänzt. 10.84 mg Capsaicinoid-Gemisch von Lot Nr. 553696 wurden in einen 2-ml Messkolben eingewogen und auf 2.00 ml mit Methanol ergänzt. Von jeder Lösung wurden 2–10 μ l injiziert. Es wurden von jeder Capsaicinoid-Mischung drei Bestimmungen durchgeführt.

Gehaltsbestimmung von Fructus capsici

7.50 g Fructus capsici pulvis Ph. Helv. VI, genau gewogen, wurden mit 100 ml Methanol 2 h im Soxhlet-Apparat auf einem Wasserbad (75°) extrahiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde durch ein Faltenfilter in einen Rundkolben 500 ml filtriert, wobei man den Rundkolben und das Filter mit Methanol nachspülte. Anschliessend befreite man das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel und trocknete den Rückstand ca. 30 min unter Vakuum. Dieser Rückstand wurde mit 40 ml Essigsäure 70% quantitativ in einen Scheidetrichter überführt. Drei Mal wurde diese Lösung mit je 50 ml Petroläther (40–65°) extrahiert. Die gesamten Petrolätherauszüge wurden mit 10 ml Essigsäure 70% gewaschen. Die vereinigten Essigsäurelösungen verdünnte man mit 100 ml destilliertem Wasser und extrahierte diese Lösung 4 Mal mit je 50 ml Dichlormethan. Nach zweimaligem Waschen der Dichlormethanlösungen mit je 50 ml destilliertem Wasser wurde die organische Phase mit 1 g wasserfreiem Natriumsulfat 15 min getrocknet, anschliessend filtriert und, nachdem das Filter zweimal mit je 10 ml getrocknetem Dichlormethan nachgespült war, wurde die gesamte Dichlormethanmenge am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde in 2 ml Methanol aufgenommen und mit einer Pipette sorgfältig in einen 5-ml Messkolben transferiert. Mit Methanol wurde anschliessend auf 5.00 ml ergänzt.

Es wurden 3 Extrakte mit dieser Methode hergestellt. Von jedem Extrakt wurden 3 Bestimmungen durchgeführt. Pro Analyse wurde 4 μ l Extrakt injiziert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wahl des Trennsystems

Ein Vorschlag für die Wahl des nötigen Trennsystems kann auf Grund des Molekulargewichtes (MG) und der Löslichkeit der zu trennenden Substanzen formuliert werden. Die Capsaicinoide haben ein MG von *ca.* 300. Sie sind in niederen Alkoholen, Diäthyläther, **Benzol** und Chloroform leicht und in kaltem Wasser schwer löslich. Als Säulenmaterialien wählten wir Silikagel (μ Porasil) und mit unpolaren Gruppen oberflächenmodifiziertes Silikagel (μ Bondapak C₁₈).

Mit der μ Porasil-Säule wurden als Elutionsmittel Wasser, Methanol, Essigsäureäthylester, Chloroform, Isooctan und *n*-Hexan in 22 verschiedenen Kombina-

