

Note

Die Bedeutung der Fließmittel-Temperatur in der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie vorgestellt an einigen praktischen Beispielen

R. KLAUS

E. Merck, Postfach 4119, D-6100 Darmstadt 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 2. August 1983; geänderte Fassung eingegangen am 25. August 1983)

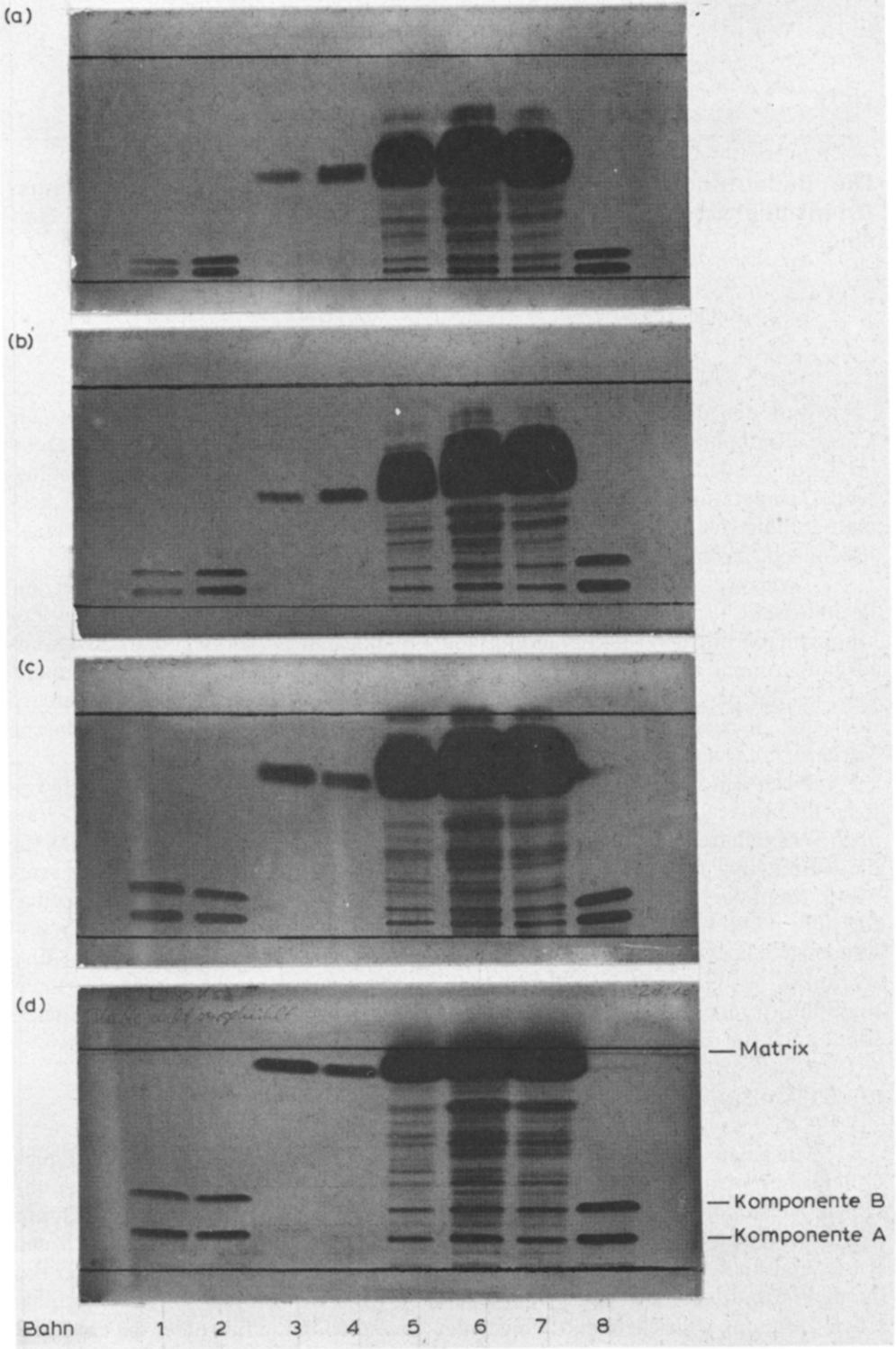
Von den die Flüssigkeitschromatographie bestimmenden Parametern ist die Chromatographie-Temperatur wohl die einzige Variante, welche bisher vorwiegend im Zusammenhang mit Fehlerbetrachtungen wie unerwünschte, R_F -Wert beeinflussende Temperaturgradienten in Chromatographiegefäßen bei der Dünnschichtchromatographie (DC), bzw. Stabilitätskriterien bei der Refraktion der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)¹ erwähnt wird.

Zwar werden Versuche, die Chromatographie-Temperatur als Mittel zur Beeinflussung der chromatographischen Trennung heranzuziehen erstmals im Zusammenhang mit der Fraktionierung von Lipidklassen in der Argentions-Dünnschichtchromatographie², der Trennung von Phosphoglyceriden³ und Thiopurinen⁴ bzw. bei der papierchromatographischen Trennung von Kationen⁵ beschrieben, jedoch erst in neuester Zeit wird häufiger auf diese flüssigkeitschromatographische Variante hingewiesen^{6,7}.

Nach den in der Literatur gemachten Angaben sind abhängig von der jeweiligen Problemstellung verbesserte Auflösungsvermögen sowohl mit erhöhter⁸⁻¹² als auch verminderter Temperatur¹³⁻¹⁷ erreichbar. Ein wesentlicher Gesichtspunkt für die Ausnutzung eines solchen Effektes in der Praxis ist der hierfür erforderliche Aufwand. Besonders günstig ist diese Relation bei der DC-„Tiefemperatur“-Chromatographie. Die in der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) verwendeten Steiggefäße für Plattenformate von 20 × 10 cm können in normalen Kühlschränken mit Gefrierfach in diesen ohne weiteres untergebracht werden. Chromatographie-Temperaturen bis -20°C sind, Fluidität des Steigmittels vorausgesetzt, somit auch für die Routineanalytik möglich.

RÜCKSTANDSANALYTIK DES VITAMIN C-BEREICHES

Mit einem ersten Anwendungsfall aus der Rückstandsanalytik des Vitamin C-Bereiches wird die Systematik des Effektes vorgestellt. Die Anwendung dünn-schichtchromatographischer Methoden bietet z.B. bei der Fabrikationsüberwachung der Zuckerchemie sehr gute analytische Möglichkeiten. Im vorliegenden Fall der Rückstandsanalytik aus dem Ascorbinsäurebereich sind jedoch zusätzliche, über die durch Fließmittelvariationen hinausgehende Verbesserungen der chromatographischen Trennung wünschenswert. Neben der Bandauftragung führt hier die erwähnte



Verminderung der Chromatographie-Temperatur zu einer wesentlichen Beeinflussung des chromatographischen Auflösungsvermögens. Fig. 1 zeigt die im Temperaturbereich +20 bis -20°C entwickelten Chromatogramme.

