

CHROM. 10,163

GASCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER FLÜCHTIGEN FETTSAUREN VON C₁ BIS C₅ EINSCHLIESSLICH DER MILCHSÄURE ALS BENZYLESTER UNTER VERWENDUNG VON PHENYLDIAZOMETHAN ALS BENZYLIERUNGSMITTEL

BESTIMMUNG DER SÄUREN IN SILAGEN

ERWIN K. DOMS

Chemisches Untersuchungslaboratorium der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode, Bundesallee 50, D-33 Braunschweig (B.R.D.)

(Eingegangen am 17. März 1977)

SUMMARY

Gas chromatographic determination of the volatile fatty acids (C₁-C₅) including lactic acid after conversion into their benzyl esters by phenyldiazomethane. Determination of the acids in silages.

A gas chromatographic method for the determination of the volatile fatty acids (C₁-C₅) including lactic acid is described. The acids are converted into their benzyl esters by means of phenyldiazomethane without previous purification of the reagent by distillation. The benzyl esters are well separated from the solvent as well as from one another. Silicone SE-30 is used as the stationary phase. An application of the method on silage acids is demonstrated.

EINLEITUNG

Im allgemeinen werden die flüchtigen Fettsäuren mit Ausnahme der Ameisensäure gaschromatographisch (GC) als freie Säuren bestimmt, wobei zur Unterdrückung des sog. Memory-Effektes Ameisensäure verwendet wird. Bezüglich der zahlreichen Veröffentlichungen hierüber sei auf das ausführliche Literaturverzeichnis in der Arbeit von van Huyssteen¹ verwiesen. Eine Einbeziehung der Ameisensäure in diese Bestimmung ist wegen der Unempfindlichkeit des Flammenionisationsdetektors (FID) dieser Säure gegenüber nicht möglich². Zugleich anwesende Milchsäure wurde bisher gesondert bestimmt, meist nach der Methode von Barker-Summerson^{3,4}. Die GC-Bestimmung dieser schwerflüchtigen und bei stärkerem Erhitzen zur Kondensation und schliesslich Zersetzung neigenden Säure erfolgt überwiegend in Form ihres Methylesters⁵. Es ergibt sich, dass für eine gemeinsame GC-Bestimmung, wie sie u.a. für die Untersuchung der Gär säuren in Silagen erwünscht wäre, alle diese Säuren derivatisiert werden müssen. Wegen ihrer beträchtlichen Flüchtigkeit (vgl. Tabelle I), welche zu Substanzverlusten während der Analyse führt und auch für die schlechte Trennung ihrer Peaks vom Lösungsmittelpeak im Chromatogramm verantwortlich ist, kommen die Methylester als Derivate für die niederen Fettsäuren nicht in Betracht, so sehr sie sich auch in der GC der höheren Fettsäuren bewährt haben. Eine Reihe höher

TABELLE I

SIEDEPUNKTE (°C) EINIGER ESTER DER FLÜCHTIGEN FETTSÄUREN C₁ BIS C₅

Säure	Methylester	Propylester	Butylester	Benzylester
Ameisensäure	32.0	81.3	106.9	202/747 Torr
Essigsäure	57.1	101.5	126.5	213.5
Propionsäure	79.7	122.5	146.0	221.0
Isobuttersäure	92.5	135.0	155.0	229.5
<i>n</i> -Buttersäure	102.3	142.5	165.7	239.0
Isovaleriansäure	116.5	155.5	176.0	245.0
<i>n</i> -Valeriansäure	127.3	167.5	186.5	250/730 Torr

siedender Derivate wie Propylester⁶, Butylester⁷⁻¹², Benzylester¹³⁻¹⁶, *p*-Bromphenyl- und *p*-Phenylphenacylester¹⁷, Anilide und Toluidide^{18,19} sowie Trimethylsilyl(TMS)-Verbindungen²⁰ wurde Gegenstand von Untersuchungen. Nach Tabelle I zeichnen sich die Benzylester gegenüber den anderen dort aufgeführten Estern durch besondere Schwerflüchtigkeit aus. Sie lassen daher gute Trenneigenschaften erwarten. In einer vorangegangenen Arbeit²¹ wurde bereits gezeigt, dass Ameisensäure mit Phenyl diazomethan (PDM) in Form des Rohproduktes benzyliert und gaschromatographisch als Benzylester bestimmt werden kann, wenn der zur Benzylierung benötigte PDM-Überschuss durch den Zusatz einer anderen niederen aliphatischen Monocarbonsäure beseitigt und damit das Auftreten von Störpeaks von Artefakten des PDM im Chromatogramm vermieden wird. Der schwerflüchtige Ameisensäurebenzylester liess sich vom Lösungsmittel trennen, das Chromatogramm zeigte gut getrennte Peaks. Die Verwendbarkeit des PDM in Form seines Rohproduktes zur Analyse ist insofern von Vorteil, als bei der Reindarstellung durch Vakuumdestillation ein Grossteil des Reagenzes zersetzt wird und damit verloren geht. Sie wird dadurch ermöglicht, dass das Gaschromatogramm des PDM im interessierenden Bereich keine Peaks aufweist, welche nach Beseitigung des PDM-Überschusses Störungen verursachen²¹. In der vorliegenden Arbeit werden die Untersuchungen auf die flüchtigen Fettsäuren von C₁ bis C₅ mit Einschluss der Milchsäure ausgedehnt in der Absicht, die Gärssäuren in

