

- [1] B. Capon, S. P. McManus: Neighboring Group Participation. Bd. I, Plenum Press, New York 1976.
- [2] S. Winstein, C. R. Lindegren, H. Marshall, L. L. Ingraham, J. Am. Chem. Soc. 75, 147 (1953).
- [3] Einige anchimer beschleunigte bimolekulare Homolyse sind bekannt: P. S. Skell, K. J. Shea in J. K. Kochi: Free Radicals. Bd. II, Wiley, New York 1973, S. 809.
- [4] C. G. Overberger, J. Gainer, J. Am. Chem. Soc. 80, 4561 (1958).
- [5] J. A. Berson, C. J. Olsen, J. S. Walia, J. Am. Chem. Soc. 84, 3337 (1962).
- [6] J. Hinz, C. Rüchardt, Tetrahedron Lett. 1970, 3095.
- [7] S. Seltzer, S. Scheppel, J. Am. Chem. Soc. 90, 358 (1968).
- [8] P. D. Bartlett, J. M. McBride, J. Am. Chem. Soc. 87, 1727 (1965).
- [9] C. Rüchardt, R. Hecht, Chem. Ber. 98, 2460 (1965).
- [10] C. Rüchardt, R. Hecht, Chem. Ber. 98, 2471 (1965).
- [11] L. A. Singer in D. Swern: Organic Peroxides. Bd. I, Wiley Interscience, New York 1970, S. 265.
- [12] C. Rüchardt, H. Trautwein, Chem. Ber. 98, 2478 (1965).
- [13] C. Rüchardt, Fortschr. Chem. Forsch. 6, 251 (1966).
- [14] Zusammenfassung: J. W. Wilt in J. K. Kochi: Free Radicals. Bd. I, Wiley, New York 1973, S. 333.
- [15] H. E. Zimmerman, A. Zweig, J. Am. Chem. Soc. 83, 1196 (1961).
- [16] N. F. Phelan, H. H. Jaffé, M. Orchin, J. Chem. Educ. 44, 626 (1967).
- [17] J. E. Leffler, C. C. Petropoulos, R. D. Faulkner, Chem. Ind. (London) 1956, 1238.
- [18] Übersicht: J. C. Martin in J. K. Kochi: Free Radicals. Bd. II, Wiley, New York 1973, S. 493.
- [19] P. Livant, J. C. Martin, J. Am. Chem. Soc. 98, 7851 (1976).
- [20] W. A. Prior, H. W. Hendrickson, J. Am. Chem. Soc. 97, 1580 (1975).
- [21] J. C. Martin, P. Livant, M. M. Chau, Abstr. Pap. 174th Nat. Meeting ACS, Chicago 1977, Orgn. 135.
- [22] M. T. Reetz, Angew. Chem. 86, 416 (1974); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 13, 402 (1974).
- [23] M. T. Reetz, Chem. Ber. 110, 954 (1977).
- [24] M. T. Reetz, Chem. Ber. 110, 965 (1977).
- [25] a) K. Kwart, S. F. Sarner, J. Slutsky, J. Am. Chem. Soc. 96, 5234 (1973); b) M. J. Mobra, E. Ariza, An. R. Soc. Esp. Fis. Quim., Ser. B, 56, 851 (1960).
- [26] A. G. Brook, Acc. Chem. Res. 7, 77 (1974).
- [27] M. T. Reetz, M. Kliment, Tetrahedron Lett. 1975, 797.
- [28] M. T. Reetz, M. Kliment, N. Greif, Chem. Ber. 111, 1083 (1978).
- [29] D. Griller, K. U. Ingold, Acc. Chem. Res. 9, 13 (1976).
