

**BESTIMMUNG TOXISCHER SUBSTANZEN UND IHRER METABOLITEN
IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN MITTELS
DER GASCHROMATOGRAPHIE VIII.*****AMEISENSÄURE IM URIN**

M. MRÁZ und V. ŠEDIVEC

Institut für Hygiene und Epidemiologie, 100 42 Prag 10

Eingegangen am 11. Dezember 1972

Es wurde eine gaschromatographische Methode zur Ameisensäurebestimmung im Urin und anderen verdünnten wäßrigen Lösungen ausgearbeitet. Sie beruht auf der Esterifizierung der wäßrigen Probe mittels eines Äthanol-Schwefelsäure-Gemisches und auf der Analyse der Gleichgewichtsgasphase über der Reaktionsflüssigkeit. Die Methode erfordert keine entsprechende Vorpräparierung der Proben, wird durch die Anwesenheit der übrigen Komponenten des Urins nicht gestört und gestattet eine schnelle Bestimmung der Ameisensäure, ob diese nun frei oder gebunden in Form eines Salzes zugegen ist. Die maximal erreichte Empfindlichkeit beträgt 1 p.p.m. Ameisensäure.

Bei der gaschromatographischen Analyse niedrigmolekularer Fettsäuren wurden bei der Bestimmung von Essigsäure und höheren Säuren bedeutende Erfolge erzielt. Beim ersten Glied der homologen Reihe, also bei der Ameisensäure, trat jedoch eine ziemliche Anzahl noch zu lösender Probleme auf, namentlich bei der Bestimmung von Spurenengen in verdünnten wäßrigen Lösungen oder in biologischen Flüssigkeiten¹⁻¹⁰. Der Hauptmangel besteht in der geringen Bestimmungsempfindlichkeit gegenüber den homologen, mittels Flammenionisation nachweisbaren Säuren², im Störeinfluß des Wassers bei der Wärmeleitfähigkeitsdetektion^{8,9}, in der Nähe der Elutionsdauer mit der der Essig- oder auch der Propionsäure^{1-3,5-7,11-14} und in der ausgeprägten Tendenz zur Schwanzbildung¹¹, die auch durch empfohlene Verbesserung der Kolonnenfüllung^{1,3-5,15,16} nicht vollständig unterdrückt werden kann. Bei der eigentlichen chromatographischen Verteilung wurden außerdem durch Interaktion mit in der Kolonnenfüllung enthaltene Phosphorsäure⁴ durch katalytische Zersetzung an den Metallteilen des Apparats³ oder durch irreversible Sorption am Träger⁷ verursachte Verluste beobachtet. Im Bestreben, die angeführten Schwierigkeiten zu umgehen, wurde von einigen Autoren der Versuch gemacht, die niedrigmolekularen Fettsäuren in Methylester^{17,18} oder in andere Derivate¹⁹⁻²² zu überführen. Bei der Ameisensäure brachte jedoch auch diese Modifikation, da die Isolierung des sehr flüchtigen und löslichen Methylesters sehr schwierig ist^{1,3,19} und die Ausbeuten der übrigen Derivate sehr variabel sind^{3,19-21}, nicht den gewünschten Erfolg.

Zur Untersuchung des Metabolismus einiger schädlicher Industrieprodukte ist eine einfache, aktionsfähige, empfindliche Methode erforderlich, die die serienmäßige

* VII. Mitteilung: diese Zeitschrift 38, 1754 (1973).

