

CHROM. 8358

GASCHROMATOGRAPHIE ACYLIERTER α -HYDROXYPHOSPHON-SÄUREESTER

SPURENANALYSE ALIPHATISCHER CARBONSÄUREN MIT DEM PHOSPHORDETEKTOR

PAUL SCHULZ und RADU VÎLCEANU

Centrul de Chimie Timișoara, Timișoara (Rumänien)

(Eingegangen am 11. März 1975)

SUMMARY

Gas chromatography of acylated α -hydroxy-phosphonate esters. Trace analysis of aliphatic carboxylic acids with the thermionic detector

By a new analytic procedure, traces of carboxylic acids are converted into phosphorus-containing derivatives, using their esterification with α -hydroxy-phosphonic acid esters. The derivatisation occurs under mild conditions in the presence of dicyclohexyl carbodiimide, resulting in compounds with good elution properties. By a multi-valve switching system, the reagent excess is vented before entering the main analytical column. Using the alkaline flame ionization detector, carboxylic acids can be detected according to this technique in the low picogram range.

EINLEITUNG

Die Entwicklung elementspezifischer Detektoren für die Gaschromatographie hat die selektive Erfassung extrem kleiner Substanzmengen ermöglicht. Die Bedeutung, die diese Detektoren (z.B. der Alkaliflammenionisationsdetektor (AFID), der Elektronenanlagerungsdetektor (ECD) und der flammenphotometrische Detektor (FPD)) in der Erfassung von Pestizidrückständen erlangt haben, ist bekannt.

Die ausserordentlich hohe Empfindlichkeit des AFID gegenüber phosphorhaltigen gaschromatographischen Fraktionen legt die Möglichkeit nahe, verschiedene Stoffklassen über eine vorangehende Phosphor-Derivatisierung im Bereich kleinster Konzentrationen nachzuweisen.

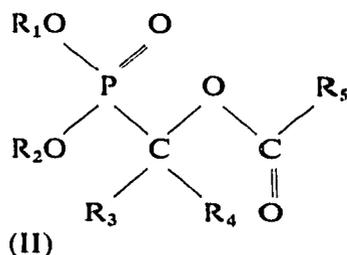
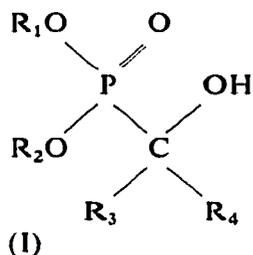
Es sind daher phosphorhaltige Reagenzien erforderlich, die sich mit Alkoholen, Aminen, Carbonsäuren usw. rasch und quantitativ ohne Nebenreaktionen umsetzen und Derivate mit günstigen gaschromatographischen Eigenschaften ergeben. Der Umstand, dass viele Reaktionen in der organischen Phosphorchemie mit geringen Ausbeuten verlaufen bzw. thermisch unbeständige Produkte ergeben, erschwert diese Aufgabe.

Nach einem von uns beschriebenen Verfahren werden Alkoholspuren mit den synthetisch leicht zugänglichen 2-Chlor-1,3,2-dioxaphospholanen und den 2-Chlor-1,3,2-dioxaphosphorinanen in gaschromatographisch gut erfassbare Derivate umgesetzt¹.

Die Umwandlung von Oestron in den entsprechenden Dimethylphosphinsäureester mittels Dimethylamino-dimethylphosphin zum gaschromatographischen Nachweis von Oestronspuren wurde von Vogt *et al.* beschrieben².

Nach Heenan und McCallum³ werden Phenole mit Phosphorigsäure-diesterchloriden derivatisiert. Die anfallenden phosphorhaltigen Spezies werden anschließend mit dem FPD erfasst.

Die guten gaschromatographischen Eigenschaften acylierter O,O'-Dialkyl- α -hydroxyphosphonsäureester (AHPE) (II) veranlassten eine Untersuchung der Veresterung gesättigter geradkettiger Fettsäuren mit α -Hydroxyphosphonsäureestern, (HPE) (I). Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll nun berichtet werden.



Infolge des ungünstigen Elutionsverhaltens (Schweifbildung, Zersetzungen, usw.) erfordern Carbonsäuren oft spezielle gaschromatographische Trennverfahren^{4,5}. Freie Carbonsäuren werden an Spezialfüllungen getrennt^{6,7}. Zahlreiche Autoren haben Derivatbildungsverfahren beschrieben. Die dabei entstehenden Abkömmlinge haben bessere Elutionseigenschaften (z.B. die Methylester⁸⁻¹⁰) bzw. niedrigere Nachweisgrenzen, (z.B. die Benzylester^{11,12} und die Trichloräthylester¹³).

Aufgrund unserer Problemstellung mussten bei der Aufbereitung biologischer Proben anfallende freie Fettsäuren in nahezu quantitativer Reaktion in die entsprechenden AHPE umgewandelt werden. Veresterungsverfahren unter energischen Bedingungen schieden infolge möglicher Nebenreaktionen im Phosphonsäureesterrest von vornherein aus.

Die unter milden Bedingungen ablaufende Veresterung von Carbonsäuren mit Alkoholen in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)¹⁴⁻¹⁶ ist von Felder *et al.*¹⁷ in der Gaschromatographie eingesetzt worden. Im Falle primärer und sekundärer Alkohole hat sich dieses Verfahren als vorteilhaft erwiesen. Ein Reaktionsmechanismus wurde von Smith *et al.* vorgeschlagen¹⁸.

Auch im Falle primärer und sekundärer HPE ist eine rasche und vollständige Veresterung freier Fettsäuren unter DCC-Zusatz möglich.

EXPERIMENTELLES

Gaschromatographie

Folgende Säulen kamen zum Einsatz: (A) 1 m \times 5 mm rostfreier Stahl, 15%

Apiezon L auf Chromosorb W (silanisiert), 60–80 mesh; (B) 1 m \times 5 mm rostfreier Stahl, 10 % Carbowax 20M auf Chromosorb W (silanisiert), 60–80 mesh; (C) 1 m \times 5 mm rostfreier Stahl, 5 % Neopentylglykolsuccinat (NPGS) auf Chromosorb W (silanisiert), 60–80 mesh; (D) 0.5 m \times 5 mm rostfreier Stahl, 7.5 % OV-7 auf Gas Chrom Q, 80–100 mesh; (E) 1 m \times 5 mm rostfreier Stahl, 7.5 % OV-7 auf Gas-Chrom Q, 80–100 mesh. Alle Säulenfüllungen wurden im Vakuum-Rotationsverdampfer hergestellt.

Der eingesetzte Gaschromatograph war ein Fractovap 2400 V von Carlo Erba (Mailand, Italien). Die verwendeten Detektoren waren: Der Flammenionisationsdetektor (FID) und der "parallel flame thermionic detector" (PFTD) von Carlo Erba, ein kombinierter FID–AFID. Trägergas war in allen Fällen reiner Stickstoff. Das pneumatisch gesteuerte Membranventil Bimatic war ebenfalls von Carlo Erba.

Reagenzien

Benzol (über Natrium getrocknet), Pyridin und die Fettsäurestandarde (Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure, Önanthsäure und Caprylsäure) waren analysenrein. Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC) "zur Synthese" (Merck, Darmstadt, B.R.D.) wurde keiner weiteren Reinigung unterworfen.

Die HPE wurden nach bekannten Verfahren, durch Kondensation von Dialkylphosphiten (Dimethyl-, Diäthyl- und Methyläthylphosphit) mit Carbonylverbindungen (Formaldehyd, Acetaldehyd, Aceton und Methyläthylketon) dargestellt^{19,20}. Die HPE mit tertiärer Hydroxylgruppe wurden durch mehrfaches Umlösen aus Benzol, die primären und sekundären durch fraktionierte Vakuumdestillation gereinigt. Durch Umesterungen der Hydroxylgruppe der HPE im Destillierkolben bilden sich Polyesterstrukturen, und der Destillationsrückstand erstarrt als glasartige Masse. Die Ausbeuten an reinen primären und sekundären HPE betragen daher nur etwa 30–50%.

Optimiertes Derivatisierungsverfahren

Zur Derivatisierung wurden die folgenden Reagenzien verwendet. Reagens 1:

TABELLE I

RETENTIONSINDIZES DER α -HYDROXYPHOSPHONSÄUREESTER (I)

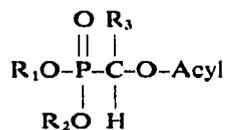
Flüssigphase: Apiezon L (Säule A); Temperatur: 140°. Me = Methyl; Et = Äthyl.

R_1	R_2	R_3	R_4	Retentionsindex
Me	Me	H	H	1099
Et	Me	H	H	1152
Et	Et	H	H	1200
Me	Me	Me	H	1097
Et	Me	Me	H	1142
Et	Et	Me	H	1183
Me	Me	Me	Me	1024
Et	Me	Me	Me	1076
Et	Et	Me	Me	1129
Me	Me	Et	Me	1146
Et	Me	Et	Me	1179
Et	Et	Et	Me	1225

TABELLE II

RETENTIONSINDIZES DER MIT α -HYDROXYPHOSPHONATEN VERESTERTEN ALIPHATISCHEN CARBONSÄUREN

Säulen A, B und C. Me = Methyl; Et = Äthyl.



Carbonsäure	R ₁	R ₂	R ₃	Retentionsindizes		
				Apiezon L (160°)	Carbowax 20M (150°)	NPGS (163°)
Essigsäure	Me	Me	H	1103	1680	1982
	Et	Me	H	1153	1695	2000
	Et	Et	H	1200	1713	2018
	Me	Me	Me	1100	1624	1916
	Et	Me	Me	1148	1645	1935
	Et	Et	Me	1195	1670	1955
Propionsäure	Me	Me	H	1195	1730	2023
	Et	Me	H	1243	1747	2046
	Et	Et	H	1291	1768	2065
	Me	Me	Me	1190	1675	1960
	Et	Me	Me	1238	1698	1985
	Et	Et	Me	1285	1721	2002
Buttersäure	Me	Me	H	1281	1793	2090
	Et	Me	H	1327	1815	2113
	Et	Et	H	1374	1838	2134
	Me	Me	Me	1277	1745	2025
	Et	Me	Me	1323	1768	2048
	Et	Et	Me	1364	1790	2063
Valeriansäure	Me	Me	H	1377	1877	2166
	Et	Me	H	1412	1896	2185
	Et	Et	H	1460	1920	2207
	Me	Me	Me	1367	1830	2102
	Et	Me	Me	1410	1851	2126
	Et	Et	Me	1455	1872	2148
Capronsäure	Me	Me	H	1463	1968	2246
	Et	Me	H	1500	1986	2265
	Et	Et	H	1557	2014	2295
	Me	Me	Me	1456	1915	2185
	Et	Me	Me	1499	1940	2208
	Et	Et	Me	1545	1965	2226
Önanthsäure	Me	Me	H	1556	—	—
	Et	Me	H	1592	—	—
	Et	Et	H	1642	—	—
	Me	Me	Me	1544	—	—
	Et	Me	Me	1584	—	—
	Et	Et	Me	1630	—	—
Caprylsäure	Me	Me	H	1647	—	—
	Et	Me	H	1686	—	—
	Et	Et	H	1732	—	—
	Me	Me	Me	1632	—	—
	Et	Me	Me	1673	—	—
	Et	Et	Me	1714	—	—

reiner HPE (I; $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = R_4 = \text{H}$). Reagens 2: 25.0 g DCC und 12.5 g Pyridin werden in einen 100-ml Messkolben eingetragen und trockenes Benzol bis 100 ml nachgefüllt; unter Schütteln wird das DCC gelöst.

In ein 1-ml Schliffröhrchen werden zuerst 100 μl Benzollösung mit Fettsäurespuren eindosiert, darauf 150 μl Reagens 2 und 50 μl Reagens 1. Die Reaktionsmasse wird kräftig durchgeschüttelt. Nach einstündigem Lagern bei 50° ist die Reaktion praktisch beendet, und die Lösung kann nach Abkühlung auf Zimmertemperatur injiziert werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die gaschromatographische Erfassung der AHPE im Spurenbereich, in Gegenwart überschüssiger HPE setzt einen genügenden Elutionsabstand der Spurenkomponenten vom Reagensüberschusspeak voraus. Ein Vergleich der entsprechenden Retentionsindizes (Tabellen I und II) zeigt, dass die mit Essigsäure und Propionsäure acylierten HPE den sich in diesem Falle in der Praxis als notwendig erweisenden Elutionsabstand von mindestens 150 Retentionsindexeinheiten unterschreiten. Die Derivate der Buttersäure können hingegen im allgemeinen schon gut erfasst werden. Die höheren Homologen eignen sich in steigendem Masse für eine genaue spurenanalytische Erfassung.

Die synthetisierten HPE lassen sich an allen eingesetzten Säulen nur unter teilweiser Zersetzung eluieren. Eine Bestimmung von Retentionsindizes an Säule A war

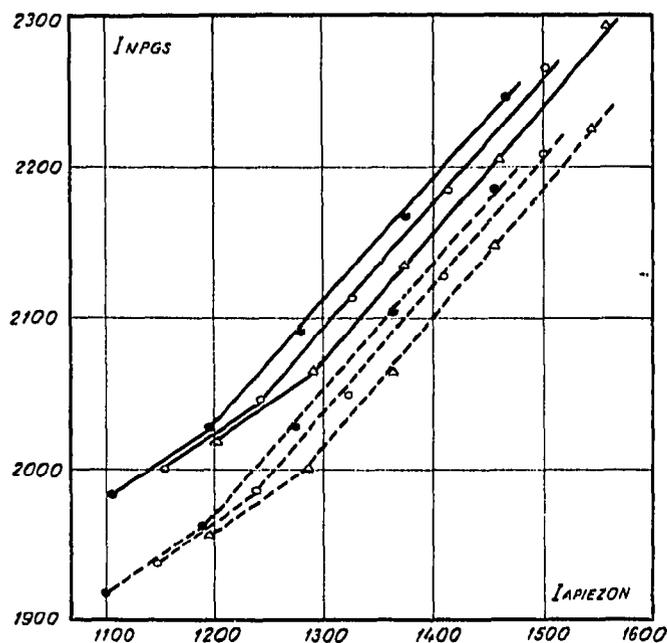


Fig. 1. Zusammenhang zwischen den Retentionsindizes der AHPE an Apiezon L (Säule A, 160°) und NPGS (Säule C, 163°). —, $R_3 = \text{H}$; - - -, $R_3 = \text{CH}_3$; ●, $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$; ○, $R_1 = \text{CH}_3$ und $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$; △, $R_1 = R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$.

nur nach vorangehender Inaktivierung mit Hexamethyl-disilazan möglich (Tabelle I). Im Gegensatz dazu verfügen die AHPE (Tabelle II) über gute Elutionseigenschaften. Fig. 1 zeigt die Retentionszusammenhänge der dargestellten sechs homologen Esterreihen an zwei Flüssigphasen verschiedener Polarität (Säulen A und C).

Zur Optimierung des Derivatisierungsverfahrens war eine Wahl des als Derivatisierungsreagens vorteilhaftesten HPE erforderlich. Unsymmetrische HPE (Tabelle I, Methyl-äthyl-derivate) schieden *a priori* infolge der Schwierigkeit, sie in reinem Zustand, d.h. frei von symmetrischen Estern darzustellen, aus. Die Dimethyl- und die Diäthylester (I) eignen sich hingegen gleich gut. Höhere symmetrische Ester sind wegen stark erhöhter Retention nur bedingt zu empfehlen. Für unsere weiteren Untersuchungen haben wir die Dimethylester eingesetzt (I; $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$).

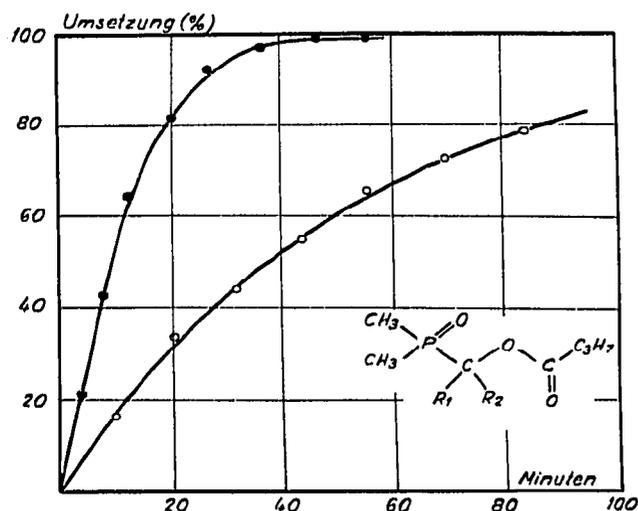


Fig. 2. Veresterung primärer und sekundärer HPE mit Buttersäure bei 50°. 1 ml 0,5% Buttersäurelösung in Benzol wird mit 1,5 ml Reagens 2 und 0,5 ml reinem HPE umgesetzt. ●—●, $R_1 = R_2 = \text{H}$; ○—○, $R_1 = \text{H}$ und $R_2 = \text{CH}_3$.

Fig. 2 zeigt die Veresterung des primären HPE (Dimethylester) im Vergleich zum sekundären. Die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt vom primären zum sekundären HPE weitgehend ab. Tertiäre HPE werden unter den von uns gewählten Bedingungen praktisch nicht verestert. Als Derivatisierungsreagens 1 haben wir daher weiterhin nur den Dimethylester mit primärer Hydroxylgruppe (I; $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = R_4 = \text{H}$) verwendet.

Die Beschleunigung der Veresterungen in Gegenwart von DCC durch Pyridin ist bekannt¹⁷. In unserem Falle war die optimale Höhe des Pyridinzusatzes zu bestimmen. Fig. 3 zeigt den Reaktionsablauf ohne Pyridin, bzw. unter dem Einfluss steigender Pyridinmengen. Die langsame Veresterung ohne Pyridinkatalysator wird schon durch geringe Zusätze Pyridin auffallend beschleunigt. Wesentliche Erhöhungen der Katalysatormenge führen zu keiner verhältnismässigen Verkürzung der Reaktionsdauer. Ein Pyridinzusatz von 12,5 g zu Reagens 2 erwies sich als kinetisch noch vorteilhaft.

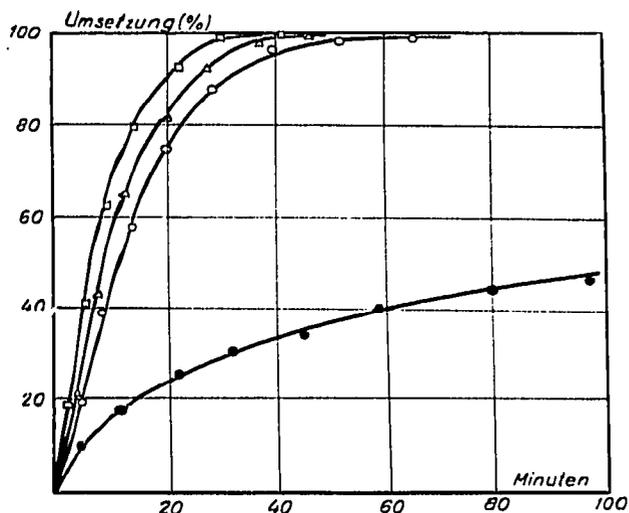


Fig. 3. Der Einfluss des Pyridinzusatzes auf die Derivatisierung von Buttersäure bei 50° unter Standardbedingungen mit I; $R_1 = R_2 = CH_3$, $R_3 = R_4 = H$. Reagens 2 enthält ausser DCC: ●—●, kein Pyridin; ○—○, 5.0 g Pyridin pro 100 ml; △—△, 12.5 g Pyridin pro 100 ml.

Den Temperatureinfluss auf die Derivatisierungsgeschwindigkeit veranschaulicht Fig. 4. Soll die Umsetzung in weniger als einer Stunde erfolgen, ist für die untersuchte Carbonsäurereihe eine Reaktionstemperatur von 50° erforderlich.

Für die kinetischen Untersuchungen wurden in einem thermostatisierten 5-ml Mantelgefäss mit Magnetührung 1 ml Carbonsäurestandard (0.5% Buttersäure in

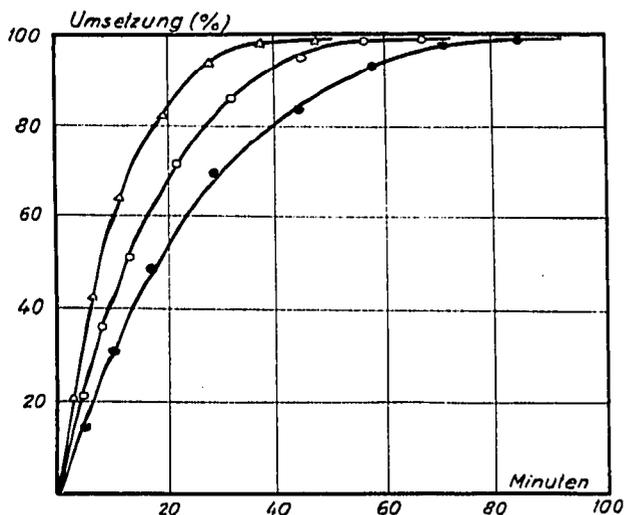


Fig. 4. Einfluss der Temperatur auf die Derivatisierung von Buttersäure unter Standardbedingungen mit I; $R_1 = R_2 = CH_3$, $R_3 = R_4 = H$. Derivatisierungstemperatur: ●—●, 25°; ○—○, 37.5°; △—△, 50°.

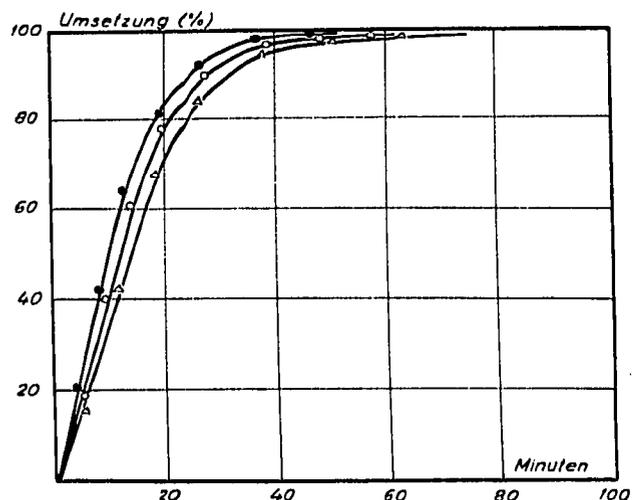


Fig. 5. Einfluss des Alkylrestes auf die Derivatisierung der linearen aliphatischen Carbonsäuren bei 50°, unter Standardbedingungen mit I; $R_1 = R_2 = CH_3$, $R_3 = R_4 = H$. ●—●, Buttersäure; ○—○, Capronsäure; △—△, Caprylsäure.

Benzol) mit 1.5 ml Reagens 2 und 0.5 ml Reagens 1 umgesetzt. Das intensiv gerührte Reaktionsgemisch wurde in Zeitabständen von 5–10 Min gaschromatographisch analysiert, unter Einsatz des FIDs und an Säule A.

Die vergleichende Veresterung von Butter-, Capron- und Caprylsäure unter Standardbedingungen (Fig. 5) zeigt eine relativ geringe Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit wachsendem Alkylrest. Innerhalb einer Derivatisierungsdauer von 60 Min ist bei 50° auch die Caprylsäure vollständig verestert.

Fig. 6 zeigt die Erfassung einiger Carbonsäuren der untersuchten Reihe. Die durchschnittliche Menge pro Injektion betrug 2 ng. Der Nulllinienverlauf nach dem Reagensüberschusspeak gestattet noch eine befriedigende quantitative Auswertung.

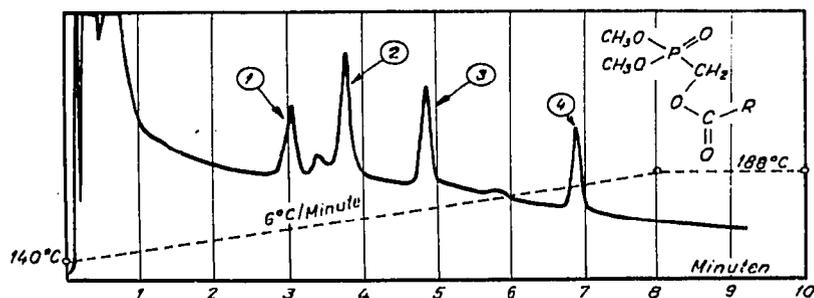


Fig. 6. Erfassung der Carbonsäurespuren als AHPE. Die Derivatisierung erfolgte nach dem Standardverfahren bei 50° mit I; $R_1 = R_2 = CH_3$, $R_3 = R_4 = H$. Die injizierte Derivatmengen entsprechen ca. 1 ng Buttersäure (1), Valeriansäure (2), Capronsäure (3) bzw. Caprylsäure (4). Temperaturprogrammierte Trennung an Säule E. Trägergas: Stickstoff, 85 ml/min. Detektor: KCl-PFTD, Wasserstoff 65 ml/min, Luft 440 ml/min. Temperaturverlauf eingezeichnet; Injektion und Detektion bei 200°.

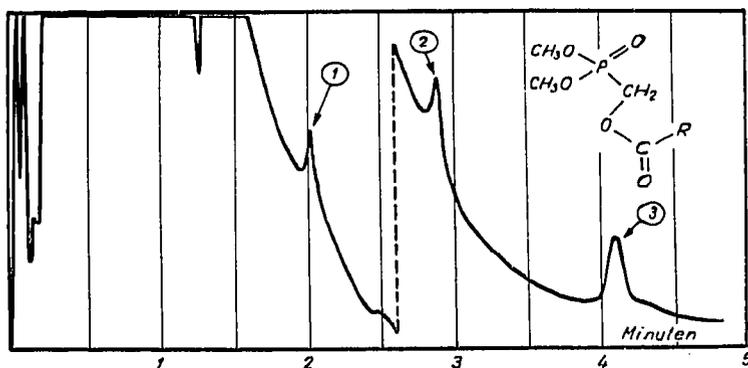


Fig. 7. Nulllinienverlauf bei der Erfassung von Carbonsäurespuren als AHPE. Die injizierte Derivatmengen entsprechen ca. 10 pg Buttersäure (1), Valeriansäure (2) bzw. Capronsäure (3). Säule E, 170°; Injektion und Detektion bei 200°; Trägergas und Detektor wie Fig. 6.

Im Picogrammereich (Fig. 7) ist wegen der steil abfallenden Nulllinie eine genaue Erfassung nicht mehr gewährleistet. Um die Kontamination des AFID mit phosphorhaltigen Komponenten zu vermeiden, muss der Reagensüberschuss noch vor dem Eintritt in die Trennsäule weitestgehend abgebaut werden. Eine selektive Absorption des HPE in einer mit Borsäure imprägnierten Vorsäule gelang nur unvollkommen und führte zu keiner wesentlichen Verbesserung des Nulllinienverlaufs.

Durch Vorschaltung einer z.B. dünnenschichtchromatographischen Trennstufe zur Abtrennung des Reagensüberschusses ist ein stabiler, störungsfreier Betrieb des AFID gewährleistet². Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine preliminäre weitestgehende Ausschaltung des HPE-Überschusses auf gaschromatographischem

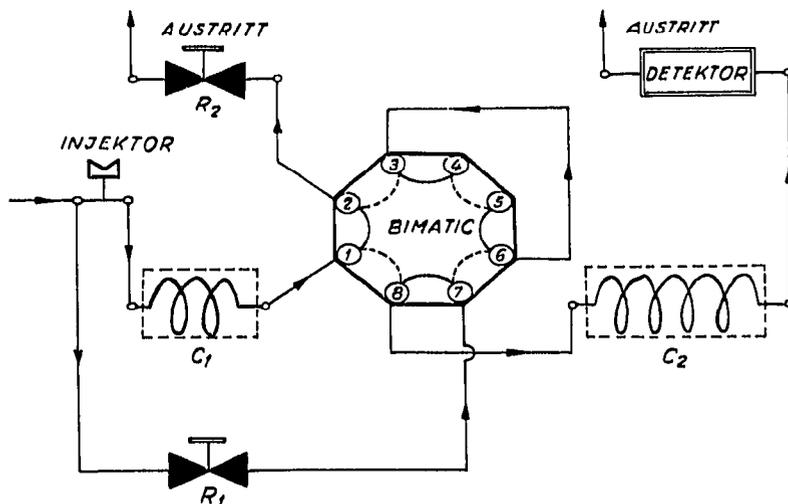


Fig. 8. Schematische Darstellung der Zweisäulen-anordnung zur Abtrennung des Elutionsvorlaufs. C₁, Vorsäule; C₂, Hauptsäule; R₁ und R₂, Nadelventile. Zur Vermeidung von Druckschwankungen beim Umschalten der Anordnung werden R₁ und R₂ so eingestellt, dass ihre pneumatischen Widerstände genau denen von C₁ bzw. C₂ entsprechen.

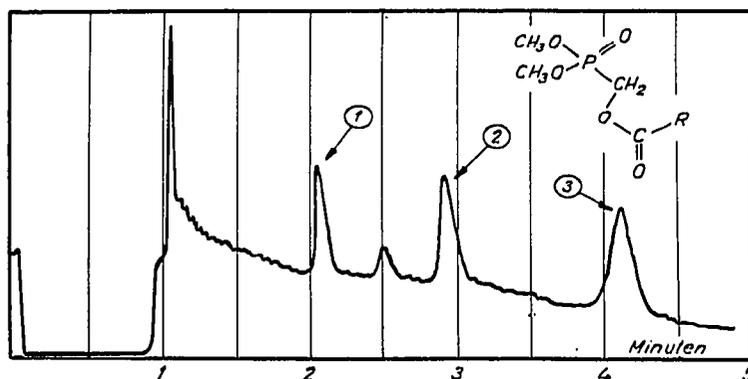


Fig. 9. Erfassung von Carbonsäurespuren als AHPE unter Einsatz der Zweisäulenordnung. Die injizierte Derivatmengen entsprechen ca. 10 pg Buttersäure (1), Valeriansäure (2), bzw. Capronsäure (3). Vorsäule: Säule D; Hauptsäule: Säule E. Temperatur: 180°; Injektion und Detektion bei 200°. Trägergas: Stickstoff, 85 ml/min. Detektor wie Fig. 6. Die Umschaltung erfolgte 50 sec nach der Injektion.

Wege, mittels eines pneumatisch gesteuerten Zweisäulensystems möglich ist. Im Vergleich zur dünn-schichtchromatographischen Methode ist dieses Verfahren einfacher und mit keinen Substanzverlusten verbunden.

Das von uns eingesetzte Zweisäulensystem ermöglicht eine preliminäre Trennung des Derivatisierungsgemisches an einer Vorsäule (Fig. 8). Der Elutionsvorlauf, d.h. der Lösungsmittelpeak und der HPE-Peak treten unmittelbar nach der Vorsäule aus, während durch die Hauptsäule reines Trägergas fließt. Durch Umschaltung des Membranventils wird der gewünschte Retentionsbereich der Vorsäule selektiv der Hauptsäule zugeführt. Die darin enthaltenen Spurenderivate werden anschließend mit dem AFID erfasst. Belastungen des AFID durch grosse Lösungsmittelvolumina bzw. durch HPE-Überschüsse entfallen, und der Nulllinienverlauf gestattet analytische Bestimmungen im Picogramm-bereich.

Fig. 9 zeigt ein mit der Zweisäulenordnung erhaltenes Chromatogramm. Die injizierte Derivatmengen entsprechen durchschnittlich 10 pg Butter-, Valerian-, bzw. Capronsäure.

ZUSAMMENFASSUNG

Acylierte α -Hydroxyphosphonsäureester stellen eine Substanzklasse dar, die sich infolge guter gaschromatographischer Elutionseigenschaften zum spurenanalytischen Nachweis mit dem Alkaliflammionisationsdetektor (AFID) eignet. Es wird ein kinetisch optimiertes Verfahren vorgeschlagen, aliphatische Carbonsäuren mit diesen Reagenzien zu derivatisieren. Durch den Einsatz einer pneumatisch gesteuerten Zweisäulenordnung gelingt die Abtrennung des Reagensüberschusses und somit ein stabiler, störungsfreier Betrieb des AFID.

LITERATUR

- 1 R. Vilceanu und P. Schulz, *J. Chromatogr.*, 82 (1973) 279.
- 2 W. Vogt, I. Fischer und M. Knedel, *Z. Anal. Chem.*, 267 (1973) 28.

- 3 M. P. Heenan und N. K. McCallum, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 89.
- 4 A. Nonaka, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 483.
- 5 A. di Corcia, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 492.
- 6 K. Witte und H. Rasse, *Chromatographia*, 1 (1968) 33.
- 7 O. L. Hollis, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 309.
- 8 M. L. Kaufman, S. Friedman und I. Wander, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1011.
- 9 R. H. Greeley, *J. Chromatogr.*, 88 (1974) 229.
- 10 H. Ko und M. E. Royer, *J. Chromatogr.*, 88 (1974) 253.
- 11 H. P. Klemm, U. Hintze und G. Gercken, *J. Chromatogr.*, 75 (1973) 19.
- 12 D. L. Corina, *J. Chromatogr.*, 87 (1973) 254.
- 13 R. V. Smith und S. L. Tsai, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 29.
- 14 A. Buzas, C. Egnell und P. Fréon, *C.R. Acad. Sci.*, 252 (1961) 892.
- 15 A. Buzas und C. Egnell, *C.R. Acad. Sci.*, 255 (1962) 945.
- 16 A. Stempel und F. W. Landgraf, *J. Org. Chem.*, 27 (1962) 4675.
- 17 E. Felder, U. Tiepolo und A. Mengassini, *J. Chromatogr.*, 82 (1973) 291.
- 18 M. Smith, J. G. Moffat und H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.*, 80 (1958) 6204.
- 19 V. S. Abramov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 73 (1950) 487.
- 20 E. K. Fields, *U.S. Pat.*, 2,579,810, 1951.