- [30] Furfurylradikale wurden auf anderem Weg erzeugt: L. D. Kispert, R. C. Quijano, C. U. Pittman, J. Org. Chem. 24, 3837 (1971).
- [31] W. P. Neumann, B. Schroeder, M. Ziebarth, Justus Liebigs Ann. Chem. 1975, 2279.
- [32] H.-D. Beckhaus, C. Rüchardt, Chem. Ber. 110, 878 (1977).
- [33] M. T. Reetz, N. Greif, M. Kliment, Chem. Ber. 111, 1095 (1978).
- [34] J. Kochi, P. J. Krusic, D. R. Eaton, J. Am. Chem. Soc. 91, 1877 (1969).
- [35] M. T. Reetz, unveröffentlichte Ergebnisse 1977.
- [36] M. T. Reetz, Tetrahedron Lett. 1976, 817.
- [37] M. T. Reetz, N. Greif, noch unveröffentlicht.
- [38] A. V. Kisim, V. A. Korenensky, N. M. Sergeev, Y. A. Ustyryuk, J. Organomet. Chem. 34, 93 (1972).
- [39] E. A. Ebsworth in A. G. MacDiarmid: The Bond to Carbon. Bd. I, Teil I. Marcel Dekker, New York 1968, S. 46.
- [40] N. Greif, Dissertation, Universität Marburg 1977.
- [41] Bei der thermischen Umlagerung von α -Silylketonen in Silylenolether wurde das Auftreten einer reaktiven pentakoordinierten Silicium-Spezies wahrscheinlich gemacht: H. Kwart, W. E. Barnette, J. Am. Chem. Soc. 99, 614 (1977).
- [42] A. G. Brook, P. J. Dillon, Can. J. Chem. 47, 4347 (1969).
- [43] Definition: M. T. Reetz, Tetrahedron 29, 2189 (1973); Übersicht: M. T. Reetz, Adv. Organomet. Chem. 16, 33 (1977).
- [44] M. T. Reetz, M. Kliment, M. Plachky, Chem. Ber. 109, 2716 (1976).
- [45] M. T. Reetz, M. Kliment, M. Plachky, Chem. Ber. 109, 2728 (1976).
- [46] H. Schwarz, M. Kliment, M. T. Reetz, G. Holzmann, Org. Mass. Spectrom. 11, 989 (1976).
- [47] H. Schwarz, R. Wolfschütz, Org. Mass. Spektrom. 11, 773 (1976).
- [48] H. Schwarz, M. T. Reetz, Angew. Chem. 88, 726 (1976); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 15, 705 (1976); H. Schwarz, C. Wesdemiotis, M. T. Reetz, J. Organomet. Chem. 161, 153 (1978).
- [49] M. T. Reetz, A. Maurofi, noch unveröffentlicht.
- [50] A. G. Brook, J. M. Duff, J. Am. Chem. Soc. 96, 4692 (1974).
- [51] M. T. Reetz, M. Kliment, unveröffentlichte Ergebnisse 1975.
- [52] A. Haas, Angew. Chem. 77, 1066 (1965); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 4, 1014 (1965).
- [53] M. T. Reetz, M. Kliment, Tetrahedron Lett. 1975, 2909.
- [54] M. T. Reetz, N. Greif, Angew. Chem. 89, 765 (1977); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 16, 712 (1977); vgl. A. R. Bassindale, A. G. Brook, P. F. Jones, J. M. Lennon, Can. J. Chem. 53, 332 (1975).

