

Note

Verfahrenstechnisches zur quantitativen Hochleistungs-Dünnschichtchromatographischen Analyse nicht nur fluoreszierender Verbindungen gezeigt am Beispiel der Gallensäuren

R. KLAUS

E. Merck, Analytisches Zentrallaboratorium, D-6100 Darmstadt (B.R.D.)

(Eingegangen am 26. April 1985)

Von den verschiedenen in der Dünnschichtchromatographie (TLC) angewandten Nachweismöglichkeiten zeichnet sich die fluorimetrische Detektion durch einige wesentliche, im folgenden hier nur angedeutete Vorteile gegenüber den anderen Verfahren aus: kleinere Nachweisgrenzen, weitgehende Unabhängigkeit der Messgrößen von Fleckgröße und Fleckform und Verbesserung der chromatographischen Trennung bei unveränderter photometrischer Empfindlichkeit beim Übergang zur Bandauftragung. Von diesen Verfahrensdetails verlangt zweifellos die Bandauftragung ein gewisses manuelles Geschick. Sowohl die Geräteindustrie (Camag, Muttenz, Schweiz, und Scilab, Therwil, Schweiz) als auch die Hersteller von DC-Fertigplatten (E. Merck, B.R.D.) haben zum Teil angeregt durch diesbezügliche Publikationen^{1–13} auf verschiedenen Wegen versucht, diese Auftragsweise manuell unabhängiger zu machen. Durch die Einführung von Fertigplatten mit Konzentrierungszone für die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) können die Komponenten punktförmig aufgetragener Substanzgemische bei der chromatographischen Entwicklung zu extrem schmalen Bändern konzentriert werden. Die Geräteindustrie hat ihrerseits durch mehr oder weniger aufwendige mechanisch-elektronische Apparaturen zur automatisierten Bandauftragung beigetragen. Während nun die mechanisch-elektronische Auftragung im Vergleich zu der Chromatographie selbst einen relativ grossen Kostenaufwand verursacht, führt andererseits die Verwendung von Schichten mit Konzentrierungszone bei einigen Substanzklassen nicht immer zum gewünschten Erfolg. Unter Verwertung von eigenen Erfahrungen mit der manuellen Kapillar-Auftragetechnik kann jetzt ergänzend ein halbautomatisches Band-Auftragungsverfahren vorgestellt werden, welches für Laboratorien mit Schreiber- bzw. Chromatogrammphotometer- oder Elektrophorese-Scanner-Ausstattung keinen nennenswerten zusätzlichen apparativen Aufwand verlangt. Nicht unwesentlich ist die nahezu problemlose Handhabung: Es existieren weder Justierprobleme Kanüle-Schicht (hier Kapillare-Schicht) noch Beschädigungen der Schicht während des Auftragens.

Die nach dem Auslaufprinzip arbeitende 5 μ -Auftragung ist für einige wenige Lösungsmittel, bisher nur festgestellt bei Dichlormethan und Chloroform, aufgrund deren Dichte und Oberflächenspannung zunächst beeinträchtigt. Durch eine entsprechende Mischung, z.B. im Falle Dichlormethan mit Dioxan, wird eine sachgemässe Applikation jedoch wieder erreicht. Die Anwendung des Auftrageverfahrens

für die chromatographische Analyse absorbierender Verbindungen sei mit dem Hinweis auf den Verlust einiger methodischer Vorteile gegenüber fluorimetrischen Techniken erwähnt.

Apparative Einzelheiten

Die hier empfohlene halbautomatische Bandauftragung bedient sich zunächst eines im Handel erhältlichen Auftragegerätes (E. Merck) für manuelle Bandauftragung. Dieses besteht aus dem eigentlichen Kapillarhalter und einer Vorrichtung zu dessen Abstandsfixierung zur HPTLC-Platte während des Auftragens. Die einiges Geschick verlangende Prozedur wird nun übernommen von dem in jedem der eingangs genannten Geräte eingebauten Papier- oder Messtischtransport. So erlaubt z.B. das für diese Arbeiten zur Verfügung stehende Chromatogramm-Spektralphotometer (Zeiss) Tischgeschwindigkeiten und damit Auftragesgeschwindigkeiten u.a. von 300, 200, 120, 100 und 50 mm/sec.

Fig. 1a zeigt einen Photometerausschnitt mit den für den Auftragevorgang erforderlichen Ergänzungsteilen. Fig. 1b dokumentiert die Auftragemöglichkeit unter Verwendung eines Servogorschreibers.

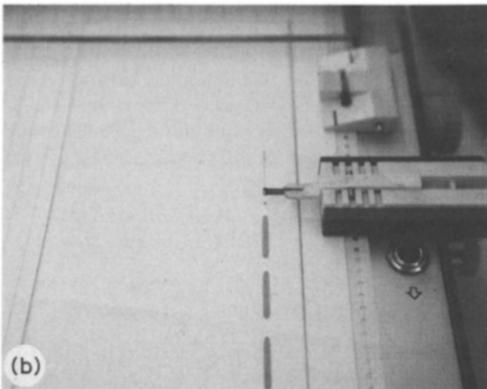
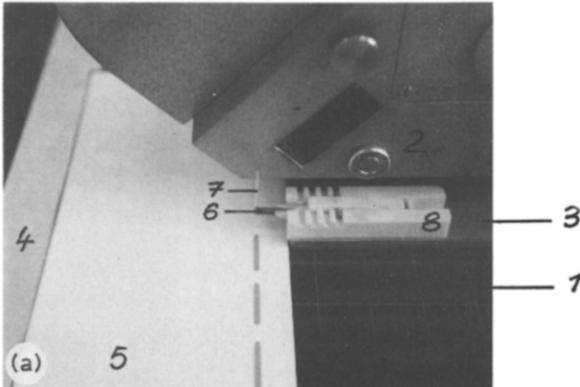


Fig. 1. (a) Photometerausschnitt mit (1) Messtischgrundplatte, (2) Messkopf und (3) Messkopfschirm, (4) Alu-Schiene als Halterung der HPTLC-Platte, (5) HPTLC-Platte, (6) Kapillarhalter mit (7) 5- μ l Kapillare, (8) Vorrichtung zu dessen Abstandsfixierung. (b) Adaption des Auftragegerätes an einen Servogorschreiber.