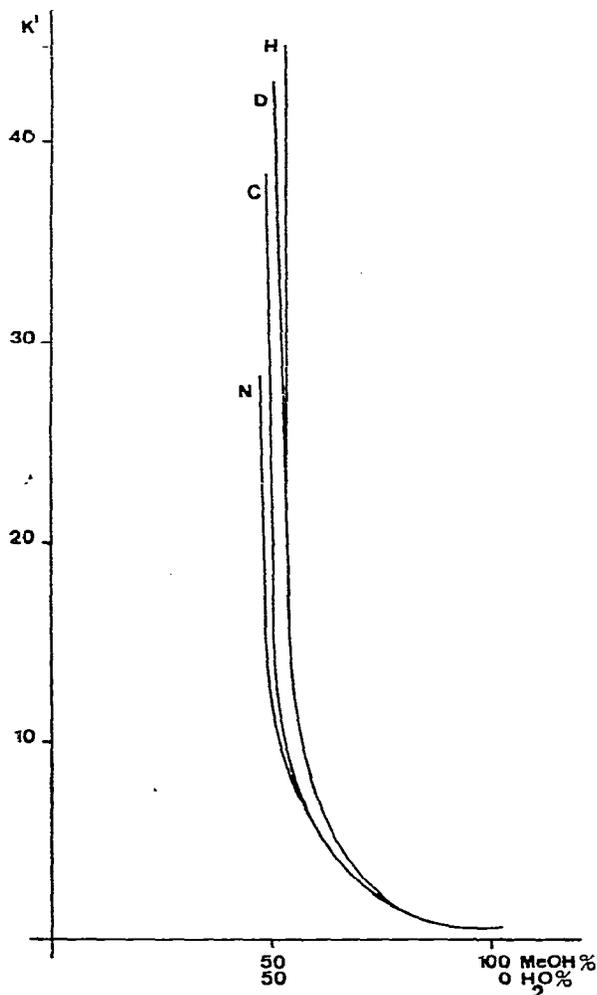


Fig. 1. Abhängigkeit des Kapazitätsverhältnisses von der prozentualen Zusammensetzung der mobilen Phase. Säule, μ Bondapak C₁₈; Durchflussgeschwindigkeit, 1.5 ml/min; C = Capsaicin, D = Dihydrocapsaicin, H = Homodihydrocapsaicin, N = Nordihydrocapsaicin.

tionen verwendet. Die daraus resultierenden Ergebnisse waren unbefriedigend, da die Capsaicinoide nicht voneinander getrennt werden konnten.

Mit der Reversed-Phase-Säule μ Bondapak C_{18} wurden Wasser, Methanol und Acetonitril als Elutionsmittel in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen verwendet. Wie Fig. 1 zeigt, nehmen die Retentionszeiten der Capsaicinoide und damit ihre Kapazitätsverhältnisse mit der Zunahme des prozentualen Anteiles an Wasser im Elutionsmittel in exponentieller Funktion zu.

TABELLE I

RETENTIONSZEIT t_R , KAPAZITÄTSVERHÄLTNIS k' , RELATIVE RETENTION α , AUFLÖSUNG R DER CAPSAICINOIDE

Elutionsmittel, Methanol-Wasser (53:47); Durchflusgeschwindigkeit, 1.5 ml/min; t_0 , 85 sec.

Capsaicinoid	t_R (min:sec)	k'	α	R
Nordihydrocapsaicin (N)	17:35	11.41	1.11	0.96
Capsaicin (C)	19:20	12.65	1.66	3.74
Dihydrocapsaicin (D)	31:10	21.0	1.22	1.02
Homodihydrocapsaicin (H)	35:25	25.56		

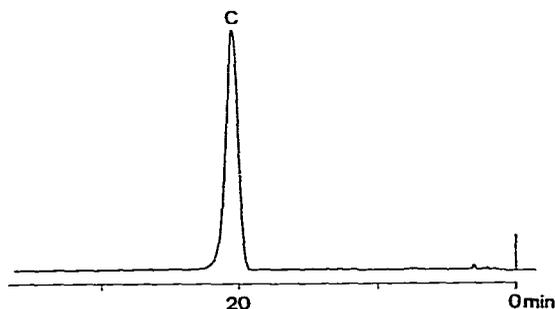


Fig. 2. HPLC-Chromatogramm von synthetischem Capsaicin. Analysenbedingungen vgl. Tabelle I.

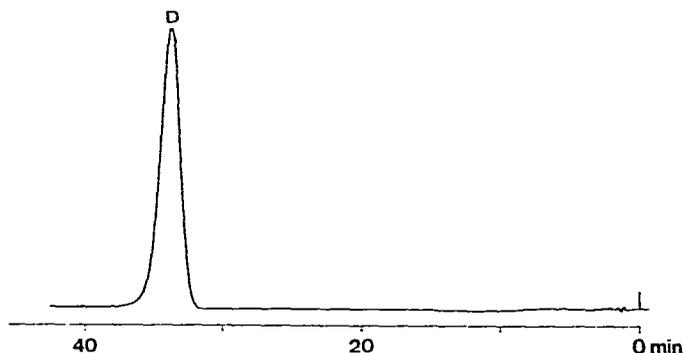


Fig. 3. HPLC-Chromatogramm von synthetischem Dihydrocapsaicin. Analysenbedingungen vgl. Tabelle I.