Flüssigkeits-Chromatographie in Säulen mit chemischen Umsetzungen nach der Trennung

Von Georg Schwedt^[*]

Die moderne Flüssigkeits-Chromatographie in Säulen (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, HPLC) hat sich in den letzten Jahren zu einer sehr leistungsfähigen, vielseitig anwendbaren Trenntechnik entwickelt. Die Selektivität eines Analysenverfahrens, das auf einem Trennvorgang beruht, kann in vielen Fällen durch chemische Umsetzungen nach der Trennung wesentlich gesteigert werden. Außerdem lassen sich auf diese Weise niedrigere Nachweisgrenzen als bei der Detektion ohne Derivatisierung erreichen. Die physikalisch-chemischen Grundlagen dieser Verbundverfahren aus chromatographischer Trennung und chemischer Umsetzung mit anschließender Detektion im Durchfluß (Kopplung von Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatograph und Reaktionsdetektor) sowie der Stand der Entwicklung mit einem Überblick bisher beschriebener Anwendungen werden dargelegt und diskutiert.

1. Einleitung

Wesentliche Aufgaben der modernen chemischen Analytik sind die Steigerung der Empfindlichkeit und Selektivität sowie

die Verbesserung der Nachweisgrenzen von Analysenverfahren, mit denen Elementspuren und niedrige Gehalte organischer Substanzen in komplex zusammengesetzten Matrices erfaßt und bestimmt werden können. Fortschritte in diesem Sinne wurden in den letzten zwei Jahrzehnten vor allem mit Hilfe der Physik und der physikalischen Meßtechnik möglich, und zwar durch neuartige analytische Anwendungen physikalischer Effekte sowie durch apparative Verbesserungen.

[*] Prof. Dr. G. Schwedt
Analytische Chemie, Fachbereich 8 der Gesamthochschule
Adolf-Reichwein-Straße 2, D-5900 Siegen 21

War die Entwicklung in der chemischen Analytik etwa bis 1960 in erster Linie durch die analytische Anwendung chemischer Umsetzungen und das Auffinden neuer Reagentien für die klassischen Methoden der Gravimetrie, Volumetrie und auch Kolorimetrie sowie Photometrie gekennzeichnet, so scheint heute der physikalischen Meßtechnik – z. B. bei den spektroskopischen Methoden – die wichtigste Rolle bei der Weiterentwicklung zuzukommen.

Auch in der Chromatographie waren entscheidende Erhöhungen der Trennleistungen und damit der Selektivität erst apparativen Entwicklungen vor allem in der Gas- und Flüssigkeits-Chromatographie zu verdanken. Technologische Fortschritte bei der Herstellung von Säulenmaterialien mit Partikeldurchmessern unter $10\text{ }\mu\text{m}$ und Verbesserungen in der Pumpentechnik zur konstanten, pulsationsfreien Förderung von Lösungsmitteln gegen hohe Drücke bestimmten in den letzten zehn Jahren die Entwicklung der klassischen Flüssigkeits-Chromatographie zu der um ein Vielfaches leistungsfähigeren Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Im Vergleich zur Analysentechnik der HPLC ist die Detektion bisher noch nicht auf einem so hohen Stand in bezug auf Empfindlichkeit, Nachweisgrenze und Selektivität angelangt. Hier zeichnen sich jedoch Entwicklungen ab, die der chemischen Seite in der Analytik, also chemischen Reaktionen und Reagentien, wieder größere Bedeutung zukommen lassen.

2. Reaktionsdetektoren

2.1. Grundlagen und Aufbau der Analysensysteme

UV- und Fluoreszenz-Detektoren mit Durchflußzellen sind zur Zeit die gebräuchlichsten und meßtechnisch ausgereiftesten Detektoren für die HPLC^[1]. Um die Empfindlichkeit und vor allem die Nachweisgrenze bei der Detektion zu verbessern, empfiehlt es sich häufig, die zu bestimmenden Substanzen chemisch zu modifizieren, so daß Verbindungen mit höheren molaren Extinktionskoeffizienten für die UV-Detektion oder fluorimetrisch erfassbare Verbindungen erhalten werden, für die sich niedrigere Nachweisgrenzen als bei der UV-Detektion erreichen lassen. Diese Derivatisierung kann vor oder nach der chromatographischen Trennung durchgeführt werden^[2].

Derivatisierungen vor einer chromatographischen Analyse mit dem Ziel selektiverer Trennungen und insbesondere niedrigerer Nachweisgrenzen als bei nicht derivatisierten Verbindungen werden seit langem mit Erfolg in der Chromatographie angewendet^[2, 3]. Die chemische Umsetzung muß hierbei möglichst quantitativ sein und zu einem definierten Reaktionsprodukt führen. Für Derivatisierungen nach der Trennung der zu bestimmenden Substanzen können jedoch auch unvollständig verlaufende Reaktionen genutzt werden, auch wenn sie mehrere Produkte ergeben, wenn nur die Meßsignale stark und reproduzierbar sind. Außerdem entfällt in diesem Fall die bei einer Derivatisierung vor der Trennung häufig arbeits- und zeitaufwendige und mit Verlusten verbundene Probenvorbereitung.