Ameisensäurebestimmung im Urin exponierter und nichtexponierter Personen und Versuchstiere gestattet. Da keine der in der Literatur angeführten Methoden die an sie gestellten Anforderungen erfüllte, wurde von uns der Versuch gemacht, eine neue Modifikation auszuarbeiten, die auf der Ameisensäureesterifizierung mittels Äthanol im geschlossenen System und auf der Analyse der Gasphase über dem Reaktionsgemisch beruht. Diese als "head space gas analysis" bezeichnete Technik wurde bereits früher bei der Äthanolbestimmung im Blut²³⁻²⁹, bei der Analyse verdünnter wäßriger Lösungen³⁰⁻³² und bei der Analyse von Geschmacks- und aromatischen Substanzen in Lebensmitteln³³⁻³⁵ mit Erfolg herangezogen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Chemikalien und Apparate. Bei der wäßrigen Natriumformiatstandardlösung (0,3695 g in 1000 ml) entspricht 1 ml 250 µg Ameisensäure; eine Methyläthylketonlösung (Sdp. 79,5°C) in reinstem Äthanol (1 ml/25 ml). Esterifizierungsgemisch: In ca. 70 ml reinstem Äthanol (96%) werden unter dauerndem Rühren und Kühlen 20 ml konz. Schwefelsäure in Teilmengen zugegeben; das Gemisch wird auf Raumtemperatur temperiert, worauf nach Zugabe von 1 ml Methyläthylketonlösung mit Äthanol auf 100 ml aufgefüllt wird. Es gelangen 10 ml-Fläschchen mit Bakelit-Schraubenschluß, in dessen Mitte eine Öffnung mit einem Durchmesser von 4–5 mm gebohrt ist, zur Anwendung; zum Dichten des Verschlusses dienen ringförmige Silicongummieinlagen von entsprechender Dicke (2–3 mm) und zum Temperieren der Fläschchen gelangt der Höppler-Ultrathermostat mit eingelegtem zylindrischem Gefäß zur Anwendung.

Chromatograph "Chrom 4" mit Ionisations-Flammendetektor. Der Chromatograph beinhaltet eine Kolonne aus nichtrostendem Stahl (2,5 m × 3 mm), gefüllt mit 20%igem Polyäthylenglykol 400 an Chromosorb W mit einer Körnung von 60–80 Siebmaschen (Arbeitstemperatur 80°C, Temperatur des Einspritzraums 100°C, Stickstoff 35 ml/min, Wasserstoff 30 ml/min, Luft 500 ml/min, Registrierempfindlichkeit 1/100, Papierverschiebung 10 mm/min). Die Proben-einspritzung wurde mittels einer 2 ml-Makroinjektionsspritze durchgeführt.

Arbeitsgang. In eines der Fläschchen werden 2 ml Urin eingemessen und 2 ml Esterifizierungsgemisch zugegeben. Das Fläschchen wird mit dem mit einer Einlage versehenen Bakelitverschluß verschlossen, worauf der Inhalt gemischt wird; dabei muß darauf geachtet werden, daß die Dichtungseinlage nicht von der Flüssigkeit befeuchtet wird. Das Fläschchen wird in das zylindrische Gefäß des Höppler-Ultrathermostaten eingelegt und eine Stunde auf 55°C erhitzt. Gleichzeitig wird auch die Makroinjektionsspritze temperiert. Nach Beendigung des Erhitzens werden aus dem Fläschchen im Verlauf von 5–10 Sekunden 2 ml Gasphase in die Makroinjektionsspritze gesaugt und in den Gaschromatographen injiziert. Nach der chromatographischen Aufzeichnung werden die Wellenhöhen des Ameisensäureesters und des Innenstandards (Methyläthylketon) gemessen, worauf ihr gegenseitiges Verhältnis berechnet wird. Aus der Eichkurve wird dann die Ameisensäurekonzentration in 1 ml des untersuchten Urins abgelesen.