Auftragevorgang

Die Kapillare wird in den Halter eingespannt und mit der aufzutragenden Lösung gefüllt. Beide werden auf die auf dem Messkopfschirm angebrachte Vorrichtung gelegt. Nach dem Einschalten des Messtischvorschubes senkt man per Hand die Kapillare auf die Schicht. Ist die Auftragung beendet, wird der Messtischmotor abgeschaltet.

Reproduzierbarkeitskriterien des Verfahrens

An Hand der Substanzklasse der Gallensäuren, deren Analyse sowohl in den verschiedensten Probenmaterialien als auch mit den unterschiedlichsten Methoden in der Literatur¹²⁻¹⁹ ausführlich behandelt ist, werden im folgenden einige Kriterien zur Reproduzierbarkeit, auch Gültigkeit des Verfahrens beschrieben.

Für die Kapillaren-Auftragung in der TLC sind 0,75, 2 und 5- μ l Auslauf-Kapillaren gebräuchlich²⁰. Sowohl die von den Herstellern angegebenen Fertigungstoleranzen als auch eigene Erfahrungen lassen allerdings Volumina von 0,75 μ l und 2 μ l für die quantitative Punkt- oder Bandauftragung weniger geeignet erscheinen. Allein 5- μ l Kapillaren mit Fertigungstoleranzen von $\pm 1\%$ haben sich bei Bandauftragungstechniken manuell, halbautomatisch oder durch Konzentrierungszone, aber auch bei Punktauftragung bewährt. Zur Reduzierung der neben dem Volumen von

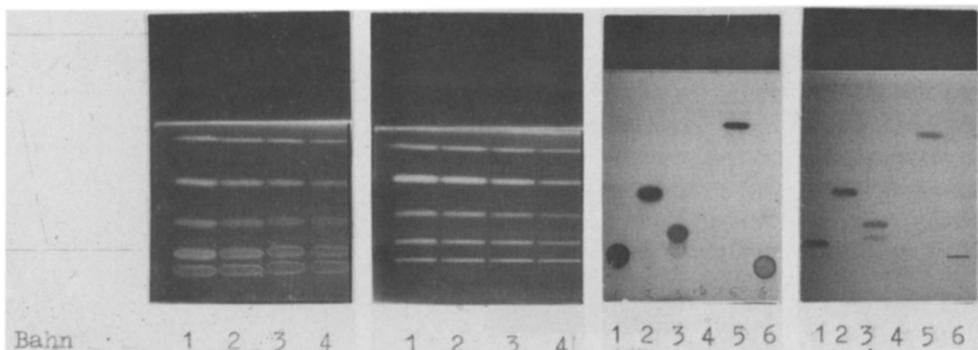


Fig. 2. 5- μ l Bandauftragung. Bahn 1-4 Testgemisch: Cholsäure, Desoxycholsäure, Hyodesoxycholsäure, Glycocholsäure, Lithocholsäure, Taurocholsäure (Natrium-Salz) je ca. 10 mg/5 ml Methanol. Schicht: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 oF 10 \times 20 cm. Auftragemengen: Bahn 1, 1 μ g; Bahn 2, 0,5 μ g; Bahn 3, 0,25 μ g; Bahn 4, 0,125 μ g. Auftragengeschwindigkeit 200 mm/min, Trocknung mit Heissluftfön, Konzentrierung: ohne, Fließmittel: Isooctan-Ethylacetat-Eisessig-Diisopropylether (25:20:5:5), Normalkammer ohne Kammersättigung, Steighöhe 2 \times 5 cm. Derivatisierung: *in situ*, Sprühlösung Perchlorsäure 5%ig in Methanol, Nachbehandlung Trockenschrank ca. 120°C bis gerade wahrnehmbare Verfärbung, Nachweis: Fluoreszenz.

Fig. 3. Konzentrierungseffekt *in situ*. Chromatogramm wie Fig. 2 ausser: Auftragengeschwindigkeit, 300 mm/min; Konzentrierung, nach der Bandauftragung und Trocknung mit Methanol bis etwa 5 mm über Auftragung steigen lassen.

Fig. 4. 5- μ l Punktauftragung, Bahn 1, Cholsäure; Bahn 2, Desoxycholsäure; Bahn 3, Hyodesoxycholsäure; Bahn 4, Glycocholsäure; Bahn 5, Lithocholsäure; Bahn 6, Taurocholsäure (Natrium-Salz) je ca. 10 mg/5 ml Methanol. Schicht: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 oF 10 \times 20 cm. Auftragemengen Bahn 1-6, 10 μ g. Fließmittel: Isooctan-Ethylacetat-Eisessig-Diisopropylether (25:20:5:5), Normalkammer ohne Kammersättigung, Steighöhe 1 \times 7 cm. Derivatisierung: Tauchlösung Perchlorsäure 5%ig in Methanol, Tauchzeit ca. 10 sec, Nachbehandlung Trockenschrank ca. 120°C, ca. 5 min. Nachweis: Absorption im Sichtbaren (Verkohlung).

Fig. 5. Analog Fig. 4, jedoch nach der Auftragung und Trocknung Konzentrierung mit Fließmittel Methanol bis ca. 5 mm über Auftragspunkt.