Analysensysteme für flüssigkeits-chromatographische Analysen mit chemischen Reaktionen nach der Trennung bestehen aus einem Flüssigkeits-Chromatographen, einem Reaktor und einem Durchfluß-Detektor (Abb. 1, vgl. auch^[4]). Die chemische Umsetzung und die Detektion der getrennten Substanzen erfolgen in on-line-Kopplung im Anschluß an die chromato-

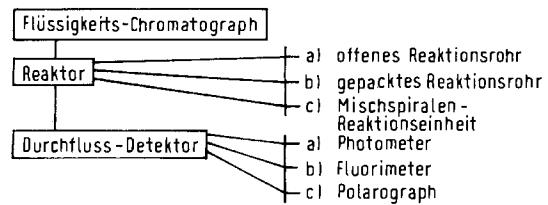


Abb. 1. Analysensystem für flüssigkeits-chromatographische Analysen mit chemischen Reaktionen nach der Trennung. Die Kombination von Reaktor und Durchfluß-Detektor wird als Reaktionsdetektor bezeichnet.

graphische Trennung. In Anlehnung an die im Englischen gebräuchliche Bezeichnung „reaction detector“^[5] werden Reaktor und Durchfluß-Detektor im folgenden (chemischer) Reaktionsdetektor genannt. Der Reaktor kann aus einem offenen Reaktionsrohr (einem Kapillarrohr), einem gepackten Reaktionsrohr (einem Rohr mit größerem Durchmesser als das Kapillarrohr, gefüllt mit kleinen Teilchen, z. B. mit Glaskugeln) oder einer Mischspiralen-Reaktionseinheit bestehen, wie sie in Geräten für die automatische naßchemische Analyse („Autoanalyzern“) verwendet wird. Diese Reaktionseinheit besteht aus einem spiralförmig gewickelten Glasrohr. Mit einer peristaltischen Pumpe werden die Lösungen durch Schläuche in die Mischspiralen gefördert, wo die Umsetzungen stattfinden. Der Flüssigkeitsstrom wird durch Luftblasen segmentiert (siehe Abb. 2).

2.2. Diffusionseffekte in den Reaktoren

In allen Reaktoren treten bei den chromatographisch getrennten Substanzen „Bandenverbreiterungen“ auf, die auf Diffusionseffekte zurückzuführen sind und quantitativ beschrieben werden können.

Die Bandenverbreiterung eines im Detektor in Form einer Gaußschen Verteilungskurve registrierten Signals kann durch die Standardabweichung σ oder durch die Varianz σ^2 angegeben werden. Sie setzt sich aus den Varianzen der Teile des Analysensystems zusammen (vgl. Tabelle 1):

$$\sigma_i^2 = \sigma_{ic}^2 + \sigma_{iv}^2 + \sigma_{id,g}^2 [\text{s}] \quad (1)$$

(c: Säule, v: Verbindungsteile, d,g: gesamtes Detektionssystem, d. h. Reaktor und Durchfluß-Detektor)

2.2.1. Offenes Reaktionsrohr

In einem offenen Kapillarrohr, welches über ein T-Stück mit dem Ausgang der HPLC-Säule verbunden wird, beträgt die Varianz in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (nach^[6, 7])

$$\sigma_w^2 = \frac{d_i^2 t}{96 D_m} \quad (2)$$

Die Bandenverbreiterung σ ist also bei gegebenem Diffusionskoeffizienten D_m proportional dem Rohrdurchmesser d_i und der Wurzel aus der Reaktionszeit t . Halász und Walkling^[6] haben die Unterschiede in der Bandenverbreiterung zwischen idealen und geometrisch verformten Rohren untersucht.