Eichkurve. In einen Satz von Fläschchen werden steigende Volumina der Natriumformiatstandardlösung (0,0–2,0 ml) abgemessen und mit destilliertem Wasser auf 2,0 ml aufgefüllt. Die Endlösungen enthalten in 1 ml 0–250 µg Ameisensäure. In jedes Fläschchen werden 2 ml Esterifizierungsgemisch eingebracht, worauf weiter auf oben angeführte Weise gearbeitet wird. Auf den Chromatogrammen wurden die Wellenhöhen des Ameisensäureäthylesters und des Innenstandards gemessen und ihr gegenseitiges Verhältnis, das in das Diagramm gegen die Ameisensäurekonzentration aufgetragen wird (Abb. 1), wird berechnet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ameisensäureesterifizierung

Beim mäßigen Erhitzen von wäßrigen Ameisensäurelösungen mit Äthanol und Schwefelsäure entsteht Äthylformiat. Die Reaktion führt zu einem Gleichgewichtszustand, nach dessen Erreichung sich die Ausbeute des Reaktionsproduktes nicht mehr ändert. Ein Äthanolüberschuß verschiebt das Gleichgewicht in der für die Esterbildung günstigen Richtung. Da die Reaktion im geschlossenen System verläuft, stellt sich gleichzeitig das Gleichgewicht zwischen der flüssigen und Gasphase ein. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes ist die Esterkonzentration in der Gasphase proportional seiner Konzentration in der flüssigen Phase und infolgedessen auch der Konzentration der ursprünglich gegenwärtigen Ameisensäure.

Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung wurde experimentell untersucht: Gleiche Mengen Ameisensäure wurden auf beschriebene Weise, aber bei verschiedener Zeitdauer esterifiziert. Im Verlauf der ersten halben Stunde des Erhitzens änderte sich das Verhältnis der Höhen der chromatographischen Esterwellen und des Innenstandards (R) sukzessive und erwies sich als nicht zufriedenstellend reproduzierbar. Nach fünfundvierzigminütigem Erhitzen erreichte das Verhältnis R konstanten Wert, der während fünf Stunden unverändert blieb. Daher wurden bei den weiteren Versuchen für die Erhitzungsdauer 60 Minuten gewählt.

Analoge Versuche wurden bei Temperaturen von 40, 50 und 60°C durchgeführt. Auch hier erfolgte nach einer gewissen Erhitzungsdauer Einstellung des R -Verhältnisses auf einen konstanten Wert, der jedoch gegenüber dem des Erhitzens auf 55°C etwas verschieden war, und zwar deshalb, weil die Dampftension des Äthylformiats und des Innenstandards sich nicht mit der Temperatur parallel ändert; die Gleichgewichtsgasphase hat bei verschiedenen Temperaturen eine etwas andere

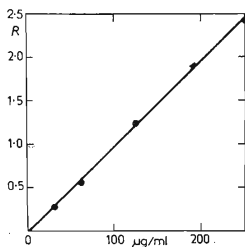


ABB. 1

Eichkurve für die Ameisensäurebestimmung

R ist das Verhältnis der chromatographischen Wellenhöhen des Ameisensäureäthylesters und des Innenstandards; Ameisensäurekonzentration $\mu\text{g/ml}$.

Zusammensetzung. Wie daraus hervorgeht, ist in der präzisen Einhaltung der Erhitzungstemperatur eine der erstrangigen Voraussetzungen zur Erreichung gut reproduzierbarer Ergebnisse zu erblicken.

Für den Arbeitsgang wurde eine Temperatur von 55°C gewählt, da sie nahe an dem Siedepunkt des Äthylformiats liegt (54,3°C). Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt bei dieser Temperatur genügend schnell, der Überdruck in den Fläschchen ist nur gering und die Gasphase ist gegenüber der flüssigen mit dem entstandenen Ester ziemlich angereichert.

Wie bei der Untersuchung der Reaktionsbedingungen weiter festgestellt wurde, erweist sich die Zusammensetzung des verwendeten Esterifizierungsgemisches als nicht besonders kritisch. Die Bestimmungsergebnisse stimmen praktisch überein, falls anstelle des üblichen Esterifizierungsgemisches (20 Vol.%) Gemische mit niedrigerem (15 Vol.%) oder höherem (25 Vol.%) Schwefelsäuregehalt zur Anwendung gelangen. Auch das Volumen der Gleichgewichtsgasphase über der Reaktionsflüssigkeit kann sich in verhältnismäßig weiten Grenzen bewegen. Das gefundene *R*-Verhältnis bleibt das gleiche, ob nun die Esterifizierung in Fläschchen mit einem Gehalt von 10, 15 oder 25 ml durchgeführt wird.