TABELLE II

RETENTIONSZEITEN (min) DER BENZYLESTER DER FETTSÄUREN C₁ BIS C₅ SOWIE DER MILCHSÄURE BEI VERSCHIEDENEN ARBEITSBEDINGUNGEN

(A) Säule I, isotherm bei 170°, He 60 ml/min (Fig. 1); (B) Säule I, Temperaturprogramm: 120° (12 min) + 5°/min (8 min), He 60 ml/min (Fig. 2); (C) Säule II, 130° (4.7 min) + 5°/min (4 min), He 38 ml/min (Fig. 3); (D) Säule II, isotherm bei 130°, He 60 ml/min (Fig. 4 und 5); (E) Säule II, 114° (5 min) + 7.5°/min (4 min) He 38 ml/min (Fig. 6 und 7).

Benzylester	A	B	C	D	E
Ameisensäure	2.3	7.5	2.5	2.1	4.7
Essigsäure	3.0	10.8	4.1	2.9	7.0
Propionsäure	4.1	13.8	6.1	4.5	9.4
Isobuttersäure	4.9	15.0	7.1	5.4	
<i>n</i> -Buttersäure	5.7	16.1	8.2	6.6	11.5
Isovaleriansäure	6.9	17.4	9.4	8.4	
<i>n</i> -Valeriansäure	8.3	18.7	10.6	10.5	
Milchsäure			8.7	7.2	12.1

Silagen zusammen mit den als Silierhilfsmittel zugesetzten Säuren en bloc gaschromatographisch zu erfassen.

EXPERIMENTELLES

Darstellung von Phenyldiazomethan

Phenyldiazomethan wurde durch Einwirken einer methanolischen KOH-Lösung auf eine ätherische Suspension von *p*-Tosyl-N-benzyl-nitrosamid dargestellt²¹, welches nach einem modifizierten Verfahren von White^{21,22} durch Nitrosylierung mit Hilfe von Natriumnitrit aus *p*-Tosylbenzylamid erhalten worden war. Die letztgenannte Verbindung wurde nach Holmes und Ingold²³ aus *p*-Tosylchlorid und Benzylamin synthetisiert. Die bordeauxrote PDM-Lösung wurde mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung durch Vakuumdestillation zum Benzylieren verwendet.

Modellösungen

Aus ätherischen Stammlösungen mit einem Gehalt von je 1 g Ameisen-, Essig-,

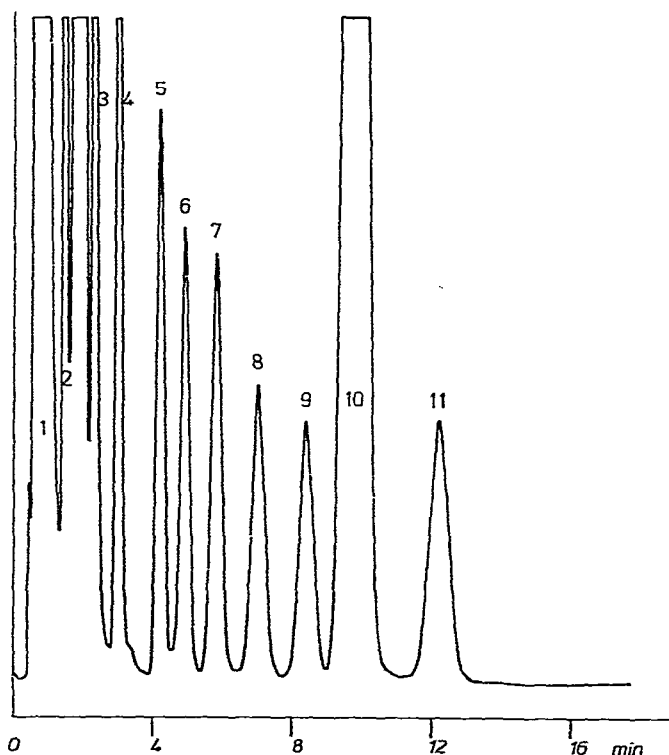


Fig. 1. Chromatogramm der Benzylester der Säuren C_1 bis C_5 in Äther. Die Benzylierung erfolgte mit PDM, dessen Überschuss mittels *n*-Hexansäure beseitigt wurde. 1 = Äther; 2 = *n*-Hexansäure; 3 = Ameisensäurebenzylester; 4 = Essigsäurebenzylester; 5 = Propionsäurebenzylester; 6 = Isobuttersäurebenzylester; 7 = *n*-Buttersäurebenzylester; 8 = Isovaleriansäurebenzylester; 9 = *n*-Valeriansäurebenzylester; 10 = Nebenprodukt der PDM-Darstellung; 11 = *n*-Hexansäurebenzylester. Trennsäule I bei 170° isotherm.

Propion-, Isobutter-, *n*-Butter-, Isovalerian, *n*-Valerian- und Milchsäure pro 100 ml Lösung wurden durch Entnahme aliquoter Volumina Modellösungen hergestellt, welche 10 bis 200 mg je Säure pro 100 ml enthielten und damit Probelösungen von Silagen mit einem Gehalt von 0.1 bis 2.0% je Säure entsprachen⁵.