2.2.2. Gepacktes Reaktionsrohr

Gepackte Reaktionsrohre entsprechen gepackten Trennsäulen in der Chromatographie, jedoch besitzen sie keine retardie-

rende Wirkung. Für die Varianz in Abhängigkeit von der Reaktionszeit gilt

$$\sigma_{\text{td}}^2 = \left[\frac{\varepsilon \cdot D_m \pi^2 d_t^4}{8 F_1^2} + \frac{\pi d_t^2 \lambda_1 \cdot \lambda_2 d_p}{4 F_1 [1 + \lambda_2 d_t (\pi D_m / d_p)^{1/2}]} \right] t \quad (3)$$

(Die in ^[8] angegebene Beziehung wurde umgeformt.)

Die Abkürzungen sind in Tabelle 1 erklärt. Durch Verwendung kleiner Teilchen und hoher Durchflußgeschwindigkeiten sowie geringer Rohrdurchmesser wird in solchen Reaktoren die Bandenverbreiterung gering gehalten.

Tabelle 1. Bedeutung der verwendeten Abkürzungen sowie einige Definitionen.

c_{\max}	Substanzkonzentration im Maximum einer Bande [g cm^{-3}]
c_0	Substanzkonzentration in der Probenlösung [g cm^{-3}]
d_t	mittlere Stärke des Flüssigkeitsfilms an den Wänden [cm]
d_i	innerer Durchmesser von Schläuchen oder Röhren
d_p	Teilchendurchmesser [cm]
d_r	Rohrdurchmesser [cm]
D_m	molarer Diffusionskoeffizient [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]
$D_{w,25}$	molarer Diffusionskoeffizient in Wasser bei 298 K [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]
F_1	Durchflußgeschwindigkeit in der Säule, Volumengeschwindigkeit [$\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$]
F_R	Durchflußgeschwindigkeit für das Reagens [$\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$]
H	theoretische Trennstufenhöhe [mm]
K'	Kapazitäts-, Massenverteilungsverhältnis
l_s	Länge des Flüssigkeitssegmentes [cm]
L	Säulenlänge [cm]
m_s	Masse
n	Segmentierungsfrequenz [s^{-1}]
N	Zahl der theoretischen Trennstufen
p	Druck [bar]
q	freier Querschnitt einer Trennsäule
r	Radius der Mischspirale
R	Auflösung zweier Banden
R_{\max}	maximale Auflösung
t	Reaktionszeit [s]
t_R	Brutretentionszeit [s]
u	lineare Strömungsgeschwindigkeit [cm s^{-1}]
V_0	Probenvolumen [cm^3]
β	Verhältnis Flüssigkeitslänge/Summe Flüssigkeits- und Gaslänge [*]
γ	Oberflächenspannung [dyn cm^{-1}]
ϵ	Porosität: Bruchteil des freien Querschnitts, der dem Elutionsmittel zur Verfügung steht
λ	geometrische Konstanten für das gepackte Reaktionsrohr
η	Viskosität [dyn s cm^{-2}]
σ_i, σ_v	Bandenverbreiterung [s] bzw. [cm^3]
σ_{ic}	Bandenverbreiterung in der Säule [s]
σ_{id}	Bandenverbreiterung im Reaktor [s]
$\sigma_{td,g}$	Bandenverbreiterung im gesamten Detektionssystem [s]
σ_{tv}	Bandenverbreiterung in den Verbindungsteilen [s]

Empfindlichkeit einer Methode: Steigung der Eichgeraden

Nachweisgrenze eines Verfahrens: Konzentration für den Meßwert aus Blindwert und dessen dreifacher Standardabweichung

[*] Unter „Flüssigkeitslänge“ und „Gaslänge“ versteht man jeweils die Länge des Segmentes.

2.2.3. Mischspiralen-Reaktionseinheit

In einer Mischspiralen-Reaktionseinheit wird der Flüssigkeitsstrom durch Luftblasen segmentiert (Abb. 2) und so die Bandenverbreiterung infolge von Diffusionseffekten in der Longitudinal-Richtung auf ein Minimum reduziert^[5, 9, 10].