Man beachte die ausgezeichnete Trennung selbst bei Probenauftragsmengen im Milligramm-Bereich. Diesem wesentlichen Gesichtspunkt der hier zu umschreibenden Analyse wird, wie eine Literaturdurchsicht zeigt, offenbar nur zu wenig analytische Bedeutung beigemessen. Dies ist um so erstaunlicher als darin eine Stärke der DC z.B. in der Spurenanalytik bzw. bei indirekten Gehaltsbestimmungen liegt. Fig. 2 zeigt dann die Remissionskurven der Bahnen 1-8 eines Chromatogrammes für die quantitative Analyse von zwei mit A und B bezeichneten Komponenten. Den nicht identifizierten Komponenten ist die spezifische Absorption der Matrix zugrunde gelegt, wodurch diese Bestimmung einen halbquantitativen Charakter erhält. Ermittelt wurden je 5 µl Probelösung

	Probe (µg)		
	Bahn 2	Bahn 3	Bahn 4
Komponente A	4.7	14.0	4.0
Komponente B	3.4	9.0	2.2
Σ (restlichen Komponenten berechnet als Matrixverbindung)	20	46	12

AFLATOXINE IN MILCHEXTRAKTEN

Bewertet man die Bedeutung der Aflatoxine für die Lebensmittelchemie nach der Anzahl der analytischen Publikationen, so muss deren qualitative und quantitative Bestimmung von äusserster Wichtigkeit sein¹⁸⁻²⁵. Der Nachweis erfolgt in der Flüssigkeitschromatographie vorwiegend über die Eigenfluoreszenz der Mycotoxine. Hierdurch dürfte eine gewisse Bevorzugung der DC-Methoden gegenüber den HPLC-Verfahren zu erklären sein.

Die in der Literatur angegebenen DC-chromatographischen Trennungen der mit B₁, B₂, G₁ und G₂ bezeichneten Komponenten sind allerdings selbst nach Mehrfach-Entwicklungen zum Teil nicht voll befriedigend. Eine wesentliche Verbesserung des Auflösungsvermögens wird auch bei diesem analytischen Problem durch eine Verminderung der Chromatographietemperatur der allgemein verwendeten Fliessmittelsysteme erreicht. Als weiteres Mittel zur Verbesserung der Trennung wird wiederum mit der Banden-Auftragstechnik gearbeitet. Hierfür eignen sich neben den handelsüblichen Auftragsgeräten HPTLC-Fertigplatten mit Konzentrierungszone.

Fig. 3 zeigt einige Chromatogramme zur Veranschaulichung. Als Fliessmittelsystem ist für alle Trennungen eine Mischung von Chloroform und Aceton im

Fig. 1. Temperatureinfluss auf eine chromatographische Trennung bei Analysen im Vitamin C-Bereich. Schicht: HPTLC Kieselgel 60 oF. Auftragung: Kapillare 5 µl-Band: Bahn 1, 2, 3, 4 und 8 Vergleichsbahnen; Bahn 5, Probe 3; Bahn 6, Probe 2; und Bahn 7, Probe 1. Fliessmittel: Chloroform-Methanol (95:5). Steighöhe: 1 × 65 mm. (a) Kammersättigung, Chromatographie-Temperatur ca. 23°C; (b) ohne Kammersättigung, Chromatographie-Temperatur ca. 23°C; (c) ohne Kammersättigung, Chromatographie-Temperatur ca. 5°C; (d) ohne Kammersättigung, Chromatographie-Temperatur ca. -20°C. Derivatisierung: *in situ*-Reaktion (sprühen bzw. 10 sec tauchen), Naphthoresorcin 0.2% (Äthanol) 100 ml, Phosphorsäure 85% 10 ml. Nachbehandlung: Trockenschrank ca. 5 min, ca. 100°C. Nachweis: Absorption im Sichtbaren.

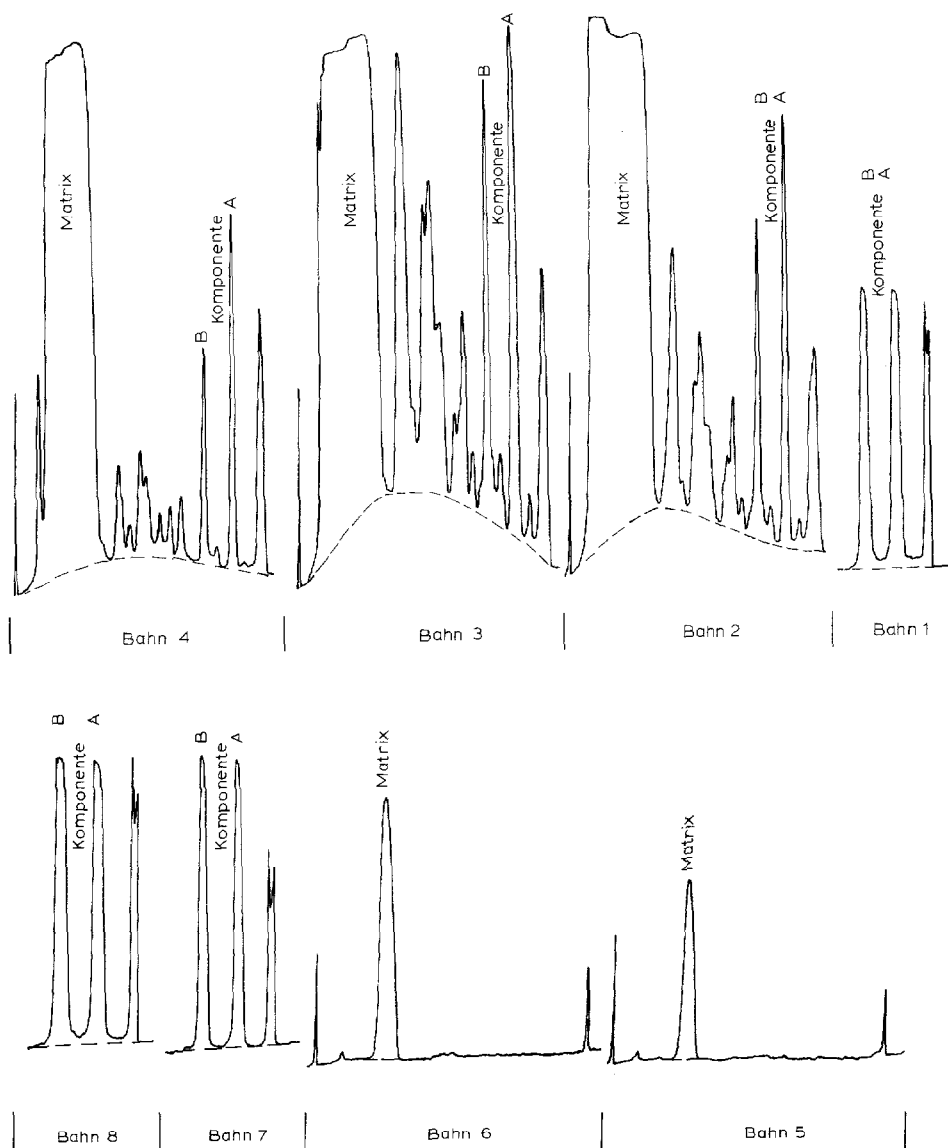


Fig. 2. Absorptionsortskurven der Bahnen 1-8 eines für die quantitative Analyse der Komponenten A und B vorbereiteten Chromatogrammes. Chromatogrammspektralphotometer, Lichtführung: Remission, Wellenlänge: $\lambda = 546.1$ nm. Messfläche: 0.05×6 mm. Schreibermessbereich: Bahn 1, 5, 6, 7 und 8, 1000 mV; Bahn 2, 3 und 4, 500 mV. Auftragsmengen: Bahn 1 u. 8, Komponente A und B je $29.6 \mu\text{g}$; Bahn 7, Komponente A und B je $16.2 \mu\text{g}$; Bahn 5, Matrix, $10.2 \mu\text{g}$; Bahn 6, Matrix, $25.4 \mu\text{g}$; Bahn 2, Probelösung 1; Bahn 3, Probelösung 2; Bahn 4, Probelösung 3.