Benzylierung mit PDM

Aliquote (je 10 ml) der Modellösungen wurden mit PDM-Lösung (je 10 ml) im Überschuss versetzt und in verschlossenen Kölbchen 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde der PDM-Überschuss (erkennbar an einer kräftigen Rotfärbung) durch einen Zusatz von *n*-Hexansäure (0.5 ml) beseitigt. Die farblos gewordenen Lösungen wurden der GC-Bestimmung zugeführt.

Gaschromatographie

Von den Benzylierungslösungen wurden je 5 μ l mittels einer 10 μ l-Hamilton-spritze N 75 in den Gaschromatographen, Modell GC-4 der Fa. Beckman, injiziert. Das mit einem Doppel-FID ausgerüstete Gerät wurde mit Helium als Trägergas (60 bzw. 38 ml/min) betrieben. Zur Trennung dienten eine Stahlsäule (1.80 m \times 0.25 in. I.D.) mit 10% SE-30 auf Chromosorb G AW DMCS (60–80 mesh) (Säule I) sowie

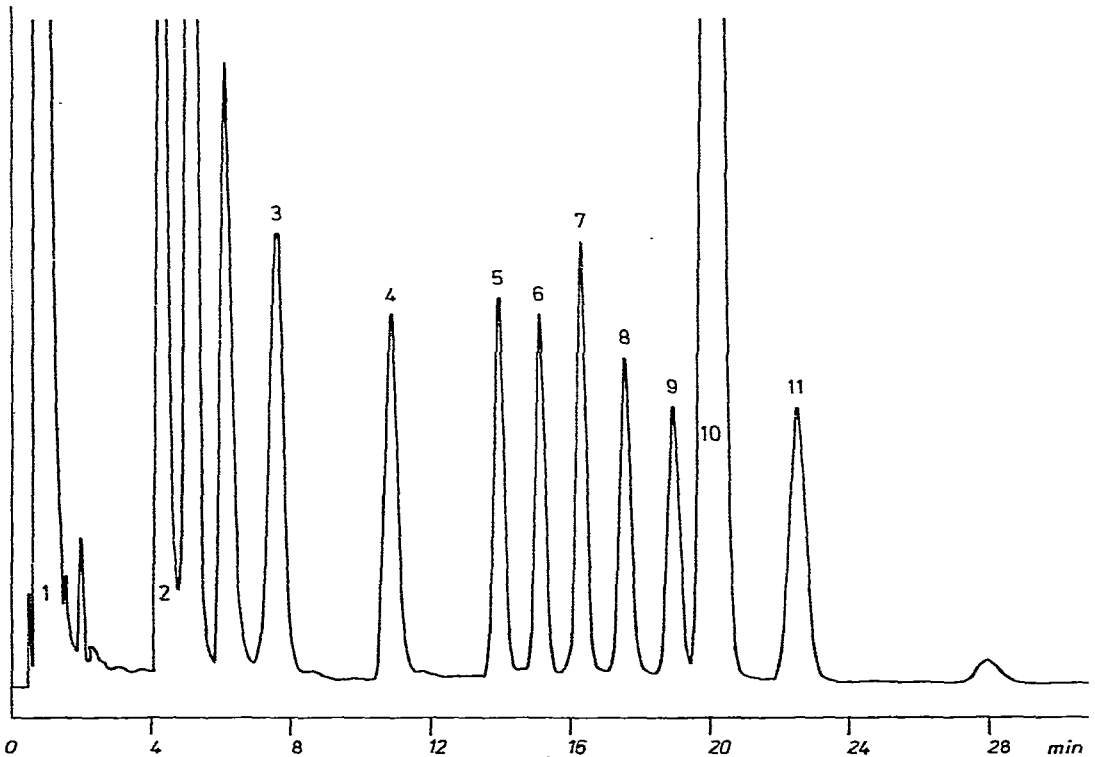


Fig. 2. Chromatogramm der Benzylester der Säuren C_1 bis C_7 in Äther. Die Bezeichnungen sind die gleichen wie bei Fig. 1. Trennsäule I. Es wurde temperaturprogrammiert gearbeitet, wobei zuerst die Säulentemperatur 12 min auf 120° gehalten und dann mit einer Steigerungsrate von 5°/min auf 160° erhöht wurde.

eine Glassäule (3.00 m \times 0.4 cm I.D.) mit 10% SE-30 auf Chromosorb W AW DMCS (80–100 mesh) (Säule II). Die Glassäule wurde durch den Einspritzblock hindurchgeführt, um direktes Injizieren der Proben auf die Säule zu ermöglichen. Es wurde sowohl isotherm als auch temperaturprogrammiert gearbeitet. Die Temperaturen des Einspritzblockes und des Detektors betragen 250° bzw. 270°, die Abschwächung lag im Bereich von 1×10^3 bis 1×10^4 .