Die folgende Gleichung nach Snyder^[5] gibt die Varianz in Abhängigkeit von der Reaktionszeit an:

$$\sigma_{\text{td}}^2 = \left[\frac{538 d_t^{2/3} (F_1 + 0.92 d_t^3 n)^{5/3} \eta^{7/3}}{\gamma^{2/3} F_1 D_{w,25}} - \frac{1}{n} \right] \cdot \left[\frac{2.35 (F_1 + 0.92 d_t^3 n)^{5/3} \eta^{2/3}}{\gamma^{2/3} F_1 d_t^{4/3}} \right] \cdot t \quad (4)$$

In Abhängigkeit vom Durchmesser der Mischspiralen kann jeweils eine optimale Segmentierungsfrequenz n ermittelt wer-

den. Die Einflüsse von Durchflußgeschwindigkeit F_1 , Viskosität η der Reaktionsmischung und Oberflächenspannung γ wurden von Snyder^[5] eingehend untersucht (Abkürzungen in Gl. (4) siehe Tabelle 1).

Deelder und Hendricks^[11] geben folgende Beziehung für die Abhängigkeit der Varianz von der mittleren Stärke des Flüssigkeitsfilms d_t an den Wänden und der Länge eines Flüssigkeitssegmentes l_s (Abb. 2) an:

$$\sigma_{\text{td}}^2 = \frac{2 \pi^2 d_t l_s L r^3}{F_1} \quad (5)$$

Nach Hrdina^[12] existiert für den 4σ -Wert folgender Zusammenhang:

$$4\sigma = 2\sqrt{n t d_t / (\beta d_t)} \quad (6)$$

β bedeutet hier das Verhältnis der Flüssigkeitslänge zur Summe aus Flüssigkeits- und Gaslänge (siehe Tabelle 1).

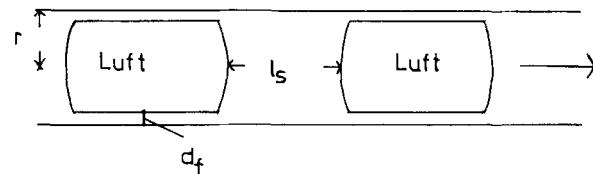


Abb. 2. Schematische Darstellung der Segmentierung des Flüssigkeitsstroms in einer Mischspiralen-Reaktionseinheit. r : Radius des Glasrohrs (der Mischspirale); d_t : mittlere Stärke des Flüssigkeitsfilms an den Wänden; l_s : Länge des Flüssigkeitssegmentes.

Gleichung (4)^[5] ermöglicht die Berechnung der Bandenverbreiterung aus direkt meßbaren oder bekannten Größen des Reaktors, für die Anwendung der einfacheren Beziehungen (5) und (6) ist die Kenntnis der mittleren Stärke des Flüssigkeitsfilms an den Wänden erforderlich.

Weitere Untersuchungen zur Dynamik der Analyse mit kontinuierlich segmentiertem Durchfluß stammen z. B. von Begg^[13], Thiers et al.^[14] und Walker et al.^[15], zur Bandenverbreiterung in Säulen von Halász et al.^[16] sowie von Huber und Hulsman^[17].

2.3. Vergleich der Reaktoren und allgemeine Beziehungen

Vergleicht man die Varianzen oder Bandenverbreiterungen für mehrere Reaktortypen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (Tabelle 2), so schneidet die Mischspiralen-Reaktionseinheit am besten ab. In der Praxis treten jedoch zusätzliche Verbreiterungen durch Diffusionen in den Verbindungsteilen der Mischspiralen untereinander, mit der HPLC-Säule, im Luftscheider und in der Verbindung mit dem Durchfluß-Detektor auf (siehe z. B. ^[11]). Experimentell ermittelte σ -Werte in mehreren Reaktoren sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Für sehr schnelle Umsetzungen von wenigen Sekunden ist auch ein offenes Reaktionsrohr geeignet. Bei der Anwendung von Mischspiralen-Reaktionseinheiten treten zwar durch die Verbindungsteile höhere Bandenverbreiterungen als berechnet auf; trotzdem ist diese Art von Reaktor den beiden anderen bei langen Reaktionszeiten und vor allem bei mehreren Reaktionsschritten vorzuziehen. Lediglich bei hohen Reaktionstemperaturen scheint das gepackