

CHROM. 7071

PROGRAMMIERUNG VON DRUCK UND TEMPERATUR IN DER HOCH-DRUCK-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE

I. PROGRAMMIERUNG DES EINGANGSDRUCKES

HELMUT WIEDEMANN, HEINZ ENGELHARDT und ISTVÁN HALÁSZ

Angewandte Physikalische Chemie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken (B.R.D.)

SUMMARY

Programming of pressure and temperature in high-speed liquid chromatography. I. Programming of inlet pressure

A simple equipment for the generation of reproducible flow programs in high-speed liquid chromatography is described. The equipment is working fully automatically without moving parts except a swinging membrane. The application of the different flow programs is discussed. The possibilities of exponential flow programming are demonstrated with some separations.

EINLEITUNG

Zur Verkürzung der Analysenzeiten kann bei der Trennung von Gemischen immer dann sinnvoll eine der verschiedenen Programmieretechniken angewendet werden, wenn die stärker zurückgehaltenen Substanzen unnötig weit voneinander abgetrennt sind. In der Flüssigchromatographie (FC) kann die Analysenzeit auf verschiedene Weise reduziert werden: durch Programmierung der Zusammensetzung des Eluenten (Gradient-Elution); durch programmierte Erhöhung der Trenntemperatur (Temperaturprogrammierung), oder durch Programmierung des Eingangsdruckes (Strömungsprogrammierung). Wunschgemäß wird bei der Verkürzung der Analysenzeit die allzu grosse Auflösung der später eluierten Komponenten vermindert. Der allgemeinen Anwendung der Gradient-Elution stehen noch einige Probleme, u.a. auf der Detektorseite, im Wege. Daher wurden diese Untersuchungen zuerst auf die Programmierung des Eingangsdruckes und damit der Strömungsgeschwindigkeit des Eluenten und auf die Programmierung der Trenntemperatur beschränkt.

Die Programmierung der Strömungsgeschwindigkeit wurde in der Gaschromatographie (GC) zur Verkürzung der Analysenzeit häufig benutzt¹⁻⁴. Einfache pneumatische Regler ohne mechanisch bewegte Teile wurden für die Druckprogrammierung beschrieben, und die Wege zur Berechnung der Druckprogramme angegeben⁵. Es wurde gezeigt², dass die Retentionszeit in guter Näherung umgekehrt proportional dem Druckabfall bei sonst konstanten Trennbedingungen ist. Eine lineare

Erhöhung des Druckes und damit der Strömungsgeschwindigkeit führt daher zu einer linearen Verkürzung der Retentionszeit. Da die Retentionszeiten innerhalb einer homologen Reihe exponentiell zunehmen, sollte man zweckmässigerweise, um konstante Abstände der Peaks innerhalb einer homologen Reihe zu erhalten, exponentielle Druckprogramme durchführen. In der GC entspricht immer ein exponentielles Druckprogramm einem linearen Temperaturprogramm². Systematische Untersuchungen über Druckprogrammierung in der Hochdruck-FC liegen bis jetzt noch nicht vor, obwohl vereinzelt Analysen beschrieben wurden, bei denen während der Trennung die Strömungsgeschwindigkeit entweder diskontinuierlich⁶ oder kontinuierlich⁷ erhöht wurde. Zur programmierten Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit bieten sich in der Hochdruck-FC zwei prinzipiell verschiedene Möglichkeiten an: Entweder wird die Förderleistung der Pumpe kontinuierlich verändert, indem z.B. der Kolbenhub verstellt wird. Die mechanische Verstellung der Pumpenförderung ist bei Kolben- oder Membranpumpen jedoch aufwendig. Darüberhinaus können wegen der starken Abhängigkeit der Förderleistung vom Gegendruck Probleme mit der Reproduzierbarkeit des Druck- und Flussgradienten auftreten. Eine andere Möglichkeit der Druckprogrammierung erhält man bei der Verwendung eines für die FC adaptierten Reglers⁸, der in der GC für die Druckprogrammierung bereits verwendet wurde⁵. Bei konstanter (maximaler) Förderleistung der Pumpe wird, abhängig vom vorgegebenen Regeldruck, der Eluentenfluss zwischen Säule und Rückführung zum Vorratsgefäss aufgespaltet. Erhöht man kontinuierlich den Regeldruck, so verändert sich das Verhältnis der beiden Eluentenströme und es strömt ein kontinuierlich zunehmender Anteil durch die Trennsäule.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschliesslich die letztere Methode zur Druckprogrammierung verwendet, da dabei keinerlei mechanisch bewegten Teile benötigt werden.

