

CHROM. 12,441

BESTIMMUNG DER KURZKETTIGEN MONOCARBONSÄUREN AUS NATÜRLICH VORKOMMENDEN ESTERN DURCH GAS-LIQUID-SOLID-CHROMATOGRAPHIE AN MIKROGEPACKTEN SÄULEN

J. JURENITSCH*, G. LUMPER und H. BACHMANN

Institut für Pharmakognosie der Universität Wien, Währingerstrasse 25, A-1090 Wien (Österreich)

(Eingegangen am 24. Juli 1979)

SUMMARY

Determination of free short-chain monocarboxylic acids from naturally occurring esters by gas-liquid-solid chromatography on micropacked columns

A new gas-liquid-solid chromatographic method (stationary phase 6% OV-210 on Chromosorb 101) allows the separation and determination of acetic, propionic, isobutyric, *n*-butyric, 2-methylbutyric, isovaleric, *n*-valeric, isocaproic, *n*-caproic, 3,3-dimethylacrylic, angelic and tiglic acid by using micropacked glass columns without mixing carrier gas with formic acid vapour. Quantification is obtained by means of internal standard, the lower limit of linear range being 0.1 μg acid per injection.

The general applicability of this method is demonstrated by analysis of the acid content of bornylacetate, bornylisovalerianate, α -acetyldigoxin, crystallized "aescin", valtrate and didrovaltrate, giving a recovery of 96.5–102%. Advantages and drawbacks —e.g. occurrence of "ghosting" after injection of impure samples— are discussed.

EINLEITUNG

Ester aliphatischer gesättigter und/oder ungesättigter C_2 - C_6 -Monocarbonsäuren kommen in einer grossen Anzahl von Pflanzen vor. So wurden z.B. verschiedene Komponenten in ätherischen Ölen¹, einzelne Asclepiadaceenbitterstoffe², Boraginaceen- und Veratrum-Alkaloide², herzwirksame Glykoside³, Valepotriate⁴ und nicht zuletzt Saponine⁵⁻¹¹ als Ester diverser kurzkettiger Monocarbonsäuren erkannt. Für die Strukturaufklärung solcher Verbindungen stellt die analytische Erfassung der qualitativen und quantitativen Säurezusammensetzung ein wichtiges Hilfsmittel dar.

Im Verlaufe eigener Untersuchungen an Estersaponinen¹² ergab sich die Notwendigkeit, ein zuverlässiges, einfaches und möglichst allgemein anwendbares gaschromatographisches Verfahren zu entwickeln, weil die bisher beschriebenen Methoden nur einen Teil der möglichen Carbonsäuren berücksichtigten⁸⁻¹¹ oder auf

* Korrespondenzautor.

Grund ungünstiger Trennleistungen quantitative Aussagen nur in begrenztem Masse zuliessen¹³. Wegen der einfacheren Probenvorbereitung schien die direkte Analyse der freien Carbonsäuren aus wässriger Lösung am besten geeignet, obzwar bei dieser Vorgangsweise eine Reihe technischer Probleme —z.B. die Vermeidung von "Ghosting"— zu berücksichtigen war^{14,15}. Grosse Bedeutung kam der Auswahl der stationären Phase zu, da auch die ungesättigten Säuren (Dimethylacryl-, Angelika- und Tiglinsäure) bestimmt werden sollten, deren Retentionsverhalten im Rahmen früherer Arbeiten¹⁴⁻³⁹ nicht untersucht wurde. Da einerseits Styrol-Divinylbenzol-Polymere, vor allem aber Chromosorb 101^{28,31} und andererseits flüssige Silikonphasen^{28,38} gute Trennergebnisse gezeigt hatten, ergab sich die Frage, ob ein durch Kombination beider resultierendes Gas-Liquid-Solid-Chromatographie-System auch die Analyse der ungesättigten Säuren erlaubt; dabei war zu hoffen, dass die zur Vermeidung von "Ghosting" empfohlene Sättigung des Trägergases mit Ameisensäure^{14,28} vermieden werden könnte. Eine weitere Steigerung der Trennleistung war durch Verwendung von mikrogepackten Säulen zu erwarten^{34,40,41}. Um auch Aussagen über die allgemeine Anwendbarkeit des neuen Verfahrens zu ermöglichen, wurden die Wiederfindungsrate bei der Analyse natürlicher Ester bekannten Säuregehaltes ermittelt, wobei die Verseifung unter möglichst schonenden Bedingungen erfolgte.

EXPERIMENTELLES

Gas-Chromatographie

Geräte. Gaschromatograph Perkin-Elmer F 33 mit Flammenionisationsdetektor; Integrator Perkin-Elmer SIP-1; Schreiber Perkin-Elmer 56 am logarithmischen Intergratorausgang.

Packung. Unbelegtes Chromosorb 101 (100-120 mesh) (Johns-Manville, Denver, Colo., U.S.A.); Säule, Pyrex 6 ft. × 2 mm I.D.; Trägergas (N₂), 35 ml/min; Temperatur, Injektor-Detektor 175°, Ofen 160° (isotherm); Empfindlichkeit, 10 × 32.

Trennflüssigkeitsbelegungen auf Chromosorb 101. 6% DEGS, 6% EGA, 6% Carbowax 20M, 6% OV-210 und 6% OV-101; Säule, Pyrex 6 ft × 2 mm I.D.; Trägergasfluss und Temperatur wurden für jede Packung optimiert.

Bedingungen für quantitative Untersuchungen. Säule, Pyrex 2.4 m × 1 mm I.D.; Packung, 6% OV-210 auf Chromosorb 101 (100-120 mesh); Trägergas (N₂) 6 ml/min; Temperatur, Injektor/Detektor 225°, Ofen 170° (isotherm); Empfindlichkeit, 10 × 32.

Die Belegung von Chromosorb 101 erfolgte nach dem Verfahren von Williams⁴², die Säulenfüllung wurden unter vermindertem Druck und Anlegen von Ultraschall vorgenommen, das hintere Ende der Säule war mit einem kleinen Pfropfen silylierter Glaswolle verschlossen. Berechnung der Standardkorrekturfaktoren und Quantifizierung der Säuren in der üblichen Weise⁴³, die Reinheit der Testsubstanzen wurde bei der Angabe der Einwaagen berücksichtigt.

Substanzen

Vergleichssubstanzen. Essigsäure, Propionsäure, *n*-Propanol, Isobutanol, *n*-Butanol, Isoamylalkohol, *tert.*-Amylalkohol, Pentanol-2, Pentanol-3, Methyläthylketon und Isobutylmethylketon —jeweils höchster erhältlicher Reinheitsgrad— Merck (Darmstadt, G.F.R.); *n*-Buttersäure, Isobuttersäure, Isovaleriansäure, *n*-Valeriansäure, Isocaprinsäure, *n*-Caprinsäure, 3,3-Dimethylacrylsäure und Tiglin-

säure— jeweils höchster Reinheitsgrad— Fluka (Buchs, Schweiz). Angelikasäure wurde nach dem Verfahren von Buckles und Mock⁴⁴ aus Tiglinsäure hergestellt.

Alkalische Hydrolyse. Das Erwärmen der Reaktionsansätze erfolgte jeweils unter Rückflusskühlung; Ansätze: 7 mg Bornylisovalerianat bzw. 15 mg Bornylacetat (Dragoco, Wien, Österreich) + 2 ml 10% methanolischer Kalilauge; 55 mg α -Acetyldigoxin + 7 ml 5% methanolischer Kalilauge; 190 mg "Aescin" (Fa. Dr. Madaus & Co.) + 6 ml Methanol + 2 ml 5% wässrige Kalilauge (1 h bei 95°); 9 mg Valtrat bzw. 8 mg Didrovaltrat + 2 ml 5% methanolischer Kalilauge; weitere Angaben siehe Anwendungsbeispiele.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Trennung

Grundlage der vorliegenden Untersuchung war das Trennverhalten der gesättigten und ungesättigten C_2 - C_6 -Carbonsäuren auf unbelegtem Chromosorb 101. Bei optimalen Bedingungen konnten die Angaben von Ackman³¹ und Ottenstein und Bartley²⁸ bestätigt werden, allerdings wiesen die Paare Isovaleriansäure-2-Methylbuttersäure und Valeriansäure-Angelikasäure gleiche Retentionszeit auf und Capron-, Tiglin-, Isocapron- und 3,3-Dimethylacrylsäure waren unscharf getrennt (Tailing, breite Signale).

Die für die Trennung der kritischen Paare notwendige Selektivitätssteigerung der stationären Phase erschien am besten durch Belegung des Chromosorb 101 mit einer geeigneten Trennflüssigkeit erreichbar. Um einen möglichst grossen Polaritätsbereich zu erfassen, wählten wir DEGS, EGA, Carbowax 20M, OV-210 und OV-101; das bereits früher für die Analyse wässriger Carbonsäurelösungen empfohlene FFAP¹⁵ kam wegen der zu geringen Stabilität gegenüber Wasser³² nicht in Betracht. Zum Vergleich belegten wir Chromosorb 101 mit jeweils 6% der flüssigen Phasen—eine 6-8% Beladung hatte sich z.B. für Chromosorb 102 als optimal erwiesen⁴³—und stellten folgende Trenncharakteristika fest: OV-101 brachte die erwartete Verkürzung der Retentionszeiten⁴⁵, eine Veränderung der Elutionsfolge bzw. Verbesserung der Trennleistung im Vergleich zu unbelegtem Chromosorb 101 war nicht zu beobachten. DEGS und EGA ergaben eine ausgezeichnete Auftrennung der C_2 - C_4 -Säuren, Isocapron- und Tiglinsäure überlagerten jedoch; ausserdem zeigte sich starkes Tailing. Bessere Ergebnisse brachte der Einsatz von Carbowax 20M und OV-210; Valerian- und Angelikasäure wiesen nun eine Retentionszeitdifferenz von 0.9 min auf, für 3,3-Dimethylacryl-, Tiglin-, Isocapron- und Capronsäure ergab sich durch die deutliche Verminderung des Tailings eine verbesserte Auflösung; bei dem Paar 2-Methylbuttersäure-Isovaleriansäure deutete eine Schulter das Vorliegen zweier Verbindungen an. Nachdem die Silikonphase auf Grund ihrer Stabilität vorzuziehen war, wurde zunächst die beste Belegungskonzentration für OV-210 ermittelt. Das Optimum lag bei der bisher verwendeten 6% Beladung, womit eine Erhöhung der Trennkapazität nur durch Verlängerung der Säule und gleichzeitige Reduktion des I.D. zu erreichen war. In der Praxis erwiesen sich Säulen mit 1 mm I.D. am besten geeignet, weil sich die Füllung ohne grossen technischen Aufwand durchführen liess. Die entsprechenden Analysen zeigten eine deutliche Verbesserung der Trennleistung (Fig. 1 und 2): Valerian- und Angelikasäure waren nun für eine quantitative Bestimmung ausreichend getrennt, 2-Methylbutter- und Isovaleriansäure wiesen eine Retentionsdifferenz von

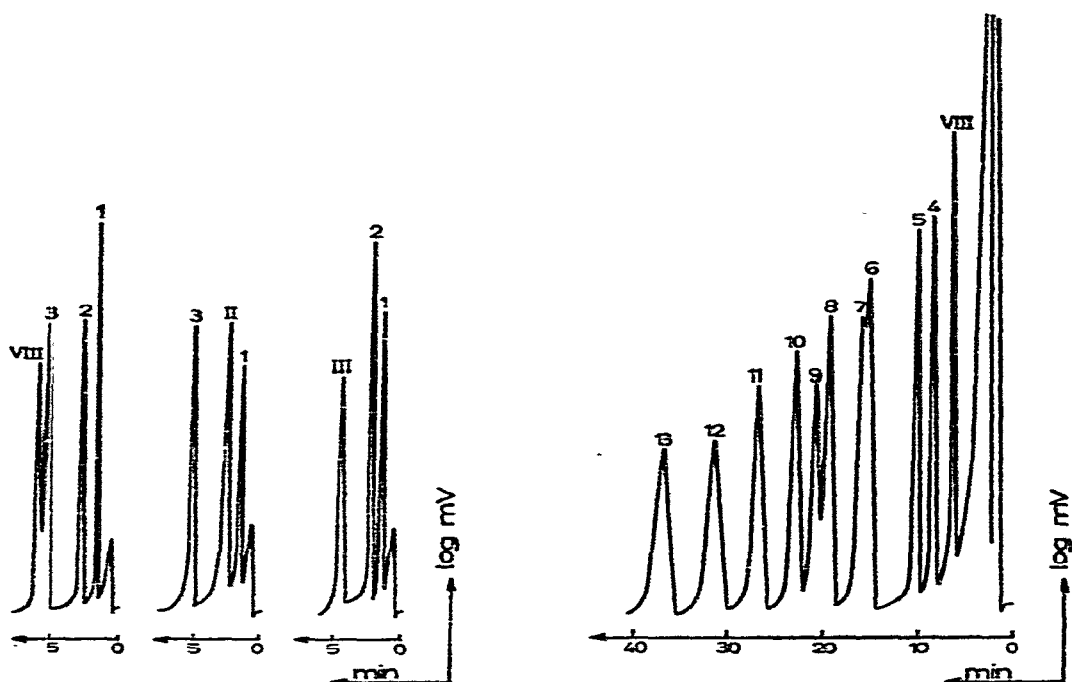


Fig. 1. Gaschromatographische Bestimmung von Essig- und Propionsäure aus wässriger Lösung unter Verwendung verschiedener innerer Standards; 1 = Ameisensäure, 2 = Essigsäure, 3 = Propionsäure; II = Isobutanol, III = *n*-Butanol, VIII = Pentanol-3.

Fig. 2. Gaschromatographische Bestimmung der C₄-C₆-Carbonsäuren aus wässrig-methanolischer Lösung; 4 = Isobuttersäure, 5 = *n*-Buttersäure, 6 = Isovaleriansäure, 7 = 2-Methylbuttersäure, 8 = *n*-Valeriansäure, 9 = Angelikasäure, 10 = 3,3-Dimethylacrylsäure, 11 = Tiglinsäure, 12 = Isocaproensäure, 13 = *n*-Capronsäure; VIII = Pentanol-3.

0.9 min auf und die Flächen wurden bei Vorliegen günstiger Mengenverhältnisse vom Integrator einzeln erfasst. Für den Nachweis von Essigsäure empfahl sich die Einspritzung wässriger Lösungen, da Methanol, aber auch Dichlormethan empfindlich störten. Unabhängig vom Lösungsmittel zeigten die Peaks der Säuren nur äusserst geringes Tailing.

Wie bereits einleitend erwähnt, war der Vermeidung von "Ghosting"-Effekten vor allem im Hinblick auf die Quantifizierung der Säuren besonderes Augenmerk zu schenken. Obwohl wir allen Probenlösungen einen Überschuss (mindestens 5%) Ameisensäure zusetzten und ausschliesslich Glassäulen mit "on column"-Einspritzung verwendeten, stellten wir zunächst bei nachfolgender Injektion von 1 μ l 5% wässriger Ameisensäure starkes "Ghosting" fest, wobei sich für die einzelnen Säuren exakt gleiche Retentionszeiten und Peakformen ergaben, wie bei normalen Analysen; die Adsorption musste also am Säulenkopf stattgefunden haben. Nach Entfernen der am Säulenanfang sitzenden Glaswolle (diese ist für den Verschluss von Säulen mit 1 mm I.D. nicht notwendig) fanden wir nach sechsmaliger Injektion eines Testgemisches —es wurden von jeder Säure jeweils 3 μ g dosiert— keinerlei Anzeichen von "Ghosting". Dies bestätigte die Ergebnisse von Geddes und Gilmour⁴⁶ und zeigte die Eignung der Säulenpackung (6% OV-210 auf Chromosorb 101) für die quantitative Analyse

kurzkettiger Carbonsäuren; dadurch erübrigte sich auch die Zumischung von Ameisensäure zum Trägergas.

Quantifizierung

Bei der Untersuchung biologischen Probenmaterials war mit der Ablagerung bzw. Zersetzung verschiedener Begleitstoffe im Injektionsbereich der Säulen zu rechnen, wodurch unerwünschte Adsorption der freien Carbonsäuren eintreten kann⁴⁶. Um daraus resultierende systematische Fehler auszuschliessen, empfahl sich die Verwendung eines inneren Standards mit geringer Adsorptionstendenz. Am besten geeignet erschienen im Handel erhältliche, niedermolekulare Ketone, aber auch Alkohole, da das früher vorgeschlagene Cyclohexanon³¹ vor allem für die Analyse der Essig- und Propionsäure aus wässriger Lösung zu lange Retentionszeiten aufwies. Folgende Verbindungen wurden auf ihre Eignung geprüft: *n*-Propanol (I), Isobutanol (II), *n*-Butanol (III), Isoamylalkohol (IV), *n*-Amylalkohol (V), *tert.*-Amylalkohol (VI), Pentanol-2 (VII), Pentanol-3 (VIII), Methyläthylketon (IX) und Isobutylmethylketon (X). Während IX im Lösungsmittelpeak lag, überlappten die Peaks von I und II mit Essigsäure, III, VI, VII und VIII mit Propionsäure und IV, V und X mit Isobuttersäure. Es waren daher für die quantitative Bestimmung je nach Analysenproblem verschiedene Standards vorzusehen: Proben, die keine oder nur relative geringe Mengen Propionsäure enthielten, liessen sich am besten unter Verwendung von VIII bestimmen. Bei Vorliegen grosser Mengen Propionsäure bot sich als Standard V an, wobei allerdings Isobuttersäure störte. Selbstverständlich konnte die rasche Analyse der Proben, in denen nur Essigsäure zu erwarten war, mittels III und solcher mit Propionsäure unter Anwendung von II als Standard vorgenommen werden. Um die allgemeine Anwendbarkeit des Verfahrens zu gewährleisten, wurden für alle diese Möglichkeiten Eichungen durchgeführt (Fig. 1 und 2; Tabelle I).

Die in Tabelle I angegebenen relativen Standardabweichungen brachten im geprüften Konzentrationsbereich für alle Carbonsäuren eine wesentlich bessere Analysengenauigkeit als mit unbelegtem Chromosorb 101¹⁴. Da für alle Säuren Regressionsgerade resultierten, die durch den Nullpunkt verliefen und die Ansprechempfindlichkeiten für äquivalente Gewichte der gesättigten Säuren im Vergleich zu früheren Angaben⁴⁴ im Mittel nur um 5.7% differierten, war die Eignung des vorgeschlagenen GLSC-Systems für quantitative Analysen bewiesen.

Anwendungsbeispiele

Die Möglichkeit der direkten Analyse wässriger bzw. wässrig-methanolischer Lösungen der freien Carbonsäuren hatte gleichzeitig auch eine Vereinfachung der Probenvorbereitung zur Folge, da sich zeitaufwendige Extraktionsprozesse mit organischen Lösungsmitteln erübrigten. Der Säuregehalt aller natürlichen Ester, welche wir als Testsubstanzen heranzogen, konnte nach folgendem, einfachem Verfahren ermittelt werden: Man löst die Probe in Wasser, Wasser-Methanol oder Methanol und versetzt mit dem entsprechenden Hydrolysereagens. Nach der Verseifung wird das Methanol möglichst vollständig entfernt, aus einer Stammlösung der innere Standard zugesetzt und in genügendem Überschuss mit Ameisensäure angesäuert. Diese Lösung dient zur gaschromatographischen Bestimmung von Essigsäure und/oder Propionsäure. Nach Verdünnen mit Methanol auf das doppelte Volumen (Löslichkeit der C₆-Säuren) können die C₆-C₆-Carbonsäuren analysiert werden.

Die Bestimmung des Isovaleriansäuregehaltes von Bornylisovalerianat ergab

TABELLE I

STANDARDBRECHUNGSKORREKTURFAKTOREN (F) UND RELATIVE STANDARDABWEICHUNGEN (s_r , rel.) BEI DER ANALYSE VON TESTGEMISCHEN MIT VERSCHIEDENEN INNEREN STANDARDS

Es wurden jeweils 0,2–0,8 μ l dosiert; Essigsäure und Propionsäure in wässriger Lösung, alle anderen Säuren in Methanol-Wasser (1:1), wobei sich gleiche Korrekturfaktoren wie in Dichlormethanol-Lösung ergaben.

Säure	Konzentrationsbereich (μ g/ μ l)	Standard	Zuwaage Standard (μ g/ μ l)	F	s_r , rel. (%)
Essigsäure	0.34–3.4	<i>n</i> -Butanol	0.32	3.42	± 2.22
Essigsäure	0.66–3.3	<i>n</i> -Amylalkohol*	1.95	3.66	± 4.24
Propionsäure	0.65–3.3	<i>n</i> -Amylalkohol	1.95	1.98	± 2.67
Propionsäure	0.64–3.6	Isobutanol	0.32	1.83	± 3.89
Isobuttersäure	0.64–3.2	Pentanol-3	2.03	1.54	± 2.22
<i>n</i> -Buttersäure	0.66–3.3	Pentanol-3	2.03	1.58	± 1.62
2-Methylbuttersäure**	0.80–4.0	Pentanol-3	2.03	1.36	± 2.94
Isovaleriansäure	0.62–3.1	Pentanol-3	2.03	1.36	± 2.80
<i>n</i> -Valeriansäure	0.64–3.2	Pentanol-3	2.03	1.40	± 2.14
Angelikasäure	0.52–1.6	Pentanol-3	2.03	1.45	± 1.61
3,3-Dimethylacrylsäure	0.65–3.2	Pentanol-3	2.03	1.47	± 2.45
Tiglinsäure	0.66–3.3	Pentanol-3	2.03	1.57	± 2.80
Isocaproensäure	0.64–3.2	Pentanol-3	2.03	1.44	± 2.36
<i>n</i> -Capronsäure	0.67–3.3	Pentanol-3	2.03	1.42	± 1.97

* *n*-Amylalkohol und Pentanol-3 wiesen die gleiche molare Ansprechempfindlichkeit auf.

** 2-Methylbuttersäure und Isovaleriansäure wurden aus unterschiedlichen Testgemischen bestimmt.

nach zweistündiger Verseifung mit 10% methanolischer Kalilauge bei 90° eine Wiederfindungsrate von 99%. Bei der Analyse des Essigsäureanteils in Bornylacetat fanden wir bei einer Reaktionstemperatur von 50° 96.5% und bei 90° 98% der vorausgerechneten Menge.

Zur Ermittlung des Essigsäuregehaltes von α -Acetyldigoxin waren wesentlich mildere Verseifungsbedingungen möglich. Bereits nach einstündigem Erwärmen mit 5% methanolischer Kalilauge auf 45° wiesen wir 98% des berechneten Säuregehaltes nach.

Estersaponine behalten meist auch nach Verseifung ihre oberflächenaktiven Eigenschaften, wodurch bei Ausschüttelung mit organischen Lösungsmitteln stabile Emulsionen entstehen können. Durch die Möglichkeit der direkten Einspritzung wässriger Lösungen war es mit dem neuen Verfahren möglich, dieses Problem zu umgehen. Bei der Untersuchung von kristallisiertem "Aescin" wiesen wir Essig-, Isobutter-, 2-Methylbutter-, Angelika- und Tiglinsäure nach; die quantitative Auswertung ergab ein molares Verhältnis von 10:1:1:4:5.5, welches die C₄-C₅-Säuren betreffend ziemlich genau mit früheren Angaben¹¹ übereinstimmte, der um 10% höhere Essigsäureanteil lässt sich auf die verbesserte Probenvorbereitung zurückführen. Aus den entsprechenden Chromatogrammen (Fig. 3) ist ersichtlich, dass die weitgehende Entfernung des bei der Hydrolyse verwendeten Methanols eine verbesserte Auflösung von Essigsäure- und Lösungsmittelpeak zur Folge hat.

Die Grenzen des vorgeschlagenen Verfahrens wurden bei der Bestimmung des

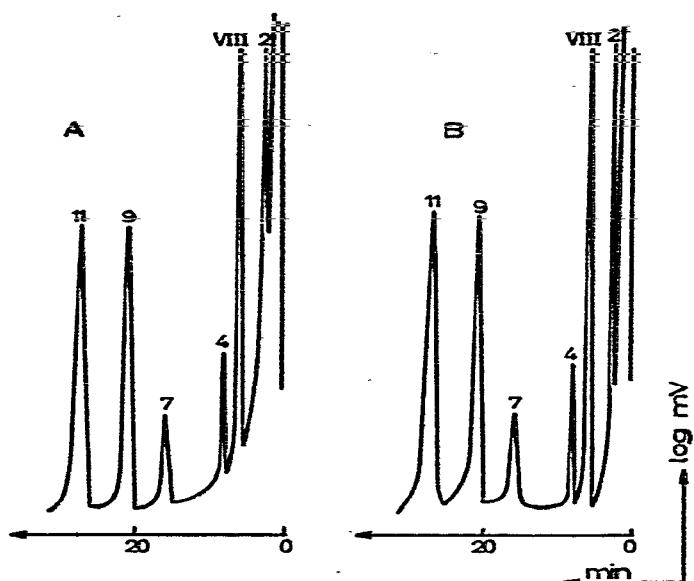


Fig. 3. Gaschromatographische Bestimmung der in Aescin enthaltenen Carbonsäuren; A = wässrigmethanolische Lösung, B = wässrige Lösung (Methanol weitgehend entfernt); 2 = Essigsäure, 4 = Isobuttersäure, 7 = 2-Methylbuttersäure, 9 = Angelikasäure, 11 = Tiglinsäure; VIII = Pentanol-3.

Säuregehaltes von Valepotriaten deutlich. Zunächst erhielten wir bei Valtrat sowie auch bei Didrovaltrat eine Wiederfindungsrate von 99% Essigsäure und 102% Isovaleriansäure. Nach mehreren Analysen trat jedoch bei Nachspritzen von Ameisensäure deutliches "Ghosting" auf, welches durch Kondensate in der Einspritzzone der Säule verursacht wurde. Die Einspritzlösungen waren auch nach schonendster Verseifung durch Reaktionsnebenprodukte, die sich mit organischen Lösungsmitteln nicht extrahieren ließen, tiefbraun gefärbt. Obzwar sich nach Reinigung und Neufüllen des Säulenansfangs immer zufriedenstellende Wiederfindungsraten erzielen ließen, machte dieses Beispiel deutlich, dass bei der direkten analytischen Erfassung der freien C_2 - C_6 -Carbonsäuren aus biologischen Material eine ständige Prüfung des gaschromatographischen Systems durch Nachspritzen von wässriger Ameisensäure und laufende Kontrolle der Standardkorrekturfaktoren zu erfolgen hat. Unter dieser Voraussetzung erfüllt das neue Verfahren alle Anforderungen bezüglich Genauigkeit und Einfachheit. Der technische Aufwand ist relativ gering, da die erforderlichen Glassäulen an jeden Gaschromatographen, der "on column"-Injektion erlaubt, angeschlossen werden können.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine neues Gas-Liquid-Solid-Chromatographie-Verfahren (Stationäre Phase, 6% OV-210 auf Chromosorb 101) erlaubt unter Verwendung von mikrogepackten Glassäulen ohne Sättigung des Trägergases mit Ameisensäuredämpfen die Trennung und Bestimmung von Essig-, Propion-, Isobutter-, *n*-Butter-, 2-Methylbutter-, Isovalerian-, *n*-Valerian-, Isocapron-, *n*-Capron-, 3,3-Dimethylacryl-, Angelika- und

Tiglinsäure aus natürlich vorkommenden Estern. Die Quantifizierung erfolgt unter Verwendung von innerem Standard, die untere Grenze des linearen Bereichs liegt bei 0.1 µg/Injektion. Die allgemeine Anwendbarkeit der neuen Methode wird an Hand der Analyse des Säuregehaltes von Bornylacetat, Bornylisovalerianat, α -Acetyldigoxin, kristallisiertem "Aescin", Valtrat und Didrovaltrat demonstriert; die Wiederfindungsraten liegen zwischen 96.5 und 102%. Vor- und Nachteile —z.B. das Auftreten von "Ghosting" nach Injektion stark verunreinigter Proben— werden diskutiert.

DANK

Für die Überlassung von Vergleichssubstanzen danken wir der Fa. Dragoco, Wien, Österreich, und Herrn Dr. P. W. Thies, Kali-Chemie, Pharma, Hannover, B.R.D.

LITERATUR

- 1 M. Wichtl, *Die Pharmakognostisch-Chemische Analyse*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, 1971.
- 2 R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. 2-4, Birkhäuser, Basel, Stuttgart, 1973.
- 3 G. Baumgarten, *Die herzwirksamen Glykoside*, Georg Thieme, Leipzig, 1963.
- 4 P. W. Thies, *Tetrahedron Lett.*, (1970) 2471.
- 5 A. K. Barua, S. P. Dutta and S. K. Pal, *J. Indian Chem. Soc.*, 44 (1967) 991.
- 6 K. Hiller, M. Keipert und S. Pfeifer, *Pharmazie*, 24 (1969) 119.
- 7 R. Kuhn und I. Löw, *Tetrahedron Lett.*, (1966) 1899.
- 8 W. Stöcklin, E. Weiss und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 50 (1967) 474.
- 9 R. Tschesche, B. Tjoa und G. Wulff, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 696 (1966) 160.
- 10 R. Tschesche, A. Weber und G. Wulff, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 721 (1969) 209.
- 11 G. Wulff und R. Tschesche, *Tetrahedron*, 25 (1969) 415.
- 12 J. Jurenitsch, E. Haslinger und W. Kubelka, *Pharmazie*, 34 (1979) 445.
- 13 E. Hoffstein, M. Keipert und K. Hiller, *Pharmazie*, 25 (1970) 366.
- 14 G. C. Cochran, *J. Chromatogr. Sci.*, 13 (1975) 440.
- 15 J. J. van Huyssteen, *Water Res.*, 4 (1970) 645.
- 16 G. Raupp, *Angew. Chem.*, 71 (1959) 284.
- 17 R. G. Ackman und R. D. Burgher, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 647.
- 18 R. B. Jackson, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 306.
- 19 G. W. Lanigan und R. B. Jackson, *J. Chromatogr.*, 17 (1965) 238.
- 20 R. B. Jackson, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 251.
- 21 R. B. Jackson, *J. Chromatogr.*, 22 (1966) 261.
- 22 B. Kaplanová und J. Janák, *Mikrochim. Acta*, (1966) 119.
- 23 V. Mahadevan und L. Stenroos, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1652.
- 24 W. K. Lee und R. M. Bethea, *J. Gas Chromatogr.*, 6 (1968) 582.
- 25 H. W. Doelle, *J. Chromatogr.*, 39 (1969) 398.
- 26 B. Bartoniček und S. Lukač, *Chromatographia*, 3 (1970) 108.
- 27 H. G. Henkel, *J. Chromatogr.*, 58 (1971) 201.
- 28 D. M. Ottenstein und D. A. Bartley, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 673.
- 29 D. M. Ottenstein und D. A. Bartley, *Anal. Chem.*, 43 (1971) 952.
- 30 R. G. Ackman, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 506.
- 31 R. G. Ackman, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 560.
- 32 A. Di Corcia und R. Samperi, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 140.
- 33 J. E. Tyler und G. H. Dibdin, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 71.
- 34 F. Bruner, P. Ciccio, E. Brancaleoni und A. Longo, *Chromatographia*, 8 (1975) 503.
- 35 I. Repasova und A. Vanko, *Petrochemia*, 16 (1976) 41.
- 36 T. E. Bohannon, G. Manius, F. Mamaril und Lan-Fun Li Wen, *J. Chromatogr. Sci.*, 16 (1978) 28.
- 37 J. C. du Preez und P. M. Lategan, *J. Chromatogr.*, 150 (1978) 259.

- 38 S. B. Dees und C. W. Moss, *J. Chromatogr.*, 171 (1979) 466.
- 39 K. I. Sakodinsky, G. A. Smolyaninow, V. Y. Zelvensky und N. A. Glotova, *J. Chromatogr.*, 172 (1979) 93.
- 40 V. G. Berezkin, L. A. Shkolina, V. N. Lipavsky, A. A. Serdan und V. A. Barnov, *J. Chromatogr.*, 141 (1977) 197.
- 41 F. Bruner, P. Ciocioli und G. Bertoni, *J. Chromatogr.*, 90 (1974) 239.
- 42 J. H. Williams, *J. Chromatogr.*, 5 (1961) 457.
- 43 R. Kaiser, *Chromatographie in der Gasphase*, Bd. III und IV, Hochschultaschenbücher Nr. 24/24a und 472/472a, Bibliographisches Institut, Mannheim, Zürich, 2. Aufl., 1969.
- 44 R. E. Buckles und G. V. Mock, *J. Org. Chem.*, 15 (1950) 680.
- 45 Fa. Johns-Manville, *Chromasorb Century Series*, No. 4, 1974.
- 46 D. A. M. Geddes und M. N. Gilmour, *J. Chromatogr. Sci.*, 8 (1970) 394.
- 47 R. G. Ackman und J. C. Sipos, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 298.