TABELLE II

PROZENTUALER ANTEIL AN HOMOLOGEN UND ANALOGEN DES CAPSAICINS IN NATÜRLICHEN CAPSAICINOID-GEMISCHEN —
VERGLEICH VON HPLC-MIT GC-RESULTATEN

Die Werte mit dem Gas-Chromatograph stammen aus der Lit. 1. GCa: direkt bestimmt auf SE 30-2% (Chromosorb G); GCb: bestimmt als TMS-Derivat auf JXR 1 oder 3% (Gas-Chrom Q).

	Capsaicin			Dihydrocapsaicin			Nordihydrocapsaicin			Homodihydrocapsaicin			Pelargonsäure		
	HPLC	GCa	GCb	HPLC	GCa	GCb	HPLC	GCa	GCb	HPLC	GCa	GCb	HPLC	GCa	GCb
Capsaicin natürlich, Fluka, Lot Nr. 501175	41.7	43.0	46.3	43.7	48.7	39.6	10.1	8.3	11.8	4.5	—	—	—	—	2.3
Capsaicin natürlich, Fluka, Lot Nr. 51805	82.1	82.3	77.1	14.6	16.7	20.5	3.3	1.0	2.4	—	—	—	—	—	—
Capsaicin natürlich, Fluka, Lot Nr. 553696	45.0	45.0	49.4	46.3	49.5	39.9	8.2	5.5	9.2	0.5	—	—	—	—	1.5

Mit dem Elutionsmittel Methanol-Wasser (53:47) konnten C, D, H und N voneinander getrennt werden (Tabelle I). Die Trennung wurde bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1.5 ml/min durchgeführt. Als Detektor wurde ein UV-Spektrophotometer mit variabler Wellenlänge bei 279 nm (Absorptionsmaximum der Capsaicinoide) verwendet.

Die Fig. 2 und 3 zeigen Chromatogramme von synthetischem Capsaicin bzw. Dihydrocapsaicin.

Fig. 4 zeigt die Trennung eines natürlichen Capsaicinoid-Gemisches. Die Auflösung der Peaks ist mit der HPLC viel besser als mit der GC^{1,2}. Einzig Pelargonsäure konnte nicht von Capsaicin abgetrennt werden, was aber kaum von Bedeutung ist. Aus den GC-Untersuchungen von Müller-Stock¹ geht hervor, dass Pelargonsäure entweder nicht oder nur in sehr kleinen Mengen in der Droge vorkommt (vgl. auch Tabelle II).

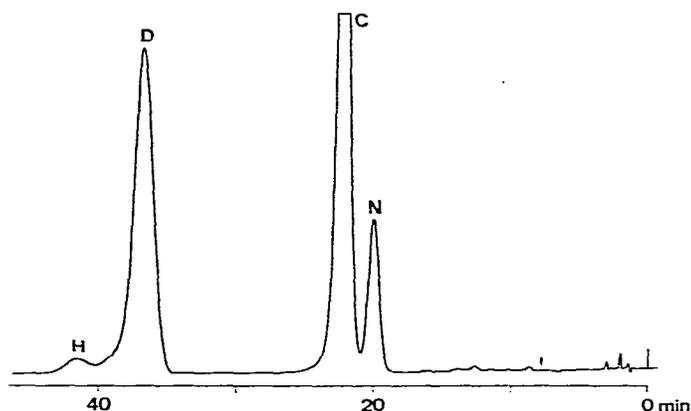


Fig. 4. HPLC-Chromatogramm eines natürlichen Capsaicinoid-Gemisches. Analysenbedingungen vgl. Tabelle I.

Eichgeraden

Von synthetischem Capsaicin und synthetischem Dihydrocapsaicin wurden Eichkurven aufgestellt, um die Linearität des Trennsystems zu überprüfen (Fig. 5). Die Regressionsgerade für Capsaicin beträgt $y = 123.095 \cdot x - 28.333$, der Korrelationskoeffizient 0.9928 ($N = 9$). Für Dihydrocapsaicin beträgt $y = 88.084 \cdot x + 43.186$, der Korrelationskoeffizient 0.9967 ($N = 12$). y stellt die Peakfläche in mm^2 (Höhe mal Breite bei halber Höhe) und x die injizierte Menge Substanz in μg dar.

Prozentuale Anteile der Homologen und Analogen des Capsaicins in natürlichen Capsaicinoid-Gemischen

In der Tabelle II sind die prozentualen Anteile der Homologen und Analogen des Capsaicins verschiedener natürlicher Capsaicinoid-Gemische zusammengestellt. In dieser Tabelle ist jeder angegebene HPLC-Wert Durchschnitt von 3 bis 4 Bestimmungen. Die GC-Werte stammen aus der Dissertation von Müller-Stock¹. Die HPLC-Resultate sind gut korrelierbar mit denjenigen der GC. Für die Berechnung wurde die Summe der entsprechenden Peakflächen als 100% unter Berücksichtigung der spezifischen Peakfläche von C, D, H und N angenommen.

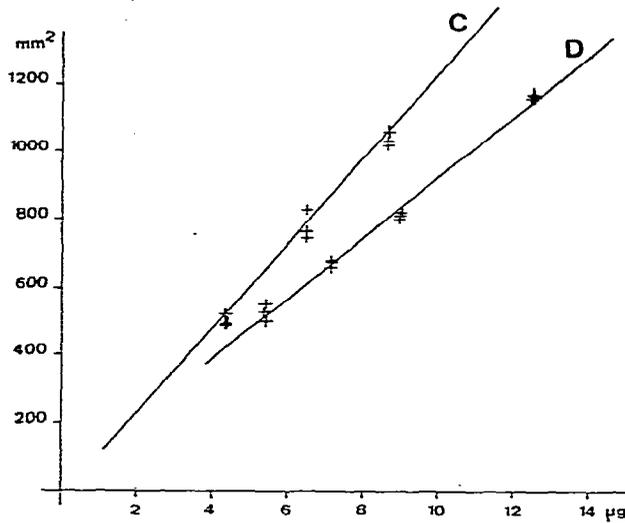


Fig. 5. Eichkurven von synthetischem Capsaicin und Dihydrocapsaicin.

Gehaltsbestimmung von *Fructus capsici*

Zur Überprüfung der HPLC-Methode wurden Extrakte von *Fructus capsici* quantitativ bestimmt. Zur Extraktion wurde die Methode von Müller-Stock¹ verwendet.

Die Fig. 6 zeigt die Trennung der Capsaicinoide eines Extraktes von *Fructus capsici*.

Durch Einspritzen einer Mischung von natürlichem Capsaicinoid-Gemisch, synthetischem Capsaicin, synthetischem Dihydrocapsaicin und Pflanzenextrakt ergaben sich keine Veränderung der Peakcharakteristiken (Retentionszeit, Symmetrie) gegenüber den Peaks in Referenz- und Extraktchromatogrammen.

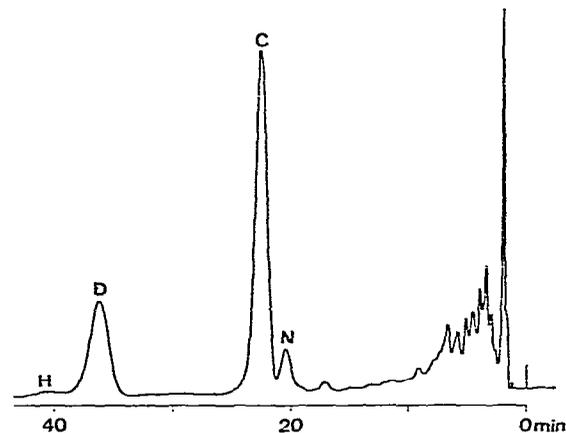


Fig. 6. HPLC-Chromatogramm eines Extraktes von *Fructus capsici* Ph. Helv. VI. Analysenbedingungen vgl. Tabelle I.

Eine Identifizierung der einzelnen Capsaicinoide durch Aufnahme der UV-Spektren während der Elution ist nicht möglich, weil alle identische UV-Spektren aufweisen¹.