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Versuche ergaben, dass sich sowohl flüchtige Fettsäuren als auch Milchsäure im Gemisch leicht mit PDM benzylieren lassen. Es zeigt sich weiterhin, dass zur Benzylierung PDM als Rohprodukt verwendet werden kann, wodurch die mühsame und verlustreiche Reindarstellung des Reagenzes unnötig wird. Zwar taucht im Gaschromatogramm des Rohproduktes ein grosser Peak auf, welcher von einem Nebenprodukt der PDM-Darstellung stammt, doch verursacht dieser keine Störung, da er

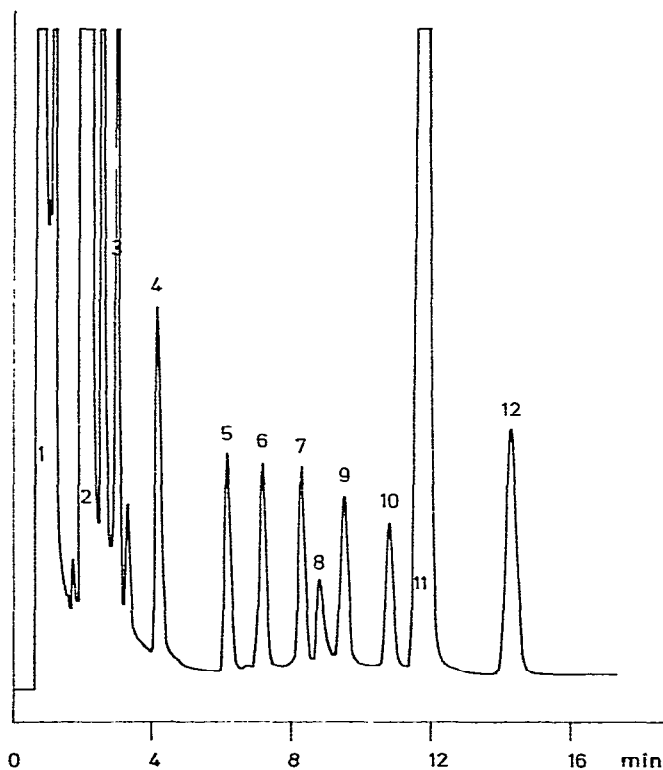


Fig. 3. Chromatogramm der Benzylester der Säuren C_1 bis C_5 sowie der Milchsäure in Äther. Die Benzylierung erfolgte mit PDM, dessen Überschuss durch einen Zusatz von *n*-Hexansäure entfernt wurde. 1 = Äther; 2 = *n*-Hexansäure; 3 = Ameisensäurebenzylester; 4 = Essigsäurebenzylester; 5 = Propionsäurebenzylester; 6 = Isobuttersäurebenzylester; 7 = *n*-Buttersäurebenzylester; 8 = Milchsäurebenzylester; 9 = Isovaleriansäurebenzylester; 10 = *n*-Valeriansäurebenzylester; 11 = Nebenprodukt der PDM-Darstellung; 12 = *n*-Hexansäurebenzylester. Trennsäule II. Temperaturprogramm: 4.7 min bei 130°, dann Steigerung auf 150° mit einer Rate von 5°/min. Trägergasstrom (He): 38 ml/min.

zwischen den Peaks des *n*-Valeriansäure- und *n*-Hexansäurebenzylesters liegt, ohne diese zu überlappen (Peak 10 in Fig. 1). Wird in Analogie zum Verfahren der Diazomethandarstellung⁵ auch für die Darstellung des PDM aus *p*-Tosyl-*N*-benzyl-nitrosamid²¹ Carbitol an Stelle von Methanol bzw. Natriummethylat verwendet, dann verschwindet dieser Peak aus dem Chromatogramm, während an einer weit entfernten Stelle ein neuer erscheint. Für die GC-Trennung erwies sich von einer Anzahl stationärer Phasen SE-30 als am besten geeignet. Polare Phasen bewirken, dass der Peak der zur Entfernung des PDM-Überschusses zugesetzten Säure in den Bereich der Benzylesterpeaks hineinwandert und deren Trennung stört, anstatt zusammen mit dem Lösungsmittelpeak am Anfang des Chromatogrammes zu erscheinen, wie es bei der unpolaren Phase SE-30 der Fall ist. Die Untersuchungen wurden mit den beiden Trennsäulen I und II unter verschiedenen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Mit beiden Säulen konnten bei isothermem Arbeiten ausgezeichnete Trennungen der Benzylester der flüchtigen Fettsäuren C₂ bis C₅ erreicht werden (Fig. 1). Mit Hilfe eines geeigneten Temperaturprogrammes wurde auch eine scharfe Abtrennung des Ameisensäure-