Die Analyse der Gleichgewichtsgasphase über der Reaktionsflüssigkeit kann nötigenfalls eingemal wiederholt werden; die nach der zweiten oder auch nach weiteren Einspritzungen gefundenen Ergebnisse unterscheiden sich nicht von denen der ersten Analyse. Die Möglichkeit, die Einspritzung zu wiederholen, ist vorteilhaft, weil dadurch eine fallweise Kontrolle ermöglicht wird, ohne daß eine neue Probe vorbereitet werden muß. Es wird so vorgegangen, daß die Dichtungseinlage zum Ausgleich des Innendrucks im Fläschchen mit dem atmosphärischen Druck mittels der Injektionsnadel durchgestochen wird. Die Nadel wird dann sofort herausgezogen und das Fläschchen wird ca. 30–60 Minuten von neuem temperiert. Zur Illustration werden von uns die Werte des *R*-Verhältnisses so angeführt, wie sie bei den wiederholten Analysen gefunden wurden: 1,060, 1,070, 1,068, 1,059, 1,062.

Die Ameisensäureesterifizierung verläuft unter den gegebenen Bedingungen nicht quantitativ, sondern führt zu einem Gleichgewichtszustand. Theoretisch würde eine 100%ige Äthylesterausbeute dann erzielt, wenn das Wasser aus dem Reaktionsgemisch eliminiert würde. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, bei denen schwach alkalisierte Ameisensäurelösungen in den Fläschchen zum trockenen verdampft wurden und erst dem Abdampfrückstand das Esterifizierungsgemisch zugegeben wurde. Wie sich jedoch zeigte, versagt dieser Vorgang bei der Urinverarbeitung zufolge unvollständiger Berührung des Urinabdampfrückstandes mit dem Esterifizierungsgemisch. Daher wurde der direkten Verarbeitung der wäßrigen Lösungen, bei denen die Esterausbeute zwar unter 100% liegt, aber sehr gut reproduzierbar ist, der Vorzug gegeben.

Wahl der stationären Phase und des Innenstandards

Die Gleichgewichtsphase enthält neben den Dämpfen des gesuchten Ameisensäure-äthylesters auch Dämpfe des Innenstandards und einen großen Überschuß an Äthanol- und Wasserdämpfen. Das Wasser wird nicht durch den benutzten Detektor ermittelt, Äthanol hingegen gibt eine starke chromatographische Welle, die die des gesuchten Esters um das Vielfache übersteigt. Die erste Bedingung bestand daher darin, eine solche stationäre Phase zu wählen, an der Äthanol, und auch die unsichtbare Wasserzone, eine so lange Elutionsdauer aufweisen, daß keine Beeinflussung der Parameter der chromatographischen Esterwelle eintreten kann. Eine weitere Forderung bestand darin, daß die Elutionsdauer des Äthylformiats von der Elutionsdauer einiger gelegentlich anwesender Urinkomponenten, namentlich des Acetons, genügend verschieden ist. Aus der Reihe der untersuchten Phasen entsprach am besten Polyäthylenglykol 400, bei dem die Äthanolwelle so weit verschoben ist, daß sich vor ihr nicht nur der Äthylester der Ameisensäure, sondern auch der der Essig- und Propionsäure eluiert (Abb. 2); diese Säuren können bei der Urinanalyse gleichfalls Gegenstand des Interesses sein. Höhermolekulare Polyäthylenglykole (1500, 20 M) erweisen sich für den gegebenen Zweck als weniger geeignet.