Gehaltsbestimmung mit Reinstoffen als Referenz. Die Resultate der quantitativen Bestimmungen sind in der Tabelle III angegeben. Es wurden 3 Extrakte von derselben Droge hergestellt. Jeder Extrakt wurde drei Mal quantitativ bestimmt. Nach den Eichgeraden beträgt der Durchschnittsgehalt an Capsaicin 0.161 % ($S_{rel.} = 0.54\%$) und an Dihydrocapsaicin 0.081 % ($S_{rel.} = 2.22\%$).

Gehaltsbestimmung mit Capsaicinoid-Gemisch als Referenz. Falls zur Bestimmung der Capsaicinoide keine Reinstoffe zur Verfügung stehen, können diese mit HPLC unter Verwendung von semipräparativen Säulen aus einem natürlichen Capsaicinoid-Gemisch isoliert oder durch Synthese hergestellt werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit als Referenzsubstanz ein natürliches Capsaicinoid-Gemisch zu verwenden, wie aus unseren Versuchen hervorgeht.

Aus Reihenuntersuchungen mit natürlichen Capsaicinoid-Gemischen, synthetischem Capsaicin und synthetischem Dihydrocapsaicin geht hervor, dass C und N eine spezifische Peakfläche von $118.23 \text{ mm}^2/\mu\text{g}$ und D und H eine solche von $93.79 \text{ mm}^2/\mu\text{g}$ haben. Das Verhältnis dieser Peakflächen beträgt 1.260. Wird eine bestimmte Menge eines natürlichen Capsaicinoid-Gemisches eingespritzt, kann nach Messung und Summierung der Peakflächen aus der erhaltenen Gesamtpeakfläche unter Berücksichtigung der eingespritzten Menge Capsaicinoid-Gemisch der Gehalt von C, D, H und N bestimmt werden.

Als Beispiel wird die Bestimmung des Gehaltes an Dihydrocapsaicin angeführt:

$$\text{Gehalt D} = \frac{M \cdot FP_D \cdot 1.260}{FP_C + FP_D \cdot 1.260 + FP_H \cdot 1.260 + FP_N}$$

wobei M = Gespritzte Menge Capsaicinoid-Gemisch (μg), FP_C = Peakfläche von Capsaicin (mm^2), FP_D = Peakfläche von Dihydrocapsaicin (mm^2), FP_H = Peakfläche von Homodihydrocapsaicin (mm^2), FP_N = Peakfläche von Nordihydrocapsaicin (mm^2).

In entsprechender Weise können die Gehalte von C, H und N berechnet werden. Das Verhältnis der spezifischen Peakflächen von C und D (1.260) kann verwendet werden, wenn die analytischen Bedingungen (Säule, Elutionsmittel, Durchflusgeschwindigkeit) eingehalten werden.

Zur Überprüfung der Methode wurde der Gehalt an C, D, H und N in *Fructus capsici* auf diese Art bestimmt (Tabelle III). So beträgt der Durchschnittsgehalt an Capsaicin 0.164 % ($S_{rel.} = 0.56\%$) und an Dihydrocapsaicin 0.084 % ($S_{rel.} = 2.28\%$). Diese Werte sind fast identisch mit denjenigen, die man aus der Eichgerade erhält. Der Durchschnittsgehalt an Nordihydrocapsaicin beträgt 0.020 % ($S_{rel.} = 3.29\%$) und an Homodihydrocapsaicin 0.003 % ($S_{rel.} = 37\%$). Der Durchschnittsgehalt an Capsaicinoiden beträgt 0.272 % ($S_{rel.} = 0.71\%$).

Gehaltsbestimmung mit einer kolorimetrischen Methode. Der Gehalt an Capsaicinoiden in *Fructus capsici* wurde zusätzlich auch mit einer DC-kolorimetrischen Methode nach einer Vorschrift der Firma Merck⁹ bestimmt. Es wurden drei Extrakte von derselben Droge hergestellt. Jeder Extrakt wurde ein bis zwei Mal quantitativ

TABELLE III
 HPLC-GEHALTSBESTIMMUNG VON FRUCTUS CAPSICI PH. HELV. VI
 Firma Siegfried, Lot Nr. 038769.