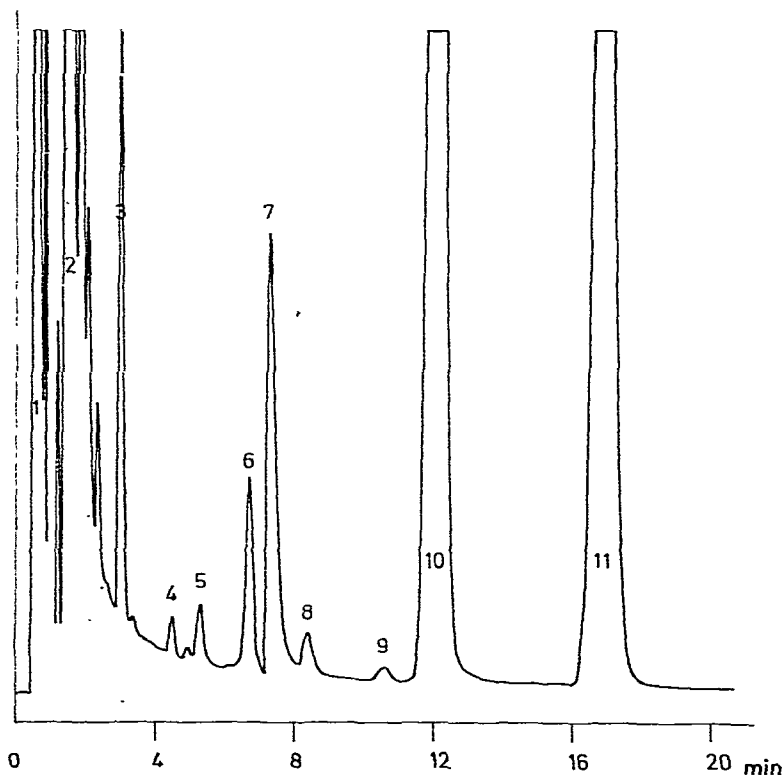


Fig. 4. Chromatogramm der Benzylester der Gärtsäuren einer Silage (Sauerblatt) in Äther. Die Benzyliegerung erfolgte mit PDM, die Entfernung des PDM-Überschusses mit Hilfe von *n*-Hexansäure. 1 = Äther; 2 = *n*-Hexansäure; 3 = Essigsäurebenzylester; 4 = Propionsäurebenzylester; 5 = Isobuttersäurebenzylester; 6 = *n*-Buttersäurebenzylester; 7 = Milchsäurebenzylester; 8 = Isovaleriansäurebenzylester; 9 = *n*-Valeriansäurebenzylester; 10 = Nebenprodukt der PDM-Darstellung; 11 = *n*-Hexansäurebenzylester. Trennsäule II. Es wurde isotherm bei 130° gearbeitet. Trägergasstrom (He): 60 ml/min.

benzylesters ermöglicht (Peak 3 in Fig. 2). Bei Anwesenheit von Milchsäure erscheint deren Benzylesterpeak zwischen den Peaks des *n*-Buttersäure- und des Isovaleriansäurebenzylesters (Peak 8 in Fig. 3), wobei eine vollständige Trennung des Milchsäurebenzylesters vom *n*-Buttersäurebenzylester nur mit Säule II zu erzielen ist (Fig. 3). Die Anwendung des Verfahrens auf die Analyse der Gärsäuren einer Sauerblattsilage, welche mittels Ionenaustauscher isoliert und durch Perforation aus wässriger Lösung in Äther überführt worden waren³, wird in Fig. 4 demonstriert. Es ergaben sich scharf ausgeprägte und gut getrennte Peaks. Ein Vergleichschromatogramm, welches von einer Probe nach Zusatz eines Gemisches der flüchtigen Fettsäuren erhalten wurde, diente der besseren Identifizierung der einzelnen Peaks (Fig. 5). Zur Abtrennung und Erkennung etwaiger vorhandener Ameisensäure wurde das Chromatogramm der Silage temperaturprogrammiert gefahren (Fig. 6). Der Vergleich mit einem entsprechenden Vergleichschromatogramm (Fig. 7) ergab, dass keine Ameisensäure in der untersuchten Silage vorhanden war.

Wie schon erwähnt, kann PDM in Form seines Rohproduktes, also ohne es weiteren Reinigungsoperationen zu unterwerfen, die zeitraubend und verlustreich sind, zum Benzylieren benutzt werden. Gemäss der Darstellungsmethode wird es in äthe-

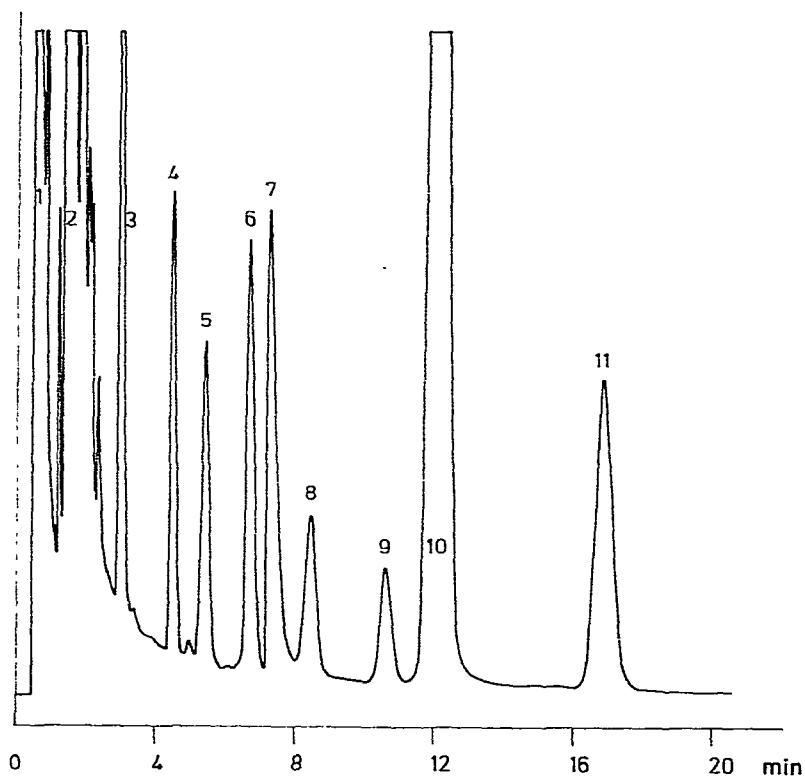


Fig. 5. Chromatogramm der Benzylester der Gärsäuren einer Silage (Sauerblatt). Zum Vergleich war der Silage ein Gemisch der Säuren C_1 bis C_5 zugesetzt worden. Benzyliert wurde mit PDM, dessen Überschuss durch Reaktion mit zugesetzter *n*-Hexansäure beseitigt wurde. Trennsäule, Bedingungen und Peakbezeichnungen wie in Fig. 4.

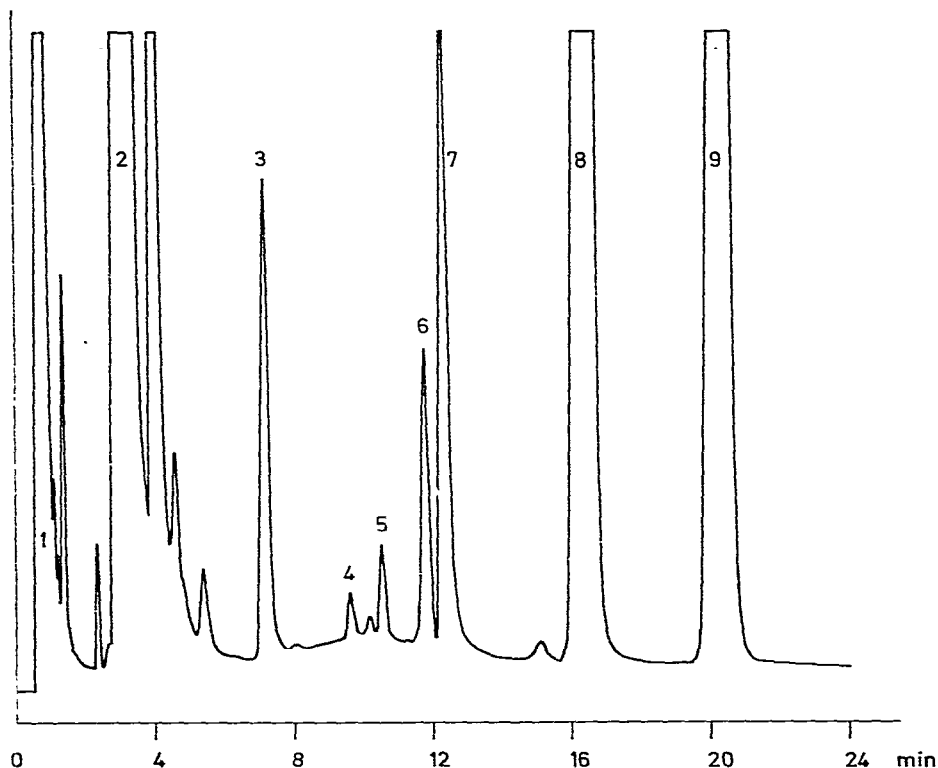


Fig. 6. Chromatogramm der Benzylester der Gärnsäuren einer Silage (Sauerblatt) in ätherischer Lösung. Benzylierung mit PDM, Entfernung des PDM-Überschusses mit *n*-Hexansäure. 1 = Äther; 2 = *n*-Hexansäure; 3 = Essigsäurebenzylester; 4 = Propionsäurebenzylester; 5 = Isobuttersäurebenzylester; 6 = *n*-Buttersäurebenzylester; 7 = Milchsäurebenzylester; 8 = Nebenprodukt der PDM-Darstellung; 9 = *n*-Hexansäurebenzylester. Trennsäule II. Temperaturprogramm 5 min bei 114°, dann Temperaturerhöhung auf 144° mit einer Steigerungsrate von 7.5°/min. Trägergasstrom (He): 38 ml/min.

rischer Lösung gewonnen und so zur Reaktion gebracht. Durch Abdampfen des Äthers bei niedriger Temperatur erhält man ein Konzentrat, welches aber nicht ganz so beständig zu sein scheint, wie das in Äther gelöste PDM, das bei -20° monatelang haltbar ist²¹. PDM reagiert mit Ameisensäure fast augenblicklich, bei den homologen Säuren nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit aber mit zunehmendem Molekulargewicht ab (Tabelle III). Die Verbindung verhält sich in dieser Hinsicht ähnlich wie Diphenyldiazomethan²⁴⁻²⁶. Für die quantitative Umsetzung ist ein ausreichender Überschuss des Reagenzes erforderlich. Bei Mangel an PDM werden, wie Versuche ergaben, nicht alle Säuren in gleichem Masse benzyliert, sondern Ameisensäure und Milchsäure werden bevorzugt; erst wenn diese beiden Säuren quantitativ verestert sind, steht das restliche PDM für den Umsatz mit den anderen Säuren zur Verfügung—ein Hinweis, dass die Reaktion von der Acidität der Säuren beeinflusst wird (vgl. Tabelle IV). Da der Verlauf der Reaktion in hohem Masse von der Reagenzmenge und, wie sich weiterhin zeigte, von der Zeitdauer ihrer Einwirkung abhängt (vgl. Tabelle III), muss die Benzylierung zur Erzielung reproduzierbarer Werte unter mög-