Die Einspritzung eines großen Gasphasenvolumens mit Hilfe der Makroinjektionsspritze kann mit verhältnismäßig guter Reproduzierbarkeit durchgeführt werden, trotzdem wurde jedoch der Innenstandardmethode der Vorzug gegeben. Als Innenstandard dient Methyläthylketon, da es sich im normalen Urin nicht vorfindet, für den gegebenen Zweck genügend flüchtig ist und seine chromatographische Welle mit den Wellen der Äthylester der niedermolekularen Fettsäuren nicht kollidiert.

Störeinflüsse

Als Grundbedingung für eine erfolgreiche Arbeit ist die vollständige Reinheit des verwendeten Alkohols anzusehen. Die handelsüblichen Arten, selbst wenn sie als erstklassige bezeichnet werden, enthalten häufig Spuren Mengen von Fremdstoffen, deren chromatographische Wellen im kritischen Gebiet der Elutionszeiten liegen und die die Ameisensäurebestimmung verzeichnen oder stören würden. Die Qualität und Quantität der anwesenden Verunreinigungen ist bei den verschiedenen Äthanol-sendungen unterschiedlich und ist offensichtlich von der Art des Ausgangsrohproduktes abhängig. Bei absolutem Alkohol ergeben sich manchmal weitere, Kohlenwasserstoffcharakter aufweisende Verunreinigungen, die wahrscheinlich beim Entwässern mittels azeotropischer Destillation in den Erzeugungsprozeß eingeschleppt wurden. Bei jeder neuen Äthanol-sendung muß daher eine Reinheitskontrolle durchgeführt werden.

Wie sich zeigte, ist die Reinheitskontrolle durch direkte Äthanoleinspritzung in die chromatographische Kolonne wenig maßgebend. Äthanolproben, die unter diesen Bedingungen scheinbar entsprechen, können bei der Analyse der Gleichgewichtsphase

einen verhältnismäßig merklichen Gehalt an Verunreinigungen aufweisen. Es wird daher empfohlen, von jeder neuen Äthanolendung eine kleine Menge des Esterifizierungsgemisches, u. zw. ohne Innenstandard herzustellen und auf übliche Weise einen Blindversuch mit destilliertem Wasser durchzuführen. Zeigen sich auf der Aufzeichnung zwischen dem Startpunkt und der chromatographischen Äthanolwelle merkliche Pike von Fremdverbindungen, ist dies ein Zeichen, daß das Äthanol für den gegebenen Zweck nicht verwendbar ist.

Die Äthanolreinigung mittels Redestillation an der Kolonne ist wenig wirksam.

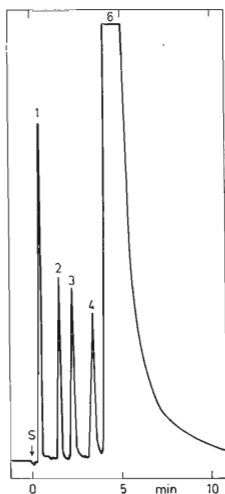


ABB. 2

Chromatogramm des Gemisches von niedrigmolekularen Fettsäuren

S Start der Analyse, 1 Äther, 2 Ameisensäureäthylester (ursprüngliche Säurekonzentration 125 µg/ml), 3 Essigsäureäthylester (250 µg/ml), 4 Propionsäureäthylester (250 µg/ml), 6 Äthanol.

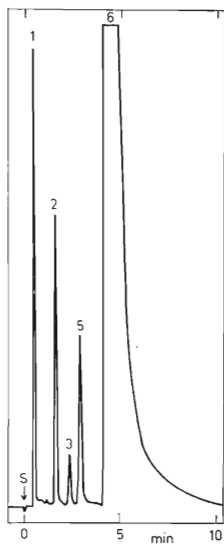


ABB. 3

Chromatogramm des normalen menschlichen Urins

S Start der Analyse, 1 Äther, 2 Ameisensäureäthylester, 3 Essigsäureäthylester, 5 Innenstandard (Methyläthylketon), 6 Äthanol.