Extrakt Nr.	Prozent. Gehalt (nach Eichgeräten berechnet)			Prozent. Gehalt (nach spezifischer Peakfläche berechnet)			Prozent. Anteil (100% = Capsaicinoide)			
	C	D	H	C	D	H	C	D	H	
1	0.162	0.079	0.082	0.165	0.082	0.021	0.272	30.1	7.7	1.5
1	0.162	0.082	0.085	0.164	0.085	0.020	0.274	59.8	31.0	1.8
1	0.160	0.080	0.083	0.163	0.083	0.020	0.271	60.1	30.6	1.8
2	0.161	0.079	0.081	0.163	0.081	0.021	0.268	60.8	30.2	1.1
2	0.162	0.082	0.085	0.164	0.085	0.020	0.272	60.3	31.2	1.1
2	0.160	0.081	0.084	0.163	0.084	0.020	0.270	60.4	31.1	1.1
3	0.162	0.083	0.086	0.165	0.086	0.019	0.272	60.7	31.6	0.7
3	0.162	0.084	0.087	0.165	0.087	0.020	0.274	60.2	31.7	0.7
3	0.162	0.083	0.085	0.165	0.085	0.021	0.273	60.4	31.1	0.7

TABELLE IV

GEHALTSBESTIMMUNG DER CAPSAICINOIDE VON FRUCTUS CAPSICI PH. HELV. VI
MIT EINER DC-KOLORIMETRISCHEN METHODE

FIRMA Siegfried, Lot Nr. 038769.

Extrakt Nr.	Capsaicinoide (%)
1	0.255
1	0.269
2	0.263
2	0.237
3	0.279

bestimmt (Tabelle IV). Der Durchschnittsgehalt an Capsaicinoiden beträgt mit dieser Methode 0.261 % ($S_{rel.} = 6.1\%$). Dieser Wert bestätigt nochmals die Werte, die man mit der HPLC erhält.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine neue Methode zur Trennung und Bestimmung von Capsaicin, Dihydrocapsaicin, Nordihydrocapsaicin und Homodihydrocapsaicin in Fructus capsici mit HPLC entwickelt. Verwendet wurde eine Reversed-Phase-Säule μ Bondapak C₁₈ und ein Elutionsmittelgemisch Methanol-Wasser (53:47). Die Substanzen konnten in 40 min gut voneinander getrennt werden. Die Nachweisgrenze für Capsaicin beträgt 100 ng bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1. Die relative Standardabweichung bei der Gehaltsbestimmung beträgt 0.54%. Die Resultate der HPLC-Methode sind gut korrelierbar mit den Resultaten, die mit GC- und DC-kolorimetrischen Methoden erhalten wurden.

DANK

Unser Dank gilt Frl. U. Minges und Herrn A. Alther für ihre Hilfe bei der Durchführung von praktischen Arbeiten. Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für die teilweise Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

LITERATUR

- 1 A. Müller-Stock, *Dissertation*, Nr. 4904, ETH, Zürich, 1972.
- 2 A. Müller-Stock, R. K. Joshi und J. Büchi, *Pharm. Acta Helv.*, 47 (1972) 7.
- 3 K. R. Lee, T. Suzuki, M. Kobashi, K. Hasegawa und K. Iwai, *J. Chromatogr.*, 123 (1976) 119.
- 4 O. Sticher und F. Soldati, *Pharm. Acta Helv.*, 53 (1978) 46.
- 5 O. Sticher und F. Soldati, *Schweiz. Apoth. Ztg.*, 115 (1977) 580.
- 6 O. Sticher und F. Soldati, *Planta Med.*, 32A (1977) 38.
- 7 B. Meier und O. Sticher, *J. Chromatogr.*, 138 (1977) 453.
- 8 O. Sticher und B. Meier, *Pharm. Acta Helv.*, 53 (1978) 40.
- 9 *Mitteilungen zur Dünnschicht-Chromatographie V*, E. Merck, Darmstadt.