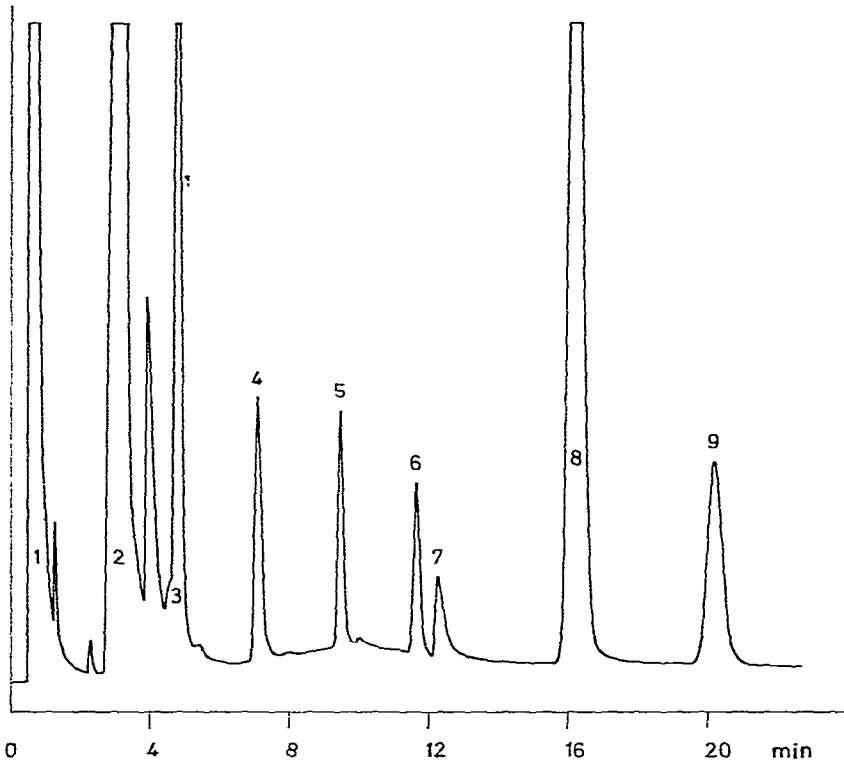


Fig. 7. Chromatogramm der Benzylester von Ameisen-, Essig-, Propion-, *n*-Butter- und Milchsäure in Äther. Benzilyliert wurde mit PDM und dessen Überschuss mit *n*-Hexansäure beseitigt. 1 = Äther; 2 = *n*-Hexansäure; 3 = Ameisensäurebenzylester; 4 = Essigsäurebenzylester; 5 = Propionsäurebenzylester; 6 = *n*-Buttersäurebenzylester; 7 = Milchsäurebenzylester; 8 = Nebenprodukt der PDM-Darstellung; 9 = *n*-Hexansäurebenzylester. Trennsäule II. Temperaturprogramm und Trägergasstrom wie in Fig. 6.

TABELLE III

PEAKHÖHEN (mm) DER BENZYLESTER BEI VERSCHIEDEN LANGER EINWIRKUNGSZEIT DES PDM

Peaks: Benzylester von: 1 = Ameisensäure; 2 = Essigsäure; 3 = Propionsäure; 4 = Isobuttersäure; 5 = *n*-Buttersäure; 6 = Milchsäure; 7 = Isovaleriansäure; 8 = *n*-Valeriansäure.

Zeit (h)	1	2	3	4	5	6	7	8
1	174.3	51.4	26.7	22.3	41.1	46.0	18.0	10.6
2	175.6	57.1	29.6	26.9	42.6	43.8	19.1	12.4
3	181.9	66.6	37.1	29.8	46.6	45.0	21.8	14.0
4	182.9	73.8	40.4	33.8	49.0	44.1	22.8	16.0
24	182.2	115.1	67.0	54.2	69.0	45.6	36.8	26.2
48	181.1	126.1	78.2	62.8	74.3	44.3	39.8	29.4

TABELLE IV

 pK_s -WERTE DER NIEDEREN FETTSÄUREN C_1 - C_5 SOWIE DER MILCHSÄURE

Säure	pK_s
Ameisensäure	3.77
Essigsäure	4.76
Propionsäure	4.88
Isobuttersäure	4.85
Buttersäure	4.82
Isovaleriansäure	4.77
Valeriansäure	4.81
Milchsäure	3.87

licht gleichartigen Bedingungen vorgenommen werden. Art und Menge der nach der Veresterung zur Entfernung des PDM-Überschusses verwendeten Carbonsäure haben nur geringen Einfluss. Man wird eine möglichst flüchtige Säure wählen, um die Chromatographierdauer nicht unnötig zu verlängern. Zur Isolierung der Säuren aus Silageextrakten kann man sich der Ionenaustauscher bedienen⁵. Mit Amberlite IR-120 und IR-45 konnten nur Ameisen-, Essig-, Propion- und Milchsäure quantitativ erfasst werden. Die Überführung der Säuren aus der wässrigen in die ätherische Phase durch Perforation erfolgte dagegen durchwegs quantitativ. Im ganzen genommen erwies sich Phenyl Diazomethan als ein vorzügliches Mittel, die flüchtigen Fettsäuren von C_1 bis C_5 mit Einschluss der Milchsäure in Benzylester zu überführen, welche sich unter geeigneten Bedingungen ausgezeichnet gaschromatographisch trennen und bestimmen lassen. Da bei diesem Verfahren alle für die Bewertung einer Silage massgeblichen Säuren in einer Analyse erfasst werden, dürfte es für die Bestimmung von Silagegärsäuren von Interesse sein.