EXPERIMENTELLES

Chromatographische Apparatur

Alle chromatographischen Messungen wurden an einer selbstgebauten Apparatur durchgeführt⁹. Als Pumpe wurde eine dreiköpfige Kolbenmembranpumpe (Orlita Typ M3S4/4, Orlita, Giessen, B.R.D.) verwendet. Zum Nachweis der Probestoffen wurde entweder ein Ultraviolett (UV)-Detektor [254 nm] alter Bauart¹⁰ oder ein Differentialrefraktometer (Typ R 401, Waters Ass., Framingham, Mass., U.S.A.) verwendet.

Vorrichtung zur Erzeugung des Druckprogramms

Das Prinzip und die Arbeitsweise des verwendeten Druckreglers wurde bereits ausführlich beschrieben⁸. Eine schematische Darstellung der verwendeten Regeleinrichtung und Vorrichtung zur Druckprogrammierung gibt Fig. 1 wieder.

Bei isobarem Betrieb wird ein bestimmter Gasdruck p_1 (z.B. Stickstoff) auf der Gasseite (Dom) des Reglers vorgegeben. Ist der Arbeitsdruck der Pumpe grösser als der vorgegebene Reglerdruck, so fliesst über den Regler Eluent in das Vorratsgefäss zurück. Der eingestellte Flüssigkeitsdruck entspricht dem Gasdruck p_1 , die Förderung durch die Trennsäule ist konstant, solange sich deren Permeabilität nicht ändert. Der Regler wirkt gleichzeitig als Dämpfungsglied und Sicherheitsventil.

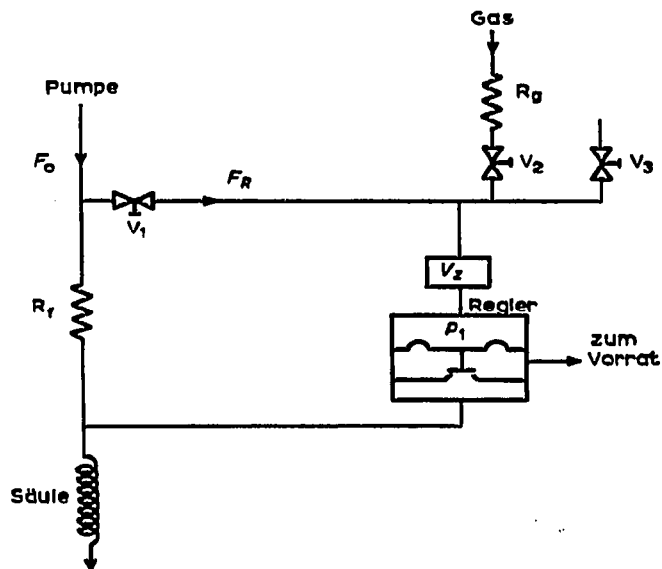


Fig. 1. Schematische Darstellung der Apparatur zur Druckprogrammierung. Erläuterungen im Text.

Darüberhinaus wird der Eluent wegen der grossen linearen Geschwindigkeit im Regelteil entgast.

Eine Möglichkeit zur kontinuierlichen Änderung des Druckes p_1 und damit zur programmierten Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit besteht darin, dass man Druckgas langsam in den Regler einströmen lässt (Programm I). Der Arbeitsdruck auf der Flüssigseite des Reglers baut sich entsprechend der Einströmgeschwindigkeit des Gases auf. Die Einströmgeschwindigkeit kann entweder über einen pneumatischen Widerstand, z.B. eine Kapillare mit 0.25 mm I.D. und bis zu 5 m Länge und (oder) ein Nadelventil (V_2) reguliert werden. Die Förderleistung der Pumpe ist dabei so zu bemessen, dass sie auch bei höchstem Druck noch ausreichend ist.

Eine andere Möglichkeit der Druckprogrammierung (Programm II) besteht darin, dass die im Regler eingeschlossene Gasmenge durch zuströmende flüssige mobile Phase komprimiert wird. Diese Art der Druckprogrammierung wird wie folgt durchgeführt: Bei geschlossenen Ventilen V_1 und V_3 fördert die Pumpe über den pneumatischen Widerstand R_x zu Trennsäule und Regler, auf dessen Gasseite der Druck p_1 herrscht. Abhängig von der geförderten Menge und der Grösse des Widerstandes R_x fällt der Druck um Δp über R_x ab. Damit herrscht an V_1 auf der Seite der Flüssigkeit ein um Δp höherer Druck als auf der anderen Seite des Widerstandes, wo der Druck p_1 herrscht, der auf der Gasseite des Reglers vorgegeben wurde. Öffnet man nun das Ventil V_1 (bei geschlossenem V_2 und V_3) so strömt flüssige mobile Phase (F_R) in den Gasraum ein und komprimiert das dort befindliche Gas. Der dadurch hervorgerufene Druckanstieg auf der Gasseite ruft einen entsprechenden Anstieg auf der Flüssigkeitsseite hervor.

Mit zunehmendem Flüssigkeitsdruck nimmt das Gasvolumen im Domteil ab. Ein Teil des Gases löst sich in der Flüssigkeit. Der maximale Gesamtdruck im Dom

muss so bemessen werden, dass ein zur Dämpfung ausreichendes Volumen Gas erhalten bleibt. Erhöht man das zum Domteil gehörige Gasvolumen V_z , so kann das Verhältnis Gesamtdruck zu vorgegebenen Gasdruck ebenfalls erhöht werden.

Als Widerstand R_f wurde eine 2 m lange Stahlkapillare mit 0.5 mm I.D. eingebaut. (Die dient später bei Temperaturprogrammierung auch als Wärmeaustauscher.) Um gute Reproduzierbarkeit zu erhalten, vor allem was Programmstart und -ende angeht, wurde als Ventil V_1 ein druckluftgesteuertes Auf-Zu-Ventil verwendet, das über handgeschaltete Magnetventile gesteuert wurde. Da die Programmcharakteristik auch vom zu komprimierenden Volumen abhängig ist, und der Gasraum des Reglers nur 50 ml beträgt, wurde ein zusätzliches Volumen V_z (Stahlrohr) von 100 ml Fassungsvermögen eingebaut. Das gesamte zur Verfügung stehende Kompressionsvolumen, einschliesslich der Zuleitungen betrug 170 ml. Dieses Volumen kann wesentlich verkleinert werden, wenn man es im drucklosen Zustand mit mobiler Phase auffüllt. Das System kann über Ventil V_3 entleert werden. Der Druck auf der Flüssigkeitsseite wurde über eine Druckmessdose (Druckmesswandler Typ PR 17-350, Intersonde, Watford, England) im Bereich 0–350 atü registriert.

DISKUSSION DER MESSERGEBNISSE

Programm I

Bei diesem Programm wird der Dom des Reglers ausschliesslich mit Gas gefüllt. Diese Methode der Druckprogrammierung wurde bereits ausführlich diskutiert⁵ und der Weg zur Vorausberechnung des Druckprogramms aufgezeigt. In Fig. 2

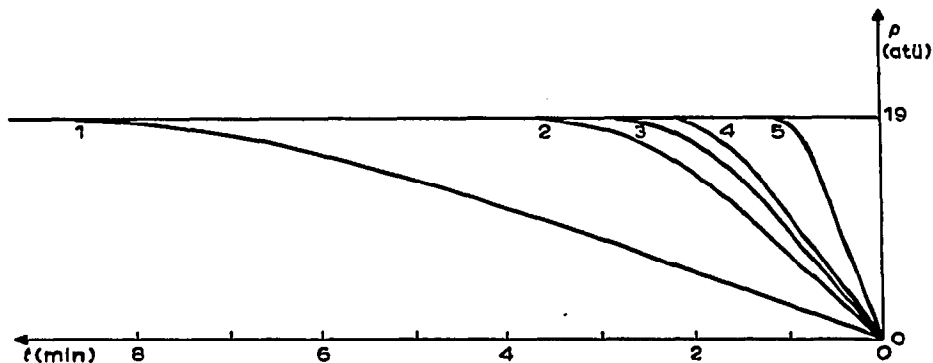


Fig. 2. Druckprogramm I. Veränderung der Programmdauer durch Variation des Einlasswiderstandes R_f und V_z .

sind verschiedene experimentelle Druckprogramme mit unterschiedlicher Einströmgeschwindigkeit des Druckgases gezeigt (Eluent *n*-Heptan). Die hier gezeigten Programme dauern zwischen 1 und 10 min, jedoch kann die Programmierzeit durch Variation des Einströmwiderstandes (R_f und V_z in Fig. 1) beliebig variiert werden. Die Kurven haben alle die Form einer Tangenshyperbolicusfunktion, mit einem relativ schnellen (nahezu linearen) Druckanstieg und einer langsamen Annäherung an den Endwert. Der obere Grenzwert des Druckes ist durch den verfügbaren Gasdruck bzw. durch die Förderleistung der Pumpe vorgegeben. Das Programm kann

theoretisch ab einem Druck von 0 atü begonnen werden. Der Programmablauf entspricht jedoch nicht dem geforderten exponentiellen Anstieg, der für die Programmierung gefordert wird, um bei der Elution von homologen Reihen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wie bei der Temperaturprogrammierung.

Programm II

Einen hyperbolischen Druckanstieg in Abhängigkeit von der Programmdauer erhält man mit Programm II, bei dem ein vorgegebenes Gasvolumen durch zuströmenden flüssigen Eluenten komprimiert wird. Mit diesem Programm kann praktisch bis zu beliebigen Enddrücken programmiert werden, wobei die oben diskutierten Grenzen nicht überschritten werden sollten. Erreichbarer Enddruck und Programmdauer hängen vom Ausgangsdruck p_1 , vom komprimierbaren Volumen V_z und von der maximalen Förderleistung der Pumpe F_0 ab.

In Fig. 3 ist den für verschiedene Fördermengen F_0 der Pumpe (36–48 ml/min) berechneten Kurven⁵ eine experimentelle Kurve (gestrichelte Linie) gegenübergestellt

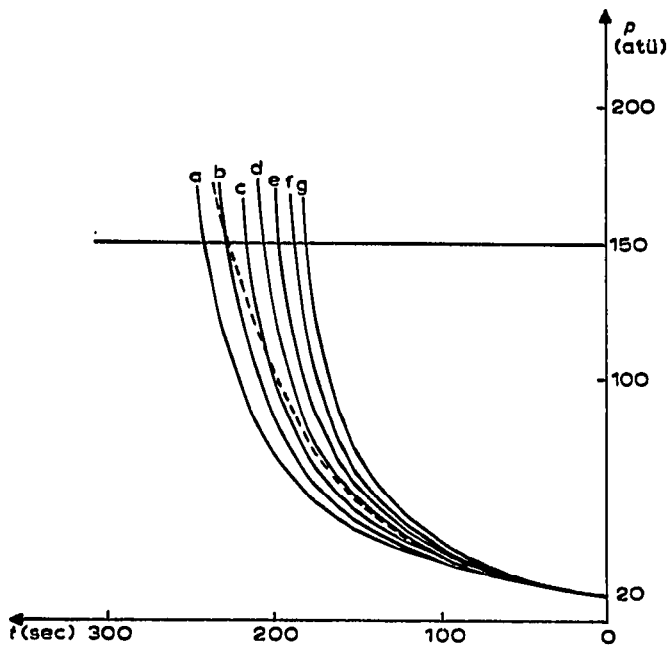


Fig. 3. Druckprogramm II. Vergleich berechneter Druck-Zeit-Kurven mit experimentell ermittelter Kurve (---). Gasvolumen $V = 170$ ml. Angenommenes Fördervolumen der Pumpe: (a) 36 ml/min; (b) 38 ml/min; (c) 40 ml/min; (d) 42 ml/min; (e) 44 ml/min; (f) 46 ml/min; (g) 48 ml/min.

Die Abweichung bei höheren Drücken ist auf die Abhängigkeit der Pumpenförderung vom Gegendruck zurückzuführen. Die Förderleistung der Pumpe von 47 ml/min ohne Gegendruck sinkt auf 34 ml/min bei einem Gegendruck von 150 atü. Dieser Abfall der Förderleistung, bedingt durch die endliche Einstellzeit und eventuelle Undichtigkeit der Ventile, hat zur Folge, dass die experimentell bestimmte Kurve stetig hin zu Kurven mit geringerer Förderleistung wandert: Daher sind die tatsächlichen Zeiten,

bei denen der gewünschte Enddruck erreicht wird, immer etwas grösser als die berechneten Zeiten. Die Abweichung der gemessenen von der errechneten Programm-dauer liegt aber in allen Fällen unter 5% des Sollwertes.

Bei einem gegebenen Druckverhältnis zwischen Anfangs- und Enddruck wird die Programmiergeschwindigkeit nur durch das Verhältnis der Förderleistung der Pumpe und dem komprimierbaren Gasvolumen V ($V_z + \text{Domvolumen}$) begrenzt. Der Ablauf der Druck-Zeit-Kurve kann durch Variation des pneumatischen Widerstandes des Regelventils V_1 verändert werden. Um dabei bessere Reproduzierbarkeit zu erreichen, kann man zwischen V_1 und V_z definierte, austauschbare Widerstände (Kapillarrohre) einbauen. Die Form der Kurve kann auch durch Veränderung des Volumens V_z beeinflusst werden.

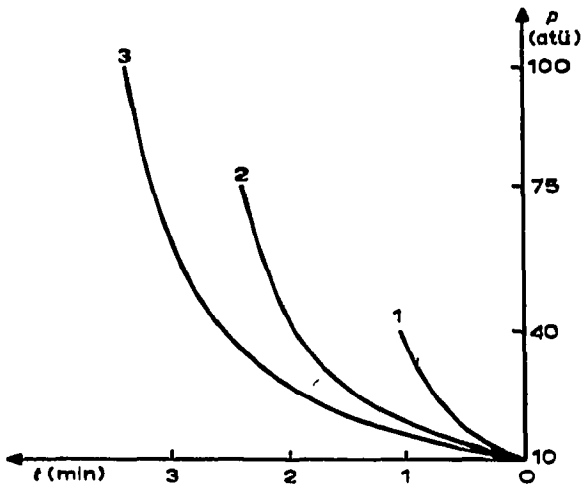


Fig. 4. Druckprogramm II. Einfluss des komprimierbaren Gasvolumens V ($= V + \text{Dom}$), (1) $V = 60$ ml; (2) $V = 110$ ml; (3) $V = 170$ ml.

In Fig. 4 ist die Druckänderung in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Gesamtvolumina ($V = V_z + \text{Domvolumen}$) gezeigt. Je kleiner dieses Volumen wird, desto schneller wird der Enddruck erreicht. Dabei wird allerdings auch der Druckbereich, der überstrichen werden kann, geringer, da nur noch ein geringeres Gasvolumen zur Kompression zur Verfügung steht.

Im Gegensatz zu Programm I kann bei Programm II der gegebene Gasdruck überschritten werden. Eine obere Grenze des Druckprogramms wird bei diesem Programm nur durch die Druckstabilität der Apparatur und durch die Eigenschaften der Pumpe bei hohen Drücken gesetzt. Der Anfangsdruck dieses Programms muss von 0 atü verschieden sein, da im Regler ein komprimierbares Gasvolumen vorhanden sein muss.

Stabilität der Detektoren

Erwartungsgemäss zeigt der UV-Detektor keinerlei Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit. Bei einem Rauschpegel von 1×10^{-3} Extinktionseinheiten waren bei allen Programmiergeschwindigkeiten keine Veränderungen der Nulllinie

(Drift) oder Erhöhung des Rauschens wahrnehmbar. Durchaus noch brauchbar ist das verwendete Differentialrefraktometer. Hier wurde bei hohen Drucksteigerungsraten von mehr als 6 at/min eine Drift der Nulllinie um $2 \cdot 10^{-6}$ Brechungsindexeinheiten pro Minute festgestellt. Bei niedrigeren Programmerraten kann auch das Differentialrefraktometer uneingeschränkt verwendet werden.

Anwendungen der Druckprogramme

Die Vor- und Nachteile der verschiedenen Programmierstechniken in der FC wurden bereits ausführlich diskutiert¹¹. An Hand von einigen Trennbeispielen soll hier demonstriert werden, wie die Strömungsprogrammierung zur Verkürzung der Analysenzeit verwendet werden kann. In Fig. 5 ist die Trennung isobar bei 10 atü

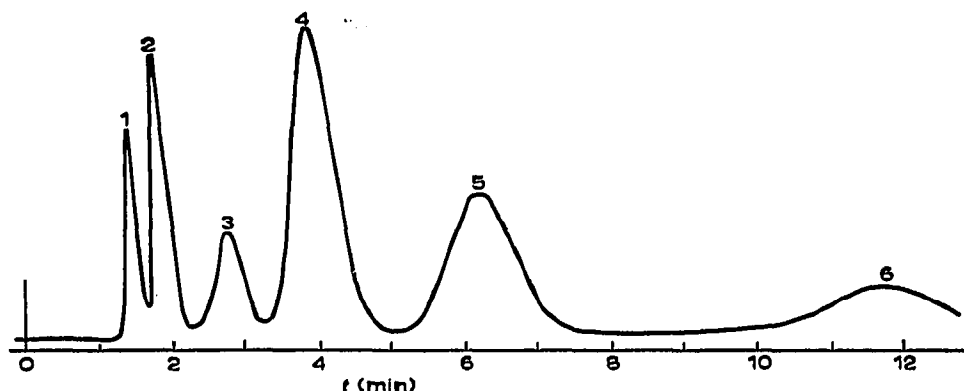


Fig. 5. Trennung von Aromaten (isocrat; $\Delta p = 10$ atü). Säule: 50 cm \times 2 mm I.D., Merckogel SI 200, $d_p = 30\text{--}40 \mu$; *n*-Heptan; $T = 22^\circ$; spezifische Permeabilität, $K = 0.7 \cdot 10^{-8}$ cm²; $u = 0.55$ cm/sec; $F = 0.9$ ml/min. 1 = Tetrachloräthylen ($k' = 0$); 2 = Brombenzol (0.3); 3 = Naphthalin (0.9); 4 = Anthracen (1.65); 5 = Brasan (3.2); 6 = *a,h*-Dibenzanthracen (6.8).

Druckabfall ($F = 0.9$ ml/min; Strömungsgeschwindigkeit $u = 0.55$ cm/sec) durchgeführt. Die Trennung der Peaks mit kurzen Retentionszeiten ist optimal, während der letzte Peak zu weit abgetrennt ist. Die Analyse ist nach etwa 14 min beendet. Führt man die gleiche Trennung isobar bei höherer Flussgeschwindigkeit (8.3 ml/min) durch (Fig. 6), so wird wohl der letzte Peak in akzeptabler Zeit eluiert, die Peaks mit niedrigen Kapazitätsverhältnissen (k' -Werten) aber werden nicht mehr getrennt.

Lässt man während der Trennung den Druck exponentiell zwischen 10 und 100 atü nach Programm II ansteigen, so erhält man eine schnelle und gute Trennung der Substanzen mit niedrigen k' -Werten und eine optimale Trennung der später eluierten Peaks (Fig. 7). Die Analyse ist in etwa 4 min beendet.

Die Trennung von Pestiziden lässt sich ebenfalls durch Druckprogrammierung optimieren. In Fig. 8 ist die isobare Trennung bei drei verschiedenen Drücken von 10 atü ($F = 0.5$ ml/min; $u = 0.35$ cm/sec), 25 atü ($F = 1.4$ ml/min) und 50 atü ($F = 2.7$ ml/min) gezeigt. Keine der Trennungen ist optimal. Bei der Analyse bei niedrigstem Druck (Fig. 8, Kurve I) ist die Auflösung der ersten vier Peaks optimal, Peak 5 wird hier sehr spät eluiert. Bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten verringert sich wohl seine Retentionszeit; dafür verschlechtert sich aber die Trennung der zuerst eluierten

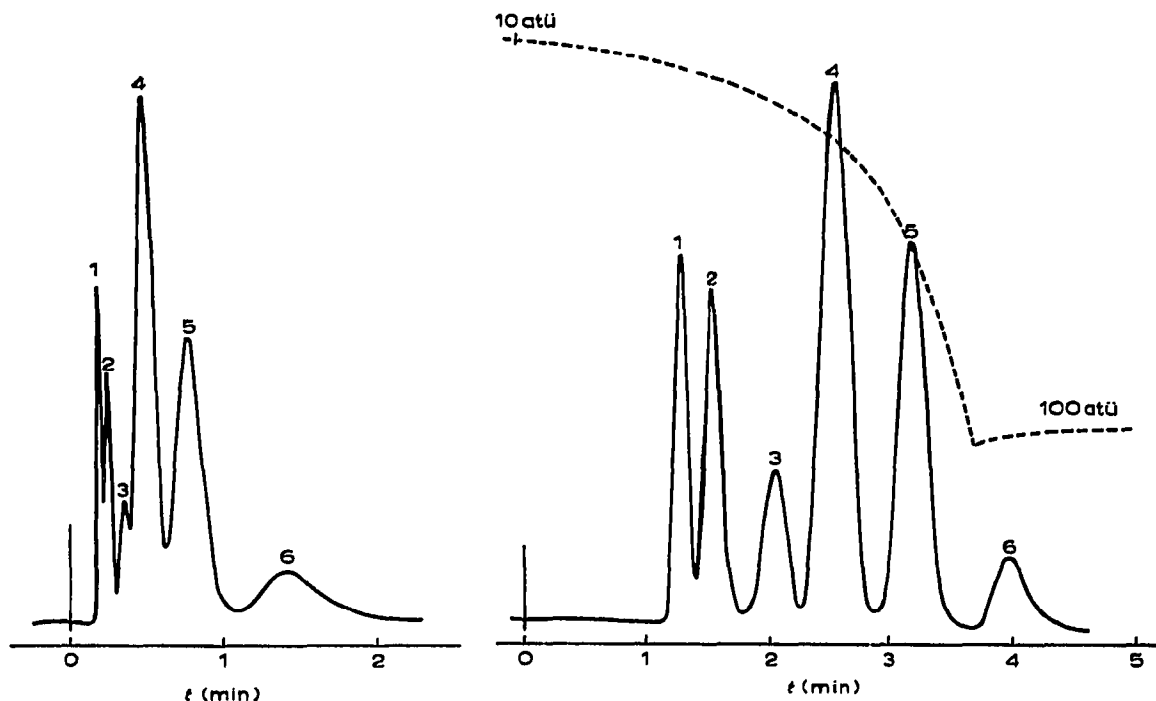


Fig. 6. Trennung von Aromaten (isocrat: $\Delta p = 100$ atü). Gleiche Bedingungen wie bei Fig. 5 ausser $u = 4.6$ cm/sec und $F = 8.3$ ml/min.

Fig. 7. Trennung von Aromaten. Druckprogramm II: $\Delta p = 10 \rightarrow 100$ atü; sonst gleiche Bedingungen wie in Fig. 5 und 6.

Peaks. Eine optimale Analyse (etwa gleich gute Auflösung aller Peaks) erhält man in diesem Falle auch nur mit druckprogrammierter Analyse mit exponentiellem Druckanstieg (Fig. 9).

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die hier angegebenen Beispiele zeigen deutlich, wann eine druckprogrammierte Analyse sinnvoll durchgeführt werden sollte. Immer dann, wenn die Unterschiede in den Retentionszeiten in einem Chromatogramm exponentiell zunehmen, d.h. die Auflösung zweier benachbarter Peaks zu gross wird, dann kann zur Verkürzung der Analysenzeit ein exponentielles Druckprogramm angewendet werden. Dieser Programmtyp ist jedoch nicht immer wünschenswert, vor allem dann nicht, wenn nicht die Glieder einer homologen Reihe getrennt werden sollen. Wie beschrieben, kann man dann die Form der Druck-Zeit-Kurve mit der Variation des Volumens V_z einerseits und des Strömungswiderstandes an V_1 andererseits weitgehend beeinflussen.

Ein weiterer Vorteil der Druckprogrammierung ist dadurch gegeben, dass nach Beendigung der Analyse durch Entspannen schnell (in einigen Sekunden) der Ausgangszustand wieder hergestellt werden kann. Darüberhinaus kann man das Programm sehr einfach beliebig unterbrechen, bzw. durch Öffnen des Ventils V_3 auch zwischenzeitlich ein negatives Druckprogramm erzeugen. Nach Schliessung des

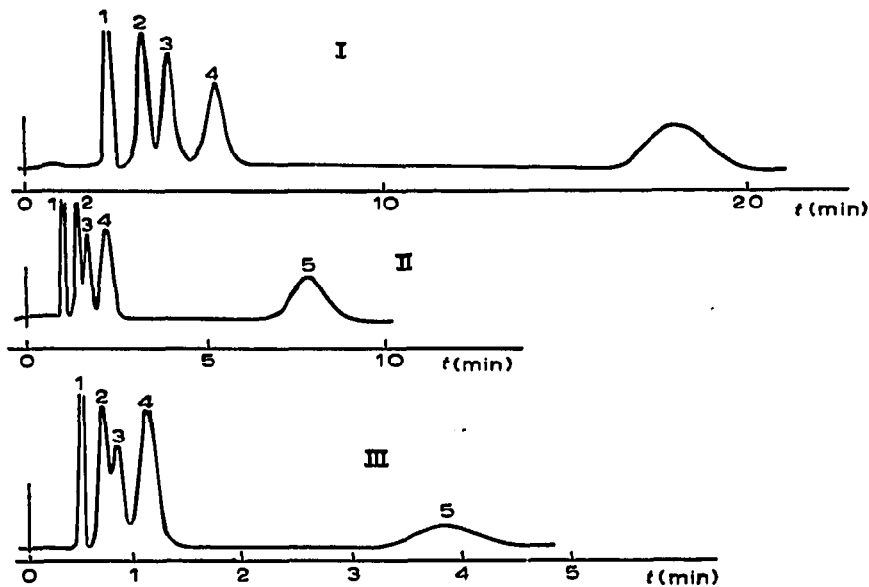


Fig. 8. Trennung von Insektiziden (isocrat). Säule: 50 cm × 2 mm I.D., Merckogel SI 200, $d_p = 25\text{--}32 \mu$; *n*-Heptan; $T = 22^\circ$; $K = 0.7 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2$. (I) $\Delta p = 10 \text{ atü}$; $u = 0.35 \text{ cm/sec}$; $F = 0.5 \text{ ml/min}$; (II) $\Delta p = 25 \text{ atü}$; $u = 0.88 \text{ cm/sec}$; $F = 1.4 \text{ ml/min}$; (III) $\Delta p = 50 \text{ atü}$; $u = 1.75 \text{ cm/sec}$; $F = 2.7 \text{ ml/min}$. 1 = Tetrachloräthylen ($k' = 0$); 2 = Aldrin (0.4); 3 = Heptachlor (0.7); 4 = DDT (1.3); 5 = Lindan.

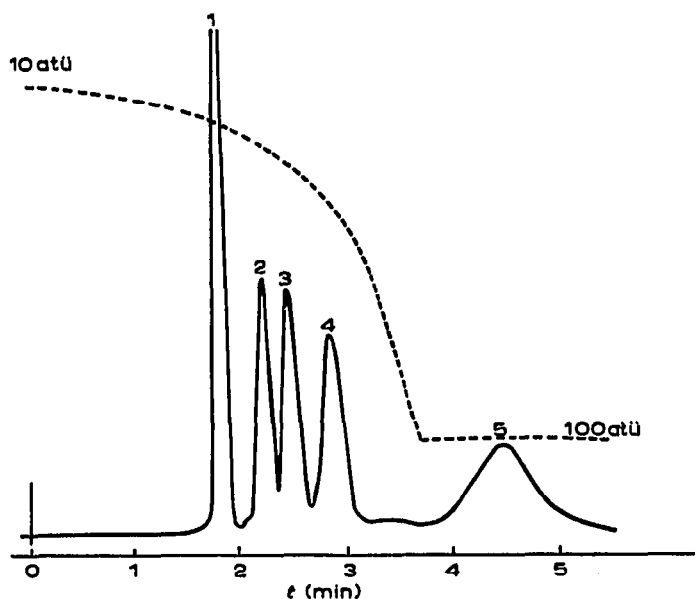


Fig. 9. Trennung von Insektiziden. Druckprogramm II: $\Delta p: 10 \rightarrow 100 \text{ atü}$; sonst gleiche Bedingungen wie in Fig. 8.

Ventils V_3 kann das Druckanstiegsprogramm wieder weitergeführt werden. Daher kann das Programm sehr einfach an das jeweilige Trennproblem angepasst werden.

An die stationäre Phase und an die Trennsäule werden keine speziellen Anforderungen gestellt. Nur sollte der Anstieg der $h = f(u)$ Kurve (C-Term) womöglich gering sein. Die Angabe von h -Werten für das Druckprogramm ist selbstverständlich sinnlos, da h -Werte nur für konstante lineare Geschwindigkeiten definiert sind.

Die Auflösung wird, wie bei jeder programmierten Analyse allerdings immer schlechter, dagegen wird die Analysenzeit optimiert. Die Probebestandteile werden allerdings in viel schärferen und konzentrierteren Zonen eluiert. Dadurch steigt die Nachweisempfindlichkeit für die später eluierten Peaks an, was besonders dann von Vorteil ist, wenn die Detektorempfindlichkeit gering ist.

DANK

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 52, Analytik, Saarbrücken.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine einfache Apparatur zur Erzeugung reproduzierbarer Druckprogramme für die Hochdruck-Flüssigchromatographie wird beschrieben. Die Einheit arbeitet vollautomatisch und enthält ausser einer schwingenden Membran keinerlei bewegte Teile. Die Anwendung der verschiedenen Druckprogramme wird diskutiert, und an Hand einiger Beispiele werden die Vorteile des exponentiellen Druckprogramms demonstriert.

LITERATUR

- 1 A. Zlatkis, D. C. Fenimore, L. S. Ettre und J. E. Purcell, *J. Gas Chromatogr.*, 3 (1965) 75.
- 2 I. Halász und F. Holdinghausen, *J. Gas Chromatogr.*, 5 (1967) 385.
- 3 R. P. W. Scott, in J. H. Purnell (Herausgeber), *Progress in Gas Chromatography*, Interscience, New York, 1968, S. 271ff.
- 4 C. J. Wolff und J. Q. Walker, *Intern. Lab.*, July/August, 1971.
- 5 I. Halász und G. Deininger, *Z. Anal. Chem.*, 228 (1967) 321.
- 6 R. P. W. Scott und J. G. Lawrence, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 65.
- 7 R. E. Majors, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 755.
- 8 G. Deininger und I. Halász, *J. Chromatogr.*, 60 (1971) 65.
- 9 G. Deininger und I. Halász, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 83.
- 10 A. Kroneisen, *Dissertation*, Universität Frankfurt/Main, 1969.
- 11 L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 692.