Verhältnis 88:12 verwendet. Im einzelnen gibt Fig. 3 Chromatogramme mit Normaltemperaturchromatographie bei Punktauftragung (Fig. 3a) bzw. Bandauftragung (Fig. 3b) wieder. Trennungen der Vergleichslösung mit (-20°C)-Band-Chromato-

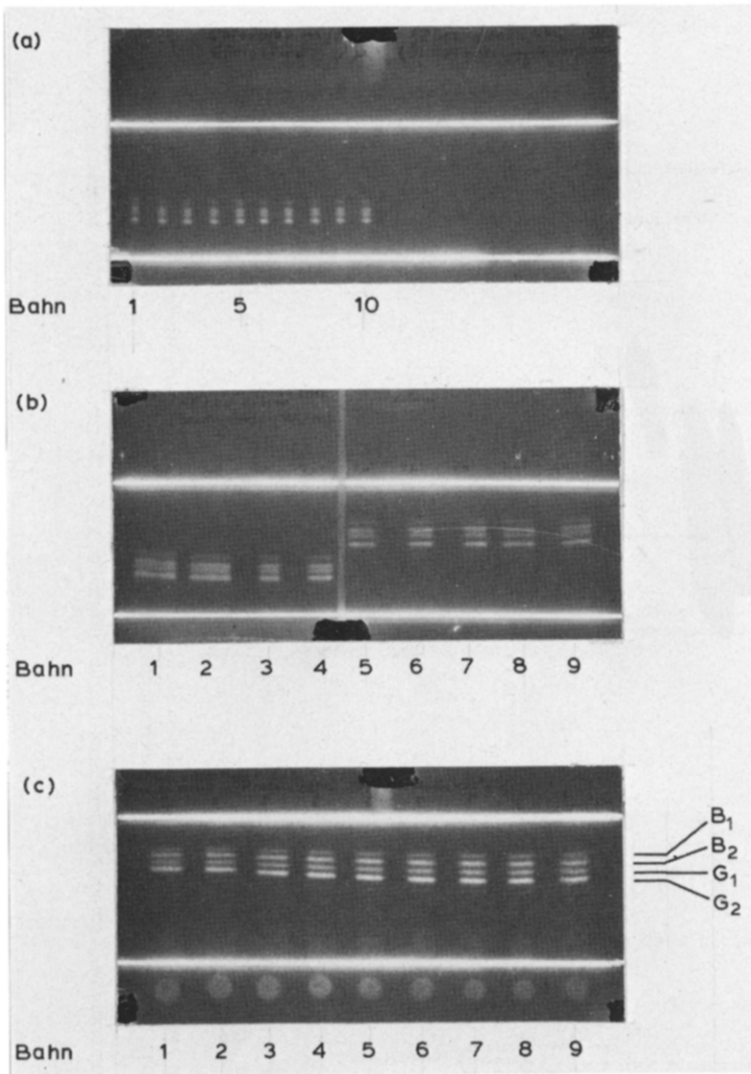


Fig. 3. Chromatographische Trennung von Aflatoxinen bei verschiedenen Auftragsarten und Chromatographie-Temperaturen. Schicht: (a) und (b), HPTLC Kieselgel 60 oF; (c), HPTLC Kieselgel 60 oF mit Konzentrierungszone. Fließmittel: Chloroform-Aceton (88:12). Normalkammer ohne Kammersättigung. Chromatographie-Temperatur: (a) und (b) *ca.* 23°C; (c) -20°C. Steighöhe: (a) 1 × 50 mm; (b) 1 × 50 mm bzw. 2 × 50 mm; (c) 1 × 55 mm. Derivatisierung: ohne. Nachweis: Fluoreszenz. Auftragsmengen: (a) Punkt 1 $\mu\text{l} \cong 10$ ng B₁, B₂, G₁, G₂; (b) Band (manuell) 2 $\mu\text{l} \cong 20$ ng bzw. 5 $\mu\text{l} \cong 50$ ng B₁, B₂, G₁, G₂; (c) Band (Konzentrierungszone) 5 $\mu\text{l} \cong 50$ ng.

graphie verdeutlicht Fig. 3c. Einige Registrierkurven sollen auf die quantitativen Möglichkeiten der erreichten Trennungen aufmerksam machen. Neben Fluoreszenzortskurven bei Bandauftragung, Normaltemperatur und Steighöhen von 1 × 50 mm bzw. 2 × 50 mm (Fig. 4) zeigt Fig. 5 die entsprechenden Kurven bei (-20°C)-Chromatographie-Temperatur.

In der Natur wird nach Literaturangaben neben Käse, Erdnussöl und Weiss-

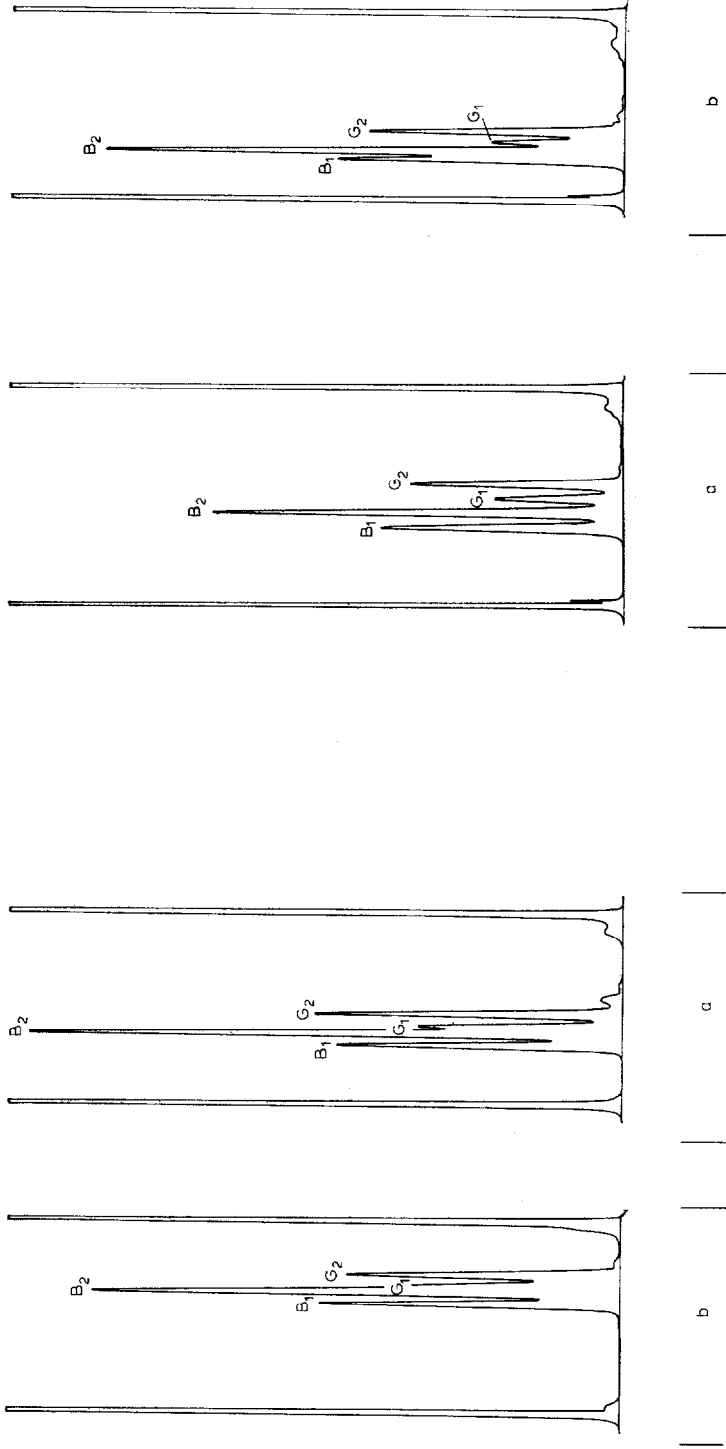


Fig. 4. Fluoreszenzortskurven zweier Bahnen von Fig. 3b. (a) Bahn 6; (b) Bahn 5. Chromatogrammspektrophotometer, Anregungsstrahlung Hg 366; Fluoreszenzstrahlung Wellenlängenintegral; Messfläche, 0.1×10 mm; Schreibmessbereich, 20 mV.

Fig. 5. Fluoreszenzortskurven nach chromatographischer Trennung entsprechend Fig. 3c. Steighöhe: (a) 1×55 mm; (b) 2×50 mm. Messbedingungen analog Fig. 4.

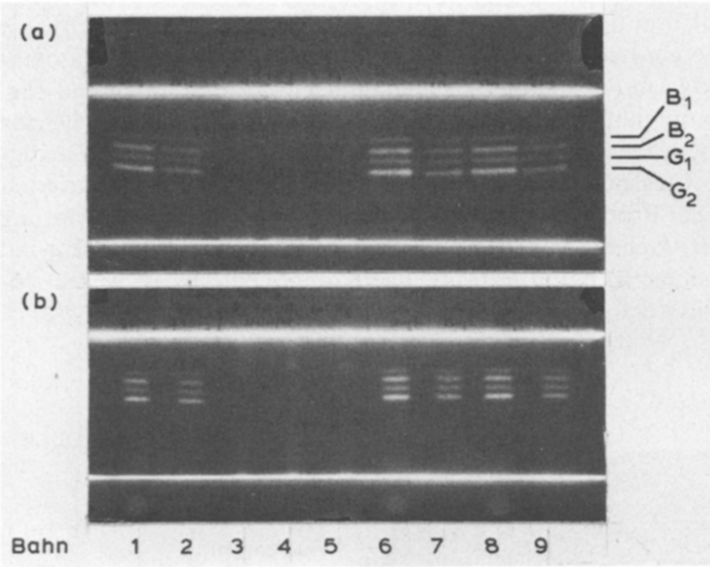


Fig. 6. Aflatoxinanalyse in Milchextrakten P₁, P₂ und P₃. Schicht: (a) HPTLC Kieselgel 60 oF; (b) HPTLC Kieselgel 60 oF mit Konzentrierungszone. Fließmittel: Chloroform-Methanol (88:12). Normalkammer ohne Kammersättigung. Chromatographie-Temperatur: -20°C. Steighöhe: 1 × 55 mm. Derivatisierung: ohne. Nachweis: Fluoreszenz. Auftragung: Auftragsvolumen Mikrokapillare 5 µl. (a) Manuelles Band; (b) Band durch Konzentrierungszone, Bahn 1, 6, 8, Vergleich je 50 ng; Bahn 2, 7, 9, Vergleich je 25 ng; Bahn 3, Probe P₁; Bahn 4, P₂; Bahn 5, P₃.

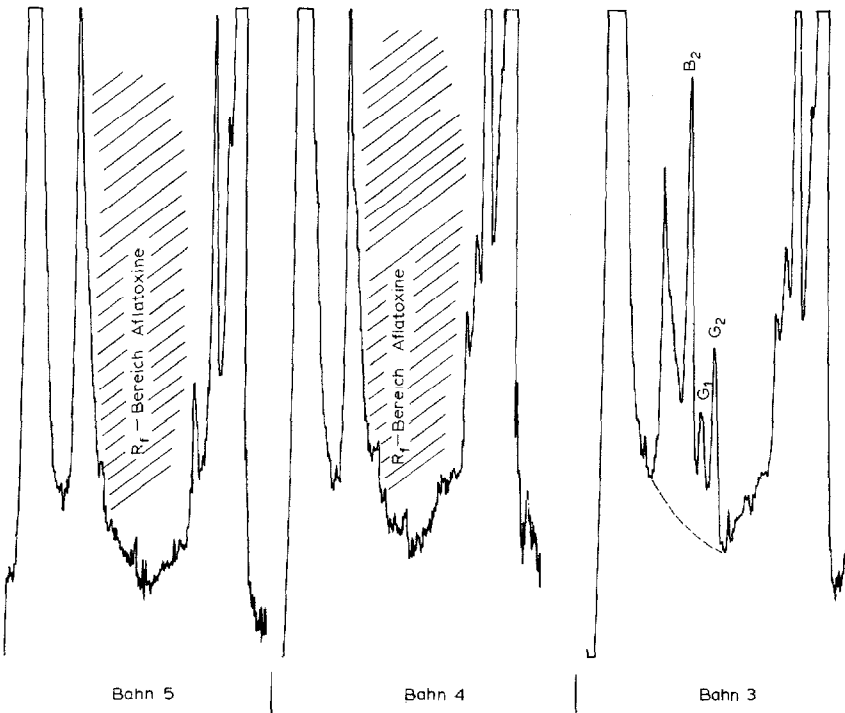


Fig. 7. Fluoreszenzortskurven der Bahnen 3, 4 und 5 des Chromatogrammes Fig. 6b. Spektroskopische Messbedingungen analog Fig. 4, jedoch zusätzlich 100-fache Verstärkung.

brod im Besonderen Milch in unterschiedlichen Konzentrationen von Mycotoxinen befallen²⁶⁻³⁰. Mit Fig. 6 wird daher als praktischer Anwendungsfall eine Aflatoxin-Analyse in Milchextrakten unter optimierten Bedingungen erwähnt. Während Fig. 6a ein Chromatogramm mit manueller Bandauftragung zeigt, wird bei Fig. 6b hierfür eine HPTLC-Platte mit Konzentrierungszone verwendet. Von diesen zeigt Fig. 7 lediglich die gegenüber den Vergleichsbahnen mit 100-facher Verstärkung registrierten Fluoreszenzortskurven der Proben P₁, P₂ und P₃. Die halbquantitative Auswertung ergibt für G₂, G₁ und B₂ Gehalte von 50 ng/ml Extrakt P₁. In den Proben P₂ und P₃ liegen diese Anteile unter 10 ng/ml Extrakt. Die Komponente B₁ ist wegen störender Koinzidenzen unter den gewählten Bedingungen nicht bestimmbar.