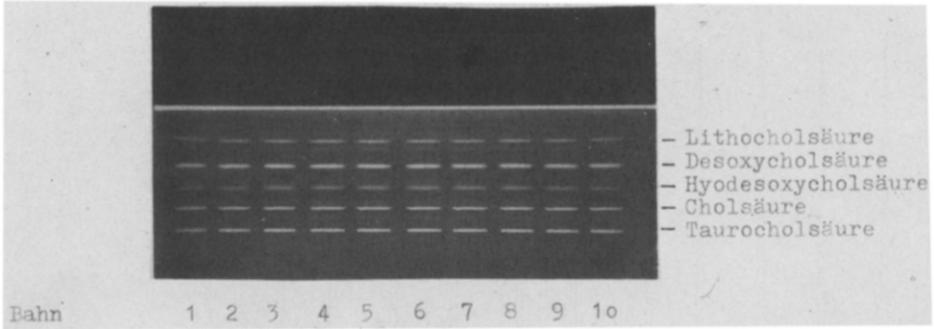


Fig. 6. Reproduzierbarkeit der Auftragetechnik. Testgemisch: Cholsäure, Desoxycholsäure und Taurocholsäure (Natrium-Salz) je ca. 10 mg/5 ml Methanol. Schicht: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 oF 10 × 20 cm. Vor dem Auftragen des Testgemisches die Platte in dem Fließmittel vorsteigen lassen. Auftragen Bahn 1–10: Kapillare 5 μ l enthaltend ca. 120 ng der einzelnen Komponenten, Auftragegeschwindigkeit 200 mm/min, Trocknung mit einem Heissluftfön. Konzentrierung: Methanol. Fließmittel: Isooctan-Ethylacetat-Eisessig-Diisopropylether (25:20:5:5), Normalkammer ohne Kammersättigung, Steighöhe 2 × 5 cm. Derivatisierung: *in situ*, Sprühlösung Perchlorsäure 5%ig in Methanol, Nachbehandlung Trockenschrank 120°C bis wahrnehmbare Verfärbung. Nachweis: Fluoreszenz.

dem verwendeten Lösungsmittel abhängigen Startzonenausdehnung kann auf die in der TLC bereits praktizierte *in situ* Konzentrierung mit einem sehr polaren Lösungsmittel zurückgegriffen werden. Dieser Effekt wird mit den Fig. 2 und 3 für die Bandauftragung, mit den Fig. 4 und 5 für eine Punktauftragung ergänzend zu früheren Darstellungen am Beispiel der Gallensäuren wiederholt.

Zur Dokumentierung der Auftragereproduzierbarkeit wird das bei Fig. 2 be-

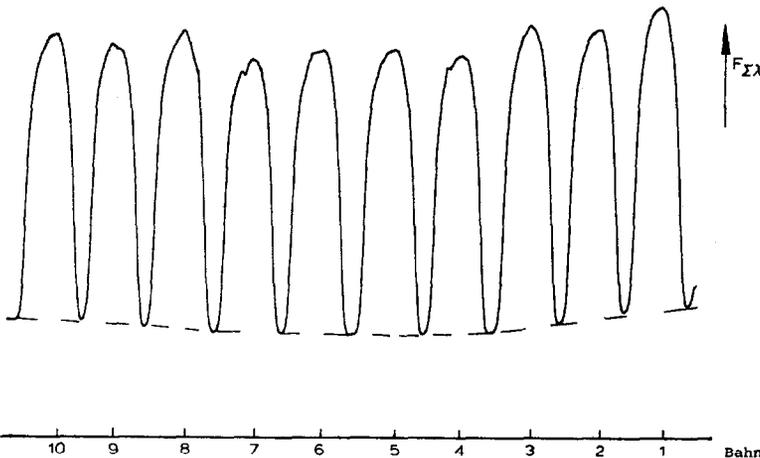
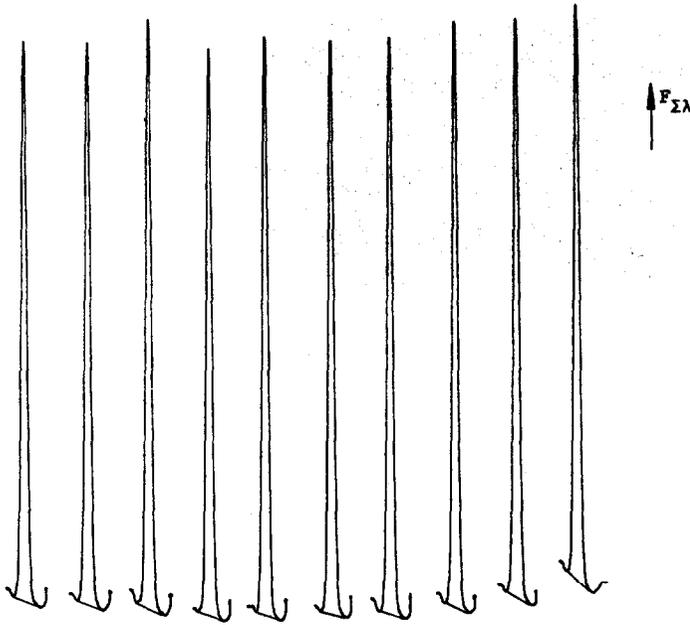


Fig. 7. Substanzverteilung senkrecht zur chromatographischen Steigrichtung gemessen an den Bändern von Desoxycholsäure von Chromatogramm Fig. 6. Messbedingungen: Chromatogrammspektrophotometer, Anregungsstrahlung: Hg 366 nm, Messfläche 3,5 × 1 mm, Messgröße: Fluoreszenzstrahlung $F_{\Sigma\lambda}$ integriert im Wellenlängenbereich $380 < \lambda < 700$, Schreibermessbereich 20 mV, Platten- und Papiergeschwindigkeit 30 mm/min.



	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Bahn
	35,9	36,0	37,4	36,7	37,6	36,5	36,1	36,6	37,2	37,9	$\Sigma F_{\Sigma\lambda}$ [mVs]

Fig. 8. Gesamtfluoreszenz $\Sigma F_{\Sigma\lambda}$ (mVs) bei konstanten Auftragemengen und Auftrageschwindigkeiten gemessen an den Bändern von Desoxycholsäure von Chromatogramm Fig. 6. Messbedingungen wie bei Fig. 7, jedoch Messfläche 14×1 mm.

reits erwähnte Gallensäuren-Testgemisch verwendet. Einzelheiten der Chromatographie sind in der Legende der mit Fig. 6 wiedergegebenen Polaroidaufnahme eines Chromatogrammes angegeben. Eine photometrische Registrierung senkrecht zur chromatographischen Steigrichtung der Komponente Desoxycholsäure, siehe Fig. 7, gibt Aufschluss sowohl über die mit dem Verfahren erreichbare Konstanz der Bandlängen als auch der Bandbelegungen senkrecht zur chromatographischen Steigrichtung. Diese können als ausreichend angesehen werden, ein Gesichtspunkt, auf den bei Bandausschnittsphotometrierungen geachtet werden muss. Mit Fig. 8 wird schliesslich ein Mass für die erreichbare quantitative Reproduzierbarkeit erbracht: Aus der photometrischen Registrierung der Komponente Desoxycholsäure der Bahnen 1–10 errechnet sich eine relative Standardabweichung der Messwerte von $\pm 1,9\%$. Aufgrund der in diesem Bereich linear verlaufenden Kalibrierfunktion ist dieser Wert auch als entsprechendes Fehlerkriterium der Gewichtseinheiten von Desoxycholsäure gültig.

Bei der Auftragung mittels Kapillaren hängt die Auslaufzeit und die mit ihr gekoppelte Bandlänge bei vorgegebener Auftrageschwindigkeit wesentlich von den Eigenschaften des verwendeten Lösungsmittels ab. Die Bedeutung dieses für das Ver-

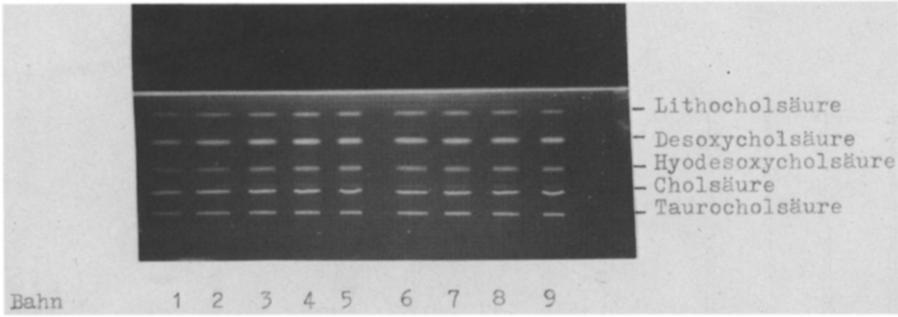


Fig. 9. Reproduzierbarkeit der Auftragetechnik analog Fig. 6 jedoch mit abgestuften Auftragegeschwindigkeiten: Bahn 1, 300 mm/min/5 μ l; Bahn 2 und 6, 200 mm/min/5 μ l; Bahn 3 und 7, 120 mm/min/5 μ l; Bahn 4 und 8, 100 mm/min/5 μ l; Bahn 5 und 9, 50 mm/min/5 μ l.

fahren zunächst als mögliche systematische Fehlerquelle zu wertenden Effekts bei unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften zwischen Proben- und Vergleichslösung wird mit dem Chromatogramm der Fig. 9 simuliert. Hier ist im Gegensatz zu Fig. 6 das Gallensäuretestgemisch mit abgestuften Geschwindigkeiten zwischen 300 und 50 mm/min/5 μ l aufgetragen. Fig. 10 verdeutlicht wiederum die Bandbelegung der Komponente Desoxycholsäure senkrecht zur chromatographischen Steigrichtung. Wie einleitend bereits angedeutet, zeichnet sich der photometrische Nachweis

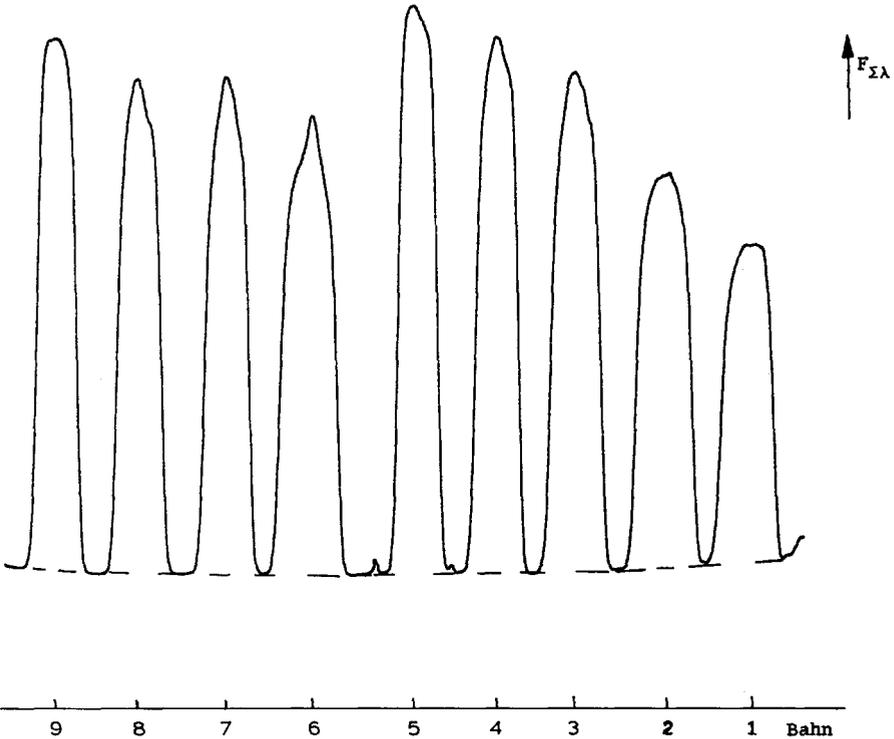


Fig. 10. Substanzverteilung senkrecht zur chromatographischen Steigrichtung gemessen an den Bändern von Desoxycholsäure von Chromatogramm Fig. 9. Messbedingungen analog Fig. 7.