Am besten geeignet ist das Verfahren, bei dem das Äthanol einige Stunden mit Dinotrophenylhydrazin und einer kleinen Menge Chlorwasserstoffsäure unter Rückflußkühlung gekocht und im Stickstoffstrom destilliert wurde. Nach Zugabe von festem Kaliumhydroxid zum Destillat wird wieder unter Rückflußkühlung gekocht und von neuem im Stickstoffstrom destilliert. Aber auch dieser Art der Reinigung kann keine Allgemeinverwendung zugesprochen werden, da diese bei einigen Äthanolendungen versagt; in einem solchen Fall muß Äthanol anderer Provenienz herangezogen werden.

Bei der Herstellung des Esterifizierungsgemisches, d.i. beim Mischen des Äthanol mit Schwefelsäure, entsteht stets eine gewisse Menge Diäthyläther, der sich an den chromatographischen Aufzeichnungen durch eine größere oder kleinere Welle äußert. Wiewohl diese Welle knapp nach dem Start auftritt und in keiner wie immer gearteten Form in den Bereich der Elutionszeiten der gesuchten Substanzen reicht, ist es zweckmäßig, die Menge des entstehenden Äthers auf das Mindestmaß zu beschränken. Dies kann durch langsame Schwefelsäurezugabe zum Äthanol, durch sorgfältiges Mischen und durch vollständiges Kühlen des Reaktionsgemisches erreicht werden. Äther bildet sich jedoch in kleiner Menge auch beim Temperieren der Probe mit dem Esterifizierungsgemisch; seine chromatographische Welle kann daher bei allen gewonnenen Chromatogrammen beobachtet werden.

Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Präzision der Bestimmung

Der Bereich der Eichkurve (bis 250 µg/ml) wurde so gewählt, daß die Bestimmung eines normalen und mäßig erhöhten Ameisensäureniveaus im Urin von Versuchspersonen und -tieren ermöglicht würde. Bei erhöhter Registrierempfindlichkeit können aber auch Proben in vielfacher Verdünnung mit Erfolg analysiert werden. So kann beispielsweise eine gut meßbare chromatographische Welle noch bei einer Konzentration von 1 p.p.m. Ameisensäure gewonnen werden. Zu Vergleichszwecken muß angeführt werden, daß mittels der bisher empfindlichsten Methode die chromatographische Bestimmung von minimal 40 p.p.m. freier Ameisensäure ermöglicht wurde². Die vorgeschlagene Methode ist demnach um das Vielfache empfindlicher.

Die Ameisensäurebestimmung wird durch keine normale oder zufällige Komponente des Urins gestört. Auch Änderungen in der Dichte der untersuchten Proben machen sich in keiner Weise geltend. Dies wurde so nachgewiesen, daß die wäßrigen Ameisensäurestandardlösungen vor der Verarbeitung durch Urin- oder Ammoniumsulfatzugabe präpariert wurden, wobei sich deren Dichten in Grenzen der Urindichten (1,002–1,040 g/ml) bewegten. Die Ergebnisse der veränderten und unveränderten Proben stimmen vollkommen überein.

Urinproben, die in der zugemessenen Zeit nicht verarbeitet werden können, müssen zur Verhütung mikrobieller Zersetzung im Kühlschrank aufbewahrt oder durch Schwefelsäurezugabe auf einen pH-Wert von 4–5 stabilisiert werden.

Die Methode wurde durch Analysen von Urinmengen, denen eine bekannte

Ameisensäuremenge in Grenzen von 25 bis 250 µg zugesetzt wurde, überprüft. Die gefundenen Werte stimmen nach Subtrahieren des ursprünglichen Ameisensäuregehaltes mit den zugegebenen Mengen sehr gut überein. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch zwanzigmal wiederholte Analyse ein und derselben Probe von normalem menschlichem Urin überprüft. Auf Grund der statistischen Verarbeitung wurde der Variationskoeffizient $V = 2,19\%$ gefunden. Das bei der Urinanalyse gewonnene Chromatogramm ist in Abb. 3 angeführt.