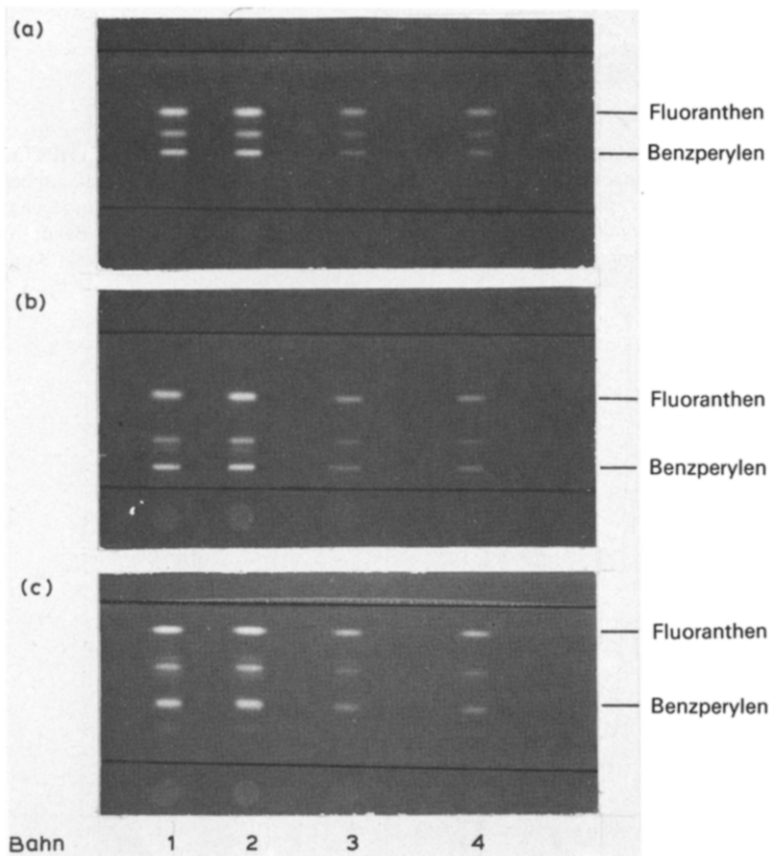


Fig. 8. Chromatographische Trennung polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe bei verschiedenen Bedingungen. Schicht: HPTLC RP-18 oF mit Konzentrierungszone. Fliessmittel: Propanol-2-Acetonitril-Methanol (50:25:25). Normalkammer ohne Kammersättigung. Chromatographie-Temperatur: (a) ca. 23°C; (b) und (c) ca. -20°C. Steighöhe: (a) und (b) 1 × 60 mm; (c) 2 × 60 mm. Derivatisierung: ohne. Nachweis: Fluoreszenz. Auftragung: Auftragsvolumen: Mikrokapillare 5 μ l. Bahn 1 und 2, Idenopyren, Benzperylene, Benzpyren, Benz[k]fluoranthen, Benz[b]fluoranthen je 10 ng, Fluoranthen 50 ng; Bahn 3 und 4, je 5 ng bzw. 25 ng.

SUBSTANZKLASSE DER POLYCYCLISCHEN KOHLENWASSERSTOFFE^{31,32}

Die Substanzklasse der polycyclischen Kohlenwasserstoffe erregt seit Jahrzehnten das Interesse der Spektroskopiker: Neben sehr differenzierten Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren verringern sich die Halbwertsbreiten der Fluoreszenzbanden bei Temperaturen um 100°K beträchtlich^{33,34}. Unter analytischen Gesichtspunkten bedeutet dies eine entsprechende Erhöhung des wellenlängenbezogenen Auflösungsvermögens. Von dieser Möglichkeit wird, wie die einschlägige Literatur zeigt, häufiger auch zu Selektivierungszwecken in der (Lösungs)-Spektroskopie Gebrauch gemacht.

Während die Gegebenheiten der Dünnschichtchromatographie eine Ausnutzung dieses Temperatureffektes nicht zulassen, finden die spektroskopischen Eigenschaften der polycyclischen Aromaten sehr häufig *in situ* Anwendung^{35,36}. Weitere Möglichkeiten zur Verbesserung der DC-chromatographischen Selektivität z.B. bei polycyclischen Isomeren-Analysen bieten sich durch eine sogenannte Mischdünnschichtchromatographie, auch zweidimensional^{37,38}. Differenzberechnungen aus quantitativen Gruppen- und Einzelanalysen³⁹⁻⁴¹ geben ebenso wie photoakustische⁴² und quenchofluorimetrische Komplementärinformationen zu Lumineszenzanalysen^{43,44} Anhaltspunkte auf die Probenzusammensetzung.

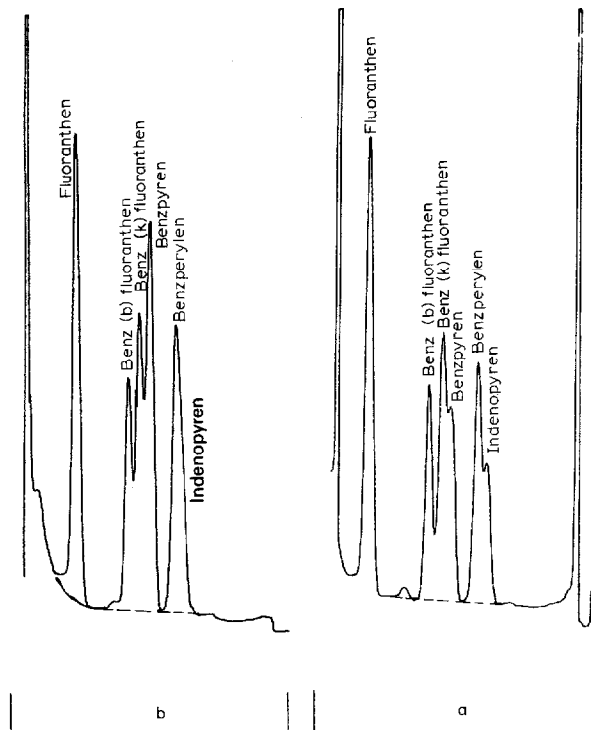


Fig. 9. Konstanz der *in situ*-Fluoreszenz chromatographisch getrennter PAK-Komponenten. (a) Fluoreszenzortskurve der Bahn 2 von Fig. 8c. Registrierung 2 Tage nach der Chromatographie. (b) Fluoreszenzortskurve einer entsprechenden Bahn unmittelbar nach der Chromatographie. Chromatogrammspektrophotometer, Anregungsstrahlung Hg 366; Fluoreszenzstrahlung Wellenlängenintegral; Messfläche, 0,1 × 10 mm; Schreibermessbereich, 20 mV.