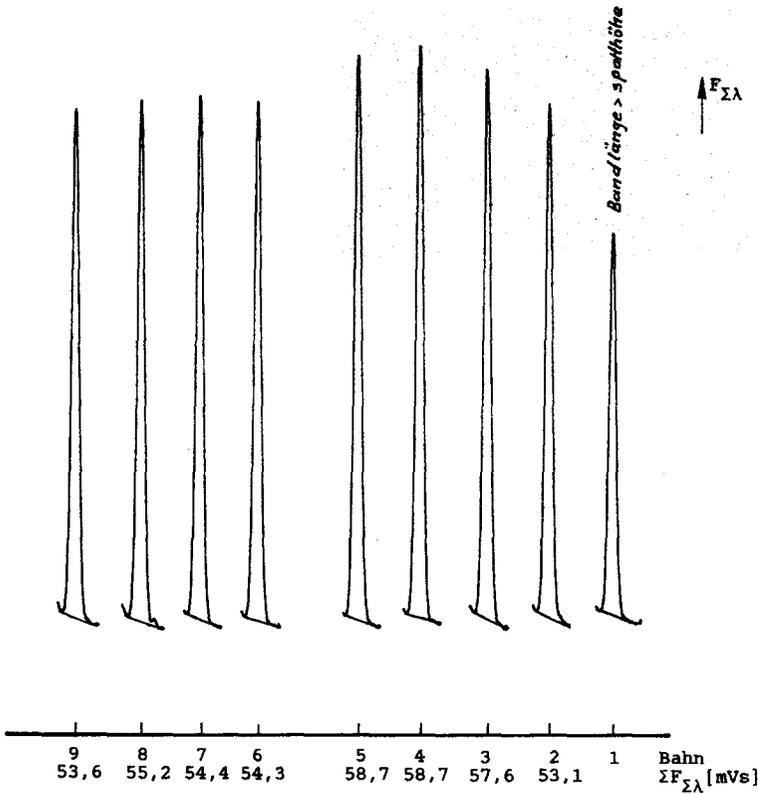


Fig. 11. Gesamtfluoreszenz $\Sigma F_{\Sigma\lambda}$ (mVs) bei konstanten Auftragemengen jedoch abgestuften Auftrageschwindigkeiten gemessen an den Bändern von Desoxycholsäure von Chromatogramm Fig. 9. Messbedingungen wie bei Fig. 7, jedoch Messfläche 14×1 mm.

fluoreszierender Substanzen bei vernachlässigbarer Plattenuntergrundfluoreszenz und vorgegebener Substanzmenge durch eine weitgehende Unabhängigkeit des Fluoreszenz-Ortsintegrals $\Sigma F_{\Sigma\lambda}$ von der belegten Fläche selbst aus. Achtet man nun im Zusammenhang mit der Bestimmung $\Sigma F_{\Sigma\lambda}$ bei der Festlegung der Messfläche darauf, dass in einer Richtung die Messflächenbegrenzung die Fleckausdehnung des grössten Fleckes erreicht oder übersteigt, so liefert die Fluoreszenz-Ortskurve in der zweiten Richtung integriert die Grösse $\Sigma F_{\Sigma\lambda}$. Für die Komponente Desoxycholsäure des Chromatogrammes Fig. 9 sind die Fluoreszenz-Ortsintegrale für verschiedene Auftrageschwindigkeiten bei den Registrierungen Fig. 11 angegeben. Eine Zusammenfassung der Werte der Bahnen 2-9 ergibt mit einer relativen Standardabweichung von 4% einen erhöhten Wert gegenüber dem der reinen Auftragerproduzierbarkeit von 1,9% der Fig. 8. Eine wesentliche Verschiebung in der Klassifizierung als quantitatives Verfahren dürfte hiermit jedoch nicht verbunden sein.

Anwendungen des Verfahrens

Es liegt in der Natur der auch hier zur Diskussion stehenden Verbindungen, dass Anwendungsfälle vorwiegend in dem Bereich der biologischen Analytik zu su-

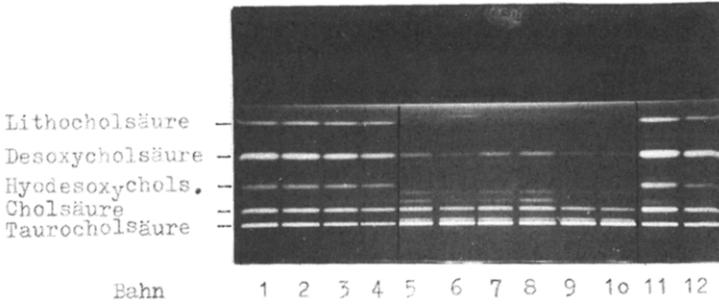


Fig. 12. HPTLC-Chromatogramm zur qualitativen und quantitativen Analyse von Gallensäuren in Ochsgallen. Schicht: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 oF 10 × 20 cm. Bahn 1-4, 11 und 12 Vergleichsbahnen, Bahn 5-10 Probehahnen von P₁-P₆. Auftragemengen: Bahn 1 und 11 Cholsäure, Desoxycholsäure, Hyodesoxycholsäure, Glycocholsäure, Lithocholsäure, Taurocholsäure (Natrium-Salz), je 1 µg; Bahn 2 und 12, 0,5 µg; Bahn 3, 0,25 µg; Bahn 4, 0,125 µg; Bahn 5-10, je 1 µg. Auftrageschwindigkeit 300 mm/min/5 µl. Trocknung mit einem Heissluftfön. Konzentrierung mit Methanol. Fließmittel: Isooctan-Ethylacetat-Eisessig-Diisopropylether (25:20:5:5), Normalkammer ohne Kammerfüllung, Steighöhe 2 × 5 cm. Derivatisierung *in situ*, Sprühlösung Perchlorsäure 5%ig in Methanol, Nachbehandlung Heizplatte ca. 120°C bis gerade wahrnehmbare Verfärbung. Nachweis: Fluoreszenz.

chen sind. Dem ist mit einem ersten Beispiel der qualitativen und quantitativen Überprüfung der Zusammensetzung von Ochsgallen Rechnung getragen. Für die Darstellung des Verfahrens handelt es sich um ein besonders geeignetes Untersuchungsmaterial: Die pulverförmigen Proben enthalten unterschiedliche Mengen an Gallensäuren, die Anreicherungsschritte, wie bei klinischen Proben häufig erforderlich, nicht verlangen.

Auf den beiden mit den Fig. 12 und 13 wiedergegebenen Chromatogrammen ist auf den Bahnen 1-4 sowie 11 und 12 das bereits erwähnte Testgemisch in unterschiedlichen Mengen auf den Bahnen 5-10 die Proben P₁-P₆ chromatographiert. Als Auftrageschwindigkeiten sind bei Chromatogramm Fig. 12 300 mm/min/5 µl und bei Fig. 13 50 mm/min/5 µl gewählt.

Die chromatographischen Bedingungen sind für Chromatogramm Fig. 13 in der Weise geändert, dass bei Fig. 12 nicht auszuschliessende Koinzidenzen im HRF-Bereich < 10 aufgelöst werden. Qualitativ konnten in den Proben neben nicht identifizierten Bestandteilen Taurocholsäure, Cholsäure und Desoxycholsäure sowie bei Auftragemengen im 100-µg Bereich Spuren von Lithocholsäure und Hyodesoxy-

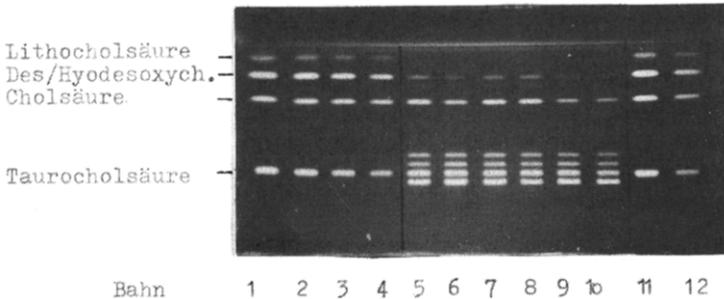


Fig. 13. Analog Fig. 12, jedoch Auftrageschwindigkeit 50 mm/min/5 µl, Fließmittel: Chloroform-Methanol-Wasser (70:25:3) und Derivatisierung 2-3 sec tauchen.