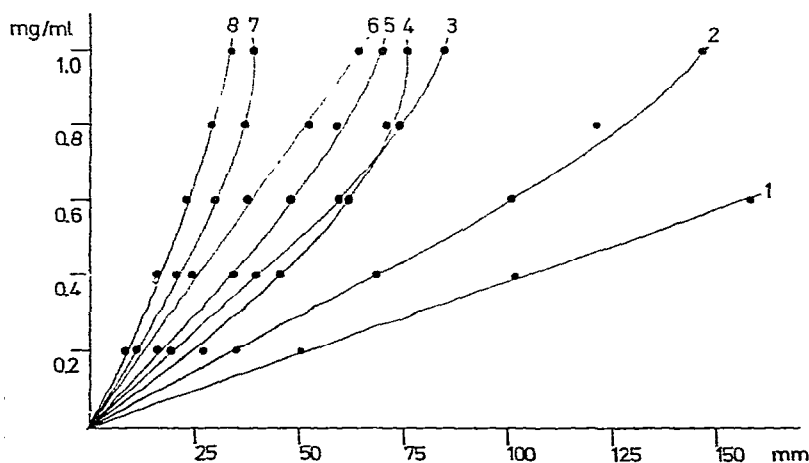


Fig. 8. Peakhöhen der Benzylester in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Säuren in den Modellösungen. Trennsäule 1, isotherm bei 150° . 1 = Ameisensäurebenzylester; 2 = Essigsäurebenzylester; 3 = Propionsäurebenzylester; 4 = Isobuttersäurebenzylester; 5 = *n*-Buttersäurebenzylester; 6 = Milchsäurebenzylester; 7 = Isovaleriansäurebenzylester; 8 = *n*-Valeriansäurebenzylester.

Zur Auswertung wurde aus praktischen Gründen die Peakhöhenmethode gewählt⁵, wobei die Werte für jede Säure im Gemisch im Bereiche 0.1–1.0 mg/ml lagen und für Ameisensäure sowie Milchsäure gute Linearität zeigten (vgl. Fig. 8). Die Werte der anderen Säuren wichen mit zunehmender Konzentration von der Linearität ab. Es ist daher zweckmässig, im linearen Bereich niedriger Konzentrationen zu arbeiten. Zugleich sei auf die Möglichkeit der Auswertung von Analysendaten mittels nichtlinearer Eichkurven mit Hilfe moderner Geräte, wie z.B. das Modell SP 4000 der Fa. Spectra-Physics, hingewiesen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Verfahren zur gaschromatographischen Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren von C₁ bis C₅ mit Einschluss der Milchsäure beschrieben. Mit Hilfe von Phenyldiazomethan werden die Säuren in ihre Benzylester überführt ohne vorherige Reinigung des Reagenzes durch Destillation. Die Benzylester werden sowohl vom Lösungsmittel als auch voneinander gut getrennt. Als stationäre Phase diente SE-30. Die Anwendung des Verfahrens auf Silagegärsäuren wird demonstriert.

LITERATUR

- 1 J. J. van Huyssteen, *Water Res.*, 4 (1970) 645.
- 2 B. A. Schaefer, *J. Chromatogr. Sci.*, 13 (1975) 86.
- 3 S. B. Barker und W. H. Summerson, *J. Biol. Chem.*, 138 (1941) 535.
- 4 J. D. Pryce, *Analyst (London)*, 94 (1969) 1151.
- 5 E. K. Doms, *Landbauforschung Völkenrode*, 24 (1974) 143.
- 6 A. J. Appleby und J. E. O. Mayne, *J. Gas Chromatogr.*, 5 (1967) 266.
- 7 G. Clément und J. Bezard, *Compt. Rend.*, 253 (1961) 564.
- 8 J. Sampugna, R. E. Pitas und R. G. Jensen, *J. Dairy Sci.*, 49 (1966) 1462.
- 9 M. Iyer, T. Richardson, C. H. Amundson und A. Boudreau, *J. Dairy Sci.*, 50 (1967) 285.
- 10 J. E. Steinhauer und L. E. Dawson, *J. Food Sci.*, 34 (1969) 359.
- 11 J. W. Schwarze und M. N. Gilmour, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 1686.
- 12 A. Karleskind, G. Valmalle und J.-P. Wolff, *J. Ass. Offic. Agr. Chem.*, 53 (1970) 1082.
- 13 R. N. Shelley, H. Salvin und W. Horwitz, *J. Ass. Offic. Agr. Chem.*, 46 (1963) 486.
- 14 J. R. Watson und P. Crescuolo, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 63.
- 15 H.-P. Klemm, U. Hintze und G. Gercken, *J. Chromatogr.*, 75 (1973) 19.
- 16 U. Hintze, H. Röper und G. Gercken, *J. Chromatogr.*, 87 (1973) 481.
- 17 E. O. Umeh, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 29.
- 18 E. O. Umeh, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 139.
- 19 E. O. Umeh, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 147.
- 20 M. Donike, *J. Chromatogr.*, 74 (1972) 121.
- 21 E. K. Doms, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 79.
- 22 E. H. White, *J. Amer. Chem. Soc.*, 77 (1955) 6008.
- 23 E. L. Holmes und C. K. Ingold, *J. Chem. Soc.*, 12 (1925) 1800.
- 24 A. Hantzsch und M. Lehmann, *Ber.*, 35 (1902) 897.
- 25 H. Staudinger und A. Gaule, *Ber.*, 49 (1916) 1897.
- 26 H. Staudinger, E. Anthes und F. Pfenninger, *Ber.*, 49 (1916) 1928.