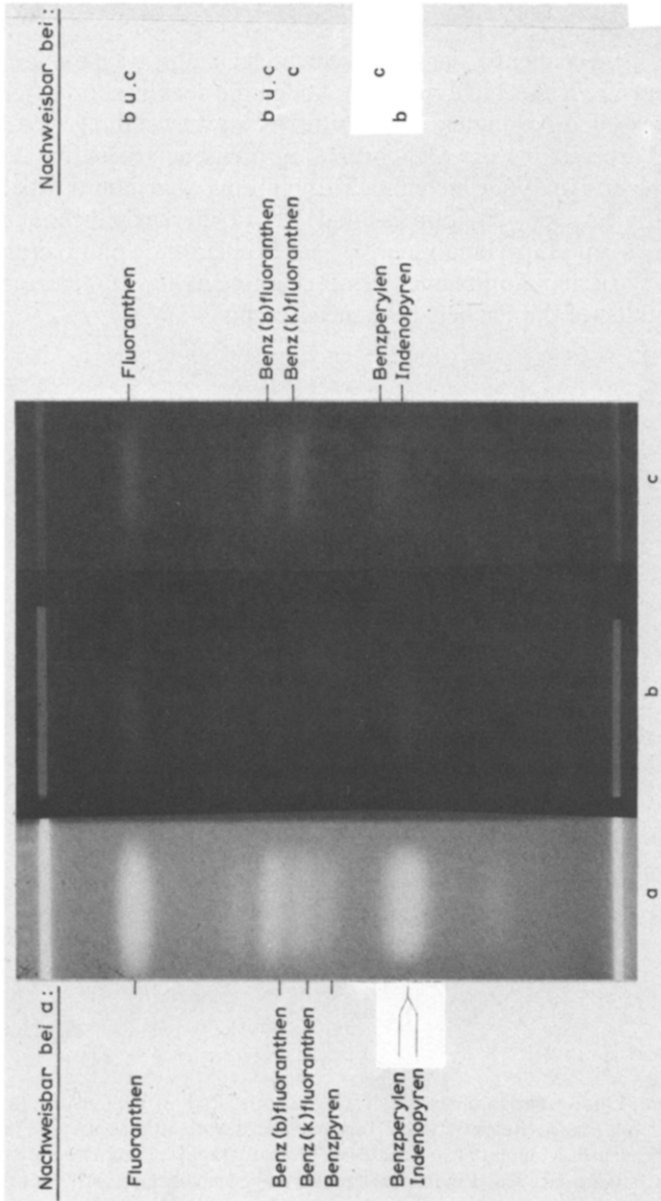


Fig. 10. Visueller chromatischer Nachweis von Indeno[1,2,3-cd]pyren bei Anwesenheit von Benzperylen bei Anwesenheit von Benzperylen, demonstriert mit Bahn 2, Fig. 8c. (a) Photographische Aufnahme ohne Farbfilter; (b) Aufnahme mit Gelbfilter; (c) Aufnahme mit Blaufilter.

Der positive Einfluss der Chromatographie-Temperatur auf den chromatographischen Trenneffekt, dieser soll in Folgenden gezeigt werden, ergänzt schliesslich die zahlreichen spektroskopisch-chemischen Variationsmöglichkeiten. Die Vergrößerung des ortsbezogenen Auflösungsvermögens in der DC bei verminderten Temperaturen wird mit Fig. 8 dokumentiert. Eine im Zusammenhang mit einer Trinkwasserverordnung^{4,5} vom 31.01.1975 bzw. DIN 38 409 (Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Trinkwasser) im Handel erhältliche PAK-Standardlösung ist unter den in der Legende angegebenen Daten chromatographiert. Der Gewinn an Auflösungsvermögen d.h. Trennfähigkeit zwischen den Chromatogrammen Fig. 8a und Fig. 8b ist nicht unbeträchtlich. Fig. 9 gibt die Fluoreszenzortskurven zweier unter (-20°C)-Bedingungen erstellten Chromatogramme mit einer zusätzlichen Interpretationsmöglichkeit wieder. Bei gleichen Auftragsmengen und gleichen Messbedingungen ergeben sich unterschiedliche Messgrößen für die Komponente Benzpyren. Verantwortlich hierfür ist eine auch in der Benzpyren-Lösungsfluorimetrie bekannte zeitliche Instabilität der Benzpyrenfluoreszenz. Während bei Fig. 9b Chromatographie und Registrierung unmittelbar folgen, beträgt bei Fig. 9 a die entsprechende Zeitspanne *ca.* 2 Tage. Diesem Effekt einer violett-Purpur-Fluoreszenzänderung kann bei Koinzidenz-Entscheidungen eine selektivierende Bedeutung zugeschrieben werden.

Eine weitere chromatische Selektivwirkung nach der chromatographischen Trennung wird bei visueller Beurteilung durch Verwendung von Gelb- bzw. Blaufiltern erreicht. Dies betrifft speziell die chromatographisch ungenügend getrennten Komponenten Benzperylen (blau fluoreszierend) und Indenopyren (gelb fluoreszierend). Fig. 10 zeigt eine PAK-Standardbahn photographiert mit den entsprechenden Filtern.

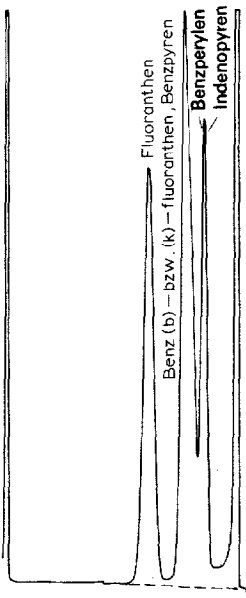


Fig. 11. Fluoreszenzortskurve eines PAK-Chromatogramms nach DIN 38 409 (eindimensionale Technik). Messbedingungen analog Fig. 9.

Der Vollständigkeit halber und zum Vergleich wird mit Fig. 11 die nach den Angaben von DIN 38 409 erreichbare eindimensionale chromatographische Trennung der PAK-Standardmischung angefügt. Von einer in dem DIN-Blatt vorgeschlagenen zweidimensionalen Chromatographie für die quantitative *in situ*-Analyse ist nach allen Erfahrungen mit zweidimensionalen Techniken bei dem sehr vorteilhaften differenzierten spektroskopischen Verhalten der Analysenkomponenten abzuraten.