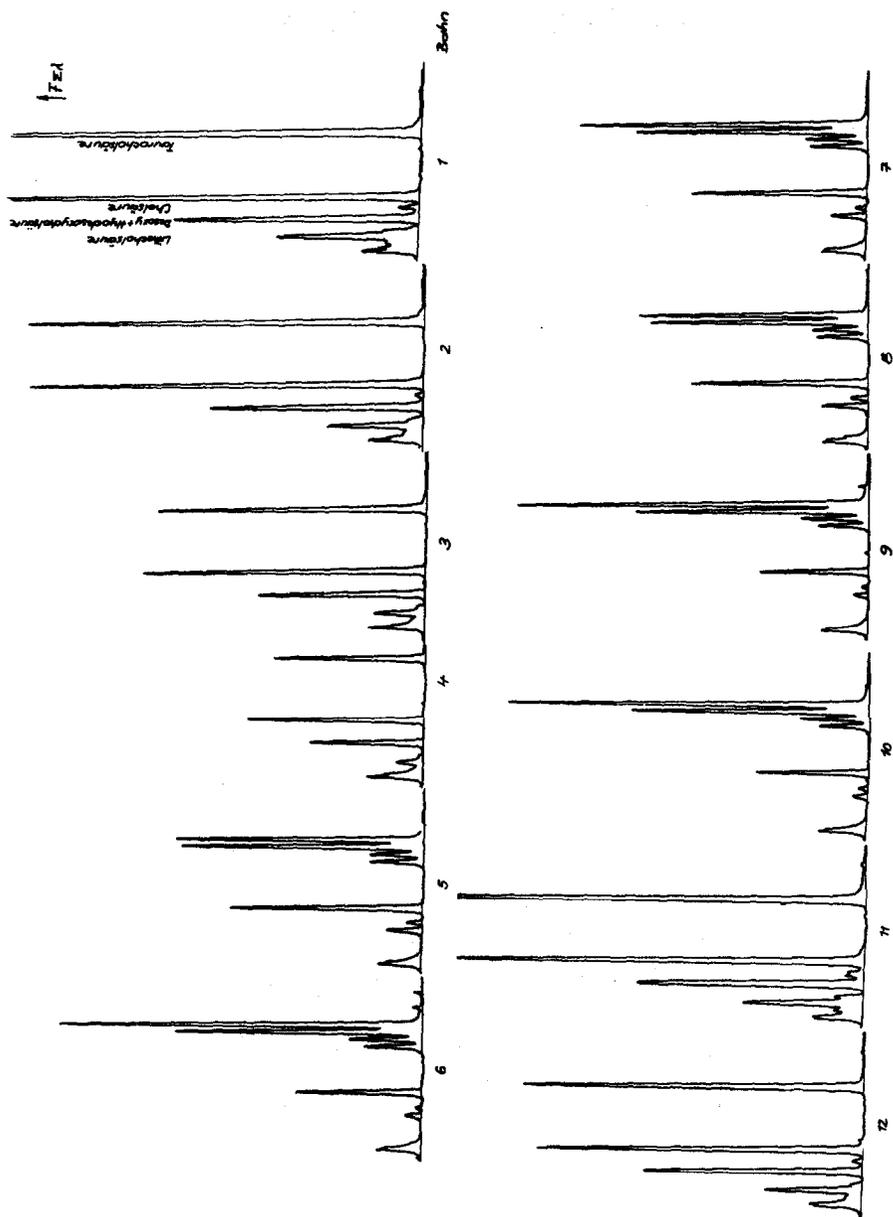


Fig. 14. Fluoreszenz-Ortskurven der Bahnen 1-12 von Chromatogramm Fig. 13. Messbedingungen: Chromatogrammspektrophotometer, Anregungsstrahlung Hg 366 nm, Messfläche 0.3×12 mm, Messgröße: Fluoreszenzstrahlung F_{21} integriert im Wellenlängenbereich $380 < \lambda < 700$ nm, Schreibermessbereich 20 mV, Platten- und Papiergeschwindigkeit 30 mm/min.

TABELLE I

QUANTITATIVE ANALYSE VON TAUROCHOLSÄURE, CHOLSÄURE UND DESOXYCHOLSÄURE IN OCHSENGALLEN

	Taurocholsäure (%)	Cholsäure (%)	Desoxycholsäure (%)
P ₁	23,7	16,0	3,2
P ₂	24,3	8,6	1,3
P ₃	21,3	13,6	2,9
P ₂	18,9	14,1	4,0
P ₅	20,9	7,1	1,3
P ₆	20,8	7,2	1,3

cholsäure nachgewiesen werden. Die quantitative Analyse von Taurocholsäure und Cholsäure unter den in der Legende von Fig. 13 und für Desoxycholsäure unter den in der Legende von Fig. 12 angegebenen Bedingungen ist in Tabelle I zusammengefasst. Mit Fig. 14 werden zur Veranschaulichung der photometrischen Trennung die Fluoreszenz-Ortskurven der Bahnen 1–12 des Chromatogrammes von Fig. 13 gezeigt. Eine Fehlerrechnung der jeweils aus 4 Einzelwerten resultierenden Mittelwerte ergibt eine gemittelte relative Standardabweichung von 3–4% bzw. eine relative Standardabweichung der Mittelwerte für $n = 4$ von 1,5–2%.

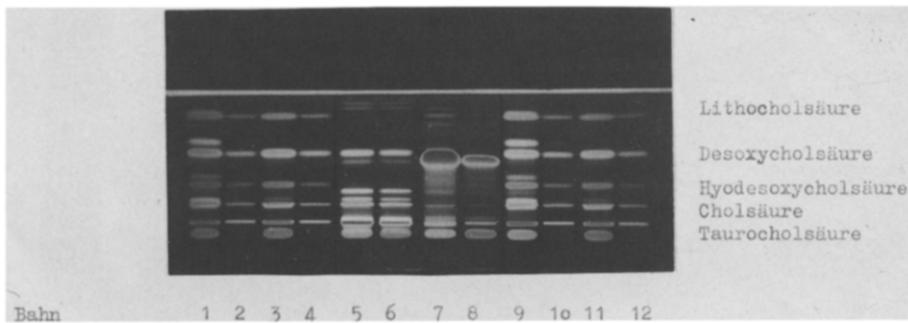


Fig. 15. HPTLC-Chromatogramm zur qualitativen Analyse von Tauroglykocholsäure und Chenodesoxycholsäure. Schicht: HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 oF 10 × 20 cm. Bahn 1–4 und 9–12 Gallensäuren-Vergleichsbahnen, Bahn 5 und 6 Tauroglykocholsäure, Bahn 7 und 8 Chenodesoxycholsäure. Auftragemengen: Bahn 1 und 9, je ca. 10 µg (Lösung ca. 2 Monate alt); Bahn 2 und 10, je ca. 1 µg (Lösung ca. 2 Monate alt); Bahn 3 und 11, je ca. 10 µg; Bahn 4 und 12 je ca. 1 µg; Bahn 5, ca. 100 µg; Bahn 6, ca. 50 µg; Bahn 7, ca. 250 µg; Bahn 8, ca. 50 µg. Auftrageschwindigkeit 200 mm/min/5 µl, Trocknung mit Heissluftfön, Konzentrierung mit Methanol. Fließmittel: Isooctan–Ethylacetat–Eisessig–Diisopropylether (25:20:5:5), Normalkammer ohne Kammersättigung, Steighöhe 2 × 5 cm. Derivatisierung *in situ*, Sprühlösung Perchlorsäure 5%ig in Methanol. Nachbehandlung Heizplatte oder Trockenschrank ca. 100°C bis gerade wahrnehmbare Verfärbung. Nachweis: Fluoreszenz.

Bei einem zweiten ausgewählten Anwendungsfall des Auftrageverfahrens handelt es sich im Gegensatz zu dem Versuch mit Ochsen gallen um Reinheitsuntersuchungen²¹ definierter Gallensäuren mit relativ grossen Auftragemengen. Das mit Fig. 15 wiedergegebene Chromatogramm zeigt auf den Bahnen 5 und 6 die Zusammensetzung von Tauroglykocholsäure, auf den Bahnen 7 und 8 die Trennung von Matrix

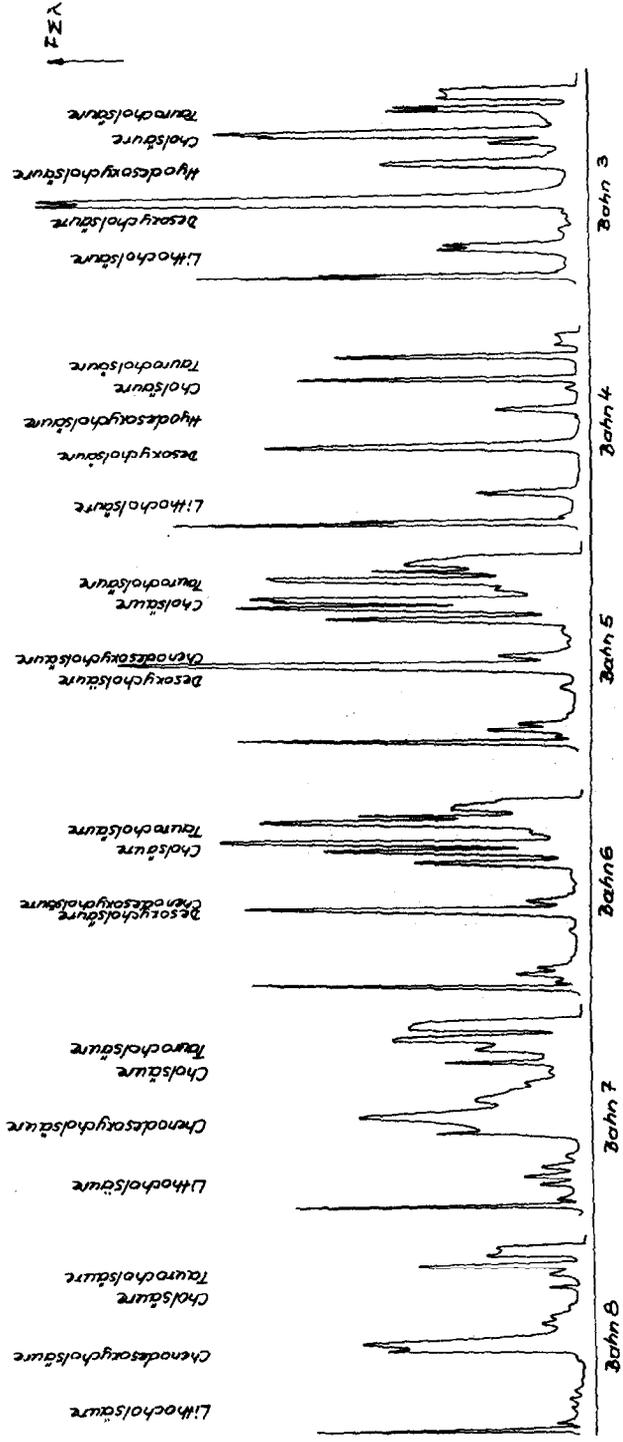


Fig. 16. Fluoreszenz-Ortskurven der Bahnen 3-8 von Chromatogramm Fig. 15. Messbedingungen analog Fig. 14.

und Nebenbestandteilen von Chenodesoxycholsäure. Auf den Bahnen 3, 4 sowie 11 und 12 sind zur Identifizierung einzelner Komponenten Gallensäurestandardlösungen aufgetragen. Im Vergleich zu den für die Bahnen 1, 2, 10 und 11 verwendeten ca. 2 Monate alten Standardlösungen gleicher Zusammensetzung geben diese darüberhinaus Hinweise auf die Haltbarkeit methanolischer Lösungen von Gallensäuren. Fig. 16 zeigt die Fluoreszenz-Ortskurven der Bahnen 3–8. Bei der Zuordnung der Vergleichs- und Probehahnen zum Zwecke einer hier nur beabsichtigten qualitativen Analyse ist auf den Effekt der Konzentrationslöschung bei einigen Komponenten zu achten.

LITERATUR

- 1 F. Pavelka, *Mikrochim. Acta*, (1965) 1058.
- 2 A. Achaval und R. D. Ellefson, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 329.
- 3 F. A. Vandenneuvel, *J. Chromatogr.*, 25 (1966) 102.
- 4 J. S. Chahl und C. C. Kratzing, *Clin. Chim. Acta*, 26 (1969) 177.
- 5 F. K. Klein und H. Rapoport, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 505.
- 6 C. B. Mankinen und R. M. Sachs, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 509.
- 7 D. Shapcott, B. Lemieux und A. Sahapoglu, *J. Chromatogr.*, 70 (1972) 174.
- 8 J. W. Boag, P. S. Bond, E. M. Fielden, H. Hodt und Z. Tramer-Zarębska, *J. Chromatogr.*, 73 (1972) 265.
- 9 J. M. Beattie und J. A. Demetriou, *J. Chromatogr.*, 92 (1974) 87.
- 10 O. Sudilovsky und A. Kovach, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1725.
- 11 U. Pohl und W. Schweden, *Z. Anal. Chem.*, 274 (1975) 269.
- 12 W. Schmidt und A. Nemes, *Rev. Chim. (Bukarest)*, 27 (1976) 168.
- 13 M. T. Wu und D. K. Salunkhe, *J. Chromatogr.*, 147 (1978) 429.
- 14 N. Kaplowitz und N. B. Javitt, *J. Lipid Res.*, 14 (1973) 224.
- 15 R. Beke, G. A. De Weerd, J. Parijs, W. Huybrechts und F. Barbier, *Clin. Chim. Acta*, 70 (1976) 197.
- 16 S. A. Hansen, *J. Chromatogr.*, 124 (1976) 123.
- 17 M. Nakagaki und F. Nakayama, *J. Chromatogr.*, 177 (1979) 343.
- 18 A. K. Batta, G. Salen und S. Shefer, *J. Chromatogr.*, 168 (1979) 557.
- 19 A. van den Ende, C. E. Rädcker und W. M. Mairuhu, *Anal. Biochem.*, 134 (1983) 153.
- 20 C. E. Emanuel, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1568.
- 21 G. Szepesi, K. Dudás, A. Pap, Z. Végh, E. Mincsovcics und T. Tyihák, *J. Chromatogr.*, 237 (1982) 137.