LITERATUR

1. Kaplanová B., Janák J.: *Mikrochim. Acta* 1966, 119.
2. Henkel H. G.: *J. Chromatog.* 58, 201 (1971).
3. Shelley R. N., Salwin H., Horwitz W.: *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* 46, 486 (1963).
4. Jackson R. B.: *J. Chromatog.* 16, 306 (1964).
5. Lee W. K., Bethea R. M.: *J. Gas Chromatog.* 6, 582 (1968).
6. Doelle H. W.: *J. Chromatog.* 39, 398 (1969).
7. Lanigan G. W., Jackson R. B.: *J. Chromatog.* 17, 238 (1965).
8. Gehrke C. W., Lamkin W. M.: *J. Agr. Food Chem.* 9, 85 (1961).
9. Smith B.: *Acta Chem. Scand.* 13, 480 (1959).
10. Hunter I. R., Hawkins N. G., Pence J. W.: *Anal. Chem.* 32, 1757 (1960).
11. McKinney R. W.: *J. Gas Chromatog.* 2, 108 (1964).
12. Mayberry W. R., Prochazka G. J.: *J. Gas Chromatog.* 3, 232 (1965).
13. Emery E. M., Koerner W. E.: *Anal. Chem.* 33, 140 (1961).
14. Baker R. A.: *J. Gas Chromatog.* 4, 418 (1966).
15. James A. T., Martin A. J. P.: *Biochem. J.* 50, 679 (1952).
16. Clarke J. R. P., Frederics K. M.: *J. Gas Chromatog.* 5, 99 (1967).
17. Metcalfe L. D., Schmitz A. A.: *Anal. Chem.* 33, 363 (1961).
18. Schlenk H., Gellerman J. L.: *Anal. Chem.* 32, 1412 (1960).
19. Oetto K., Ahrens E. H.: *Anal. Chem.* 33, 1847 (1961).
20. Appleby A. J., Mayne J. E. O.: *J. Gas Chromatog.* 5, 266 (1967).
21. Watson J. R., Crescuolo P.: *J. Chromatog.* 52, 63 (1970).
22. Umeh E. O.: *J. Chromatog.* 51, 139 (1970).
23. Goldbaum L. R., Schloegel E. L., Dominguez A. M.: *Progress in Chemical Toxicology*, Vol. 1. S. 36. Academic Press, New York, London 1963.
24. Goldbaum L. R., Domanski T. J., Schloegel E. L.: *J. Forensic Sci.* 9, 63 (1964).
25. Machata G.: *Mikrochim. Acta* 1964, 262.
26. Natelson S., Stellate R. L.: *Microchem. J.* 3, 245 (1965).
27. Basette R., Glendenning B. L.: *Microchem. J.* 13, 374 (1968).
28. Glendenning B. L., Harvey R. A.: *J. Forensic Sci.* 14, 136 (1969).
29. Luckey M. J.: *J. Forensic Sci.* 16, 120 (1971).
30. Basette R., Özeris S., Whitnah C. H.: *Anal. Chem.* 34, 1540 (1962).
31. Basette R., Özeris S., Whitnah C. H.: *J. Food Sci.* 28, 84 (1963).
32. Özeris S., Basette R.: *Anal. Chem.* 35, 1091 (1963).
33. Buttery R., Teranishi R.: *Anal. Chem.* 33, 1439 (1961).
34. Mackay D. A. M., Lang D. A., Berdick M.: *Anal. Chem.* 33, 1369 (1961).
35. Teranishi R., Buttery R. G., Lundin R. E.: *Anal. Chem.* 34, 1033 (1962).

Übersetzt von K. Grundfest.