Routineanalysen von Wasserproben zeigen nicht selten in ihren Fluoreszenzortspektren mit den Vergleichsbahnen nicht korrespondierende Banden. Hier sollte in Ergänzung zu DIN 38 409 für diese nicht identifizierten, aus dem Proceedere

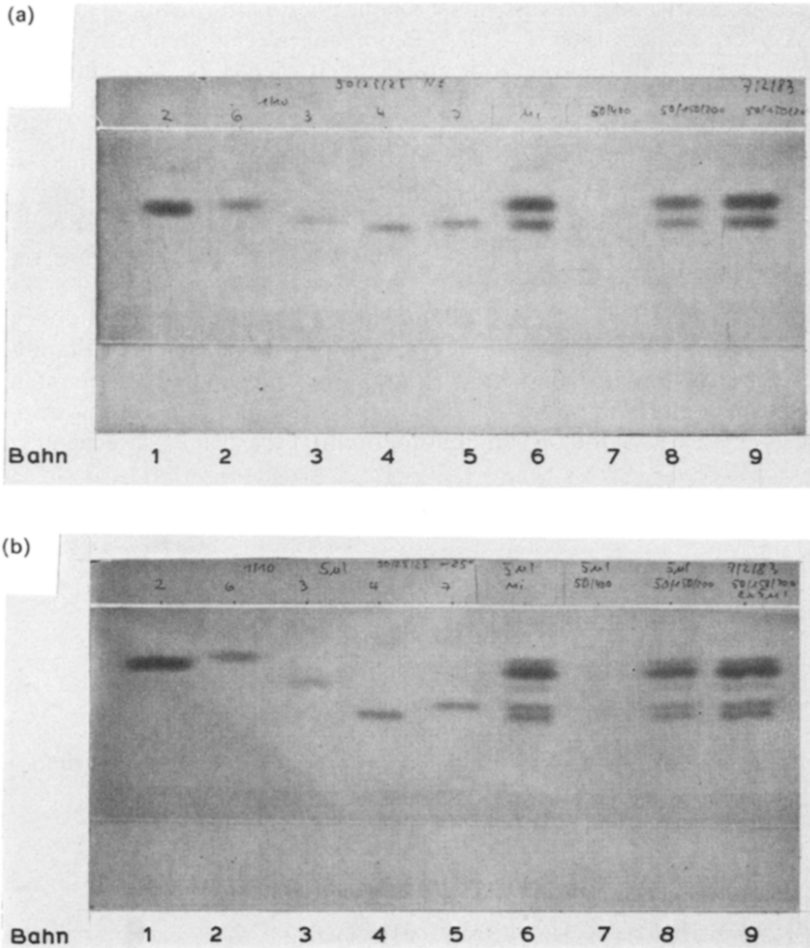


Fig. 12. Chromatographische Trennung einer Gruppe UV-absorbierender polycyclischer Kohlenwasserstoffe bei Chromatographietemperaturen von *ca.* +23°C (a) und *ca.* -20°C (b). Schicht: Fertigplatten HPTLC RP 18 F_{254c} mit Konzentrierungszone. Fließmittel: Propanol-2-Acetonitril-Methanol (50:25:25), Normalkammer ohne Kammerfüllung, Steighöhe: 1 × 6 cm. Auftragsvolumen: 5 µl (Mikrokapillare), Auftragsmengen: Bahn 1: Anthracen 500 ng, Bahn 2: Phenanthren 500 ng, Bahn 3: Pyren 500 ng, Bahn 4: Chrysen 500 ng, Bahn 5: Benzanthracen 500 ng. Bahn 6: Mischung der Komponenten Bahn 1-5 je 500 ng. Bahn 7: Mischung fluoreszierender Komponenten von Fig. 8 im ng-Bereich. Bahn 8: Komponenten Bahn 1-5 je 250 ng + Komponenten von Bahn 7 (5 µl). Bahn 9: analog Bahn 8 jedoch 2 × 5 µl.

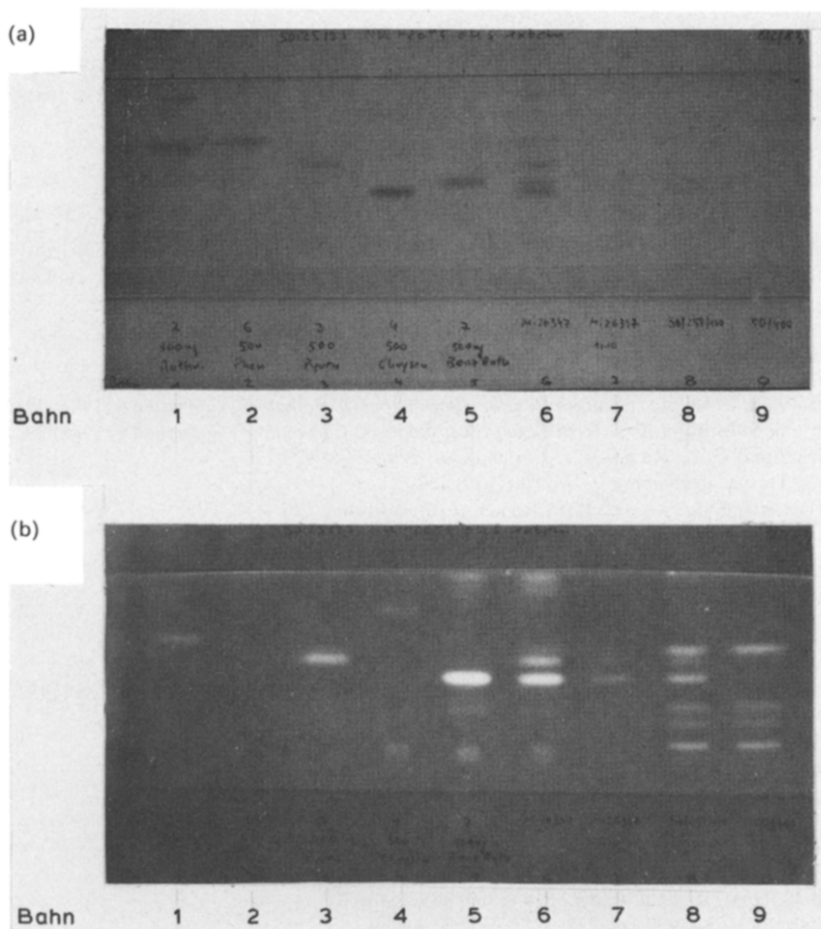


Fig. 13. UV-Absorptionen und Fluoreszenzen der PAK-Gruppen von Fig. 12 und Fig. 8. Schicht Fertigplatten HPTLC RP-18 F_{254s} mit Konzentrierungszone. Fließmittel: Propanol-2-Acetonitril-Methanol (50:25:25), Normalkammer ohne Kammersättigung, Steighöhe 1 × 6 cm. Auftragsvolumen: 5 µl (Mikrokapillare). Auftragsmengen: Bahn 1: Anthracen 500 ng, Bahn 2: Phenanthren 500 ng, Bahn 3: Pyren 500 ng, Bahn 4: Chrysen 500 ng, Bahn 5: Benzanthracen 500 ng, Bahn 6: Mischung der Komponenten Bahn 1-5 (100, 250, 500, 250, 250 ng), Bahn 7: analog Bahn 6 jedoch Verdünnung 1:10, Bahn 8: Komponenten Bahn 1-5 (25, 62.5, 125, 62.5, 62.5 ng) + Indenopyren, Benzperylen, Benzpyren, Benz[k]fluoranthen, Benz[b]fluoranthen je 1.25 ng, Fluoranthen 6.25 ng. Bahn 9: analog Bahn 8 ohne Komponenten Bahn 1-5. Nachweis: UV-Absorption (a), Fluoreszenz (b).

(Extraktion) von DIN 38 409 resultierende, Komponenten eine Schranke eingebaut werden. Geeignet ist hierfür eine halbquantitative Bewertung der unbekannt Komponenten unter Zugrundelegung des Mittelwertes der spezifischen Fluoreszenzen aller sechs Komponenten der PAK-Standardmischung.

Eine zusätzliche Möglichkeit den Informationsgehalt DC-chromatographischer Analysen von polycyclischen Kohlenwasserstoffen zu erhöhen besteht schliesslich in der Verwendung weiterer interessanter Vergleichssubstanzen. Geeignet hierfür erscheint besonders nach der Einführung von RP-18-Schichtmaterialien mit Fluoreszenzindikator und Konzentrierungszone eine UV-absorbierende Gruppe. Fig. 12 zeigt zwei Chromatogramme einer solchen Gruppe bestehend aus Anthracen, Phe-

nanthren, Pyren, Chrysen und Benzantracen in einer Gegenüberstellung mit Chromatographietemperaturen von +23°C (Fig. 12a) und -20°C (Fig. 12b). Mit Fig. 13 werden zwei Chromatogramme wiedergegeben, welche das UV-Absorptions-Fluoreszenz-Verhalten sowohl dieser UV-Absorptionsmischung als auch der Mischung der fluoreszierenden Komponenten von Fig. 8 dokumentieren.

LITERATUR

- 1 J. E. Campbell, M. Hewins, R. J. Lynch und D. D. Shrewsbury, *Chromatographia*, 16 (1982) 162.
- 2 H. K. Mangold, in E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 2. Aufl., 1967, S. 381.
- 3 R. F. Henderson und M. H. Clayton, *Anal. Biochem.*, 70 (1976) 440.
- 4 P. C.-L. Wong und J. L. Maddocks, *J. Chromatogr.*, 150 (1978) 491.
- 5 L. Ossicini und M. Sinibaldi, *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 154.
- 6 V. G. Berezkin und S. L. Bolotov, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 4 (1981) 398.
- 7 V. G. Berezkin und S. L. Bolotov, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 6 (1983) 203.
- 8 M. T. Covacevich und G. N. Richards, *J. Chromatogr.*, 129 (1976) 420.
- 9 J. Kupec und S. Turina, *Chromatographia*, 10 (1977) 157.
- 10 S. R. Holding, G. Vlachogiannis und P. E. Barker, *J. Chromatogr.*, 261 (1983) 33.
- 11 S. Gocan und C. Konnert, *Rev. Roum. Chim.*, 25 (1980) 273.
- 12 T. R. Smith und V. A. Strickler, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 3 (1980) 634.
- 13 J. C. Vincent, C. Kumar und B. Chance, *Anal. Biochem.*, 126 (1982) 86.
- 14 H. Higgins und T. V. Brand, *Anal. Biochem.*, 15 (1966) 122.
- 15 K. Jinno und Y. Hirata, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 5 (1982) 85.
- 16 D. E. Henderson und F. P. Novak, *J. Chromatogr. Sci.*, 20 (1982) 256.
- 17 K. Jinno, T. Ohshima und Y. Hirata, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 5 (1982) 621.
- 18 G. Krug und B. Teichmann, *Nahrung*, 19 (1975) 255.
- 19 J. G. Heathcote und J. R. Hibbert, *J. Chromatogr.*, 108 (1975) 131.
- 20 H. J. Issaq, E. W. Barr und W. L. Zielinski, Jr., *J. Chromatogr. Sci.*, 13 (1975) 597.
- 21 H. J. Issaq und W. Cutchin, *J. Liq. Chromatogr.*, 4 (1981) 1087.
- 22 R. P. Kozloski, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 64 (1981) 1263.
- 23 U. Klemm, *Chromatographia*, Suppl. (1982) 9.
- 24 H. Johann und K. Dose, *Z. Anal. Chem.*, 314 (1983) 139.
- 25 M. K. L. Bicking, R. N. Kniseley und H. J. Svec, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 200.
- 26 W. A. Pons, Jr., A. F. Cuculi und L. S. Lee, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 56 (1973) 1431.
- 27 R. D. Stubblefield, G. M. Shannon und O. L. Shotwell, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 56 (1973) 1106.
- 28 L. G. M. Th. Tuinstra und J. M. Bronsgeest, *J. Chromatogr.*, 111 (1975) 448.
- 29 P. A. Biondi, L. Gavazzi, G. Maffeo und C. Secchi, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 3 (1982) 92.
- 30 J. M. Fremy, T. Cariou und G. Terrier, *Ann. Falsif. Expert. Chim.*, 74 (1981) 555.
- 31 I. G. Bories, *Ann. Falsif. Expert. Chim.*, 73 (1980) 477.
- 32 Ya. L. Kostyukovskii und D. B. Melamed, *Zh. Anal. Khim.*, 37 (1982) 701.
- 33 P. Garrigues, M. Ewald, M. Lamotte, J. Rima, A. Veyres, R. Lapouyade, J. Jousot-Dubien und G. Gourgeois, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 11 (1982) 305.
- 34 E. P. Lai, E. L. Inmen und J. D. Winnefordner, *Talanta*, 29 (1982) 601.
- 35 H. Woidich, W. Pfannhauser, G. Blaicher und K. Tiefenbacher, *Mitt. m. Bev. Chem.*, 30 (1976) 141.
- 36 D. T. Kaschani, *GIT-Lab.-Med.*, 2 (1979) 128.
- 37 H. Kunte und J. Borneff, *Z. Wasser Abwasser Forsch.*, 9 (1976) 35.
- 38 R. C. Pierce und M. Katz, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1743.
- 39 H. Hellmann, *Z. Anal. Chem.*, 314 (1983) 125.
- 40 A. M. M. Rao, R. Rajagopalan und K. G. Vohra, *Z. Anal. Chem.*, 311 (1982) 558.
- 41 R. Tomingas und Y. P. Grover, *Z. Anal. Chem.*, 313 (1982) 414.
- 42 A. Voigtman, A. Jurgensen und J. D. Winnefordner, *Analyst (London)*, 107 (1982) 408.
- 43 U. Breyman, H. Dreeskamp und E. Koch, *Z. Anal. Chem.*, 293 (1978) 208.
- 44 P. L. Konash, S. A. Wise und W. E. May, *J. Liquid Chromatogr.*, 4 (1981) 1339.
- 45 H. Kunte, *Z. Anal. Chem.*, 301 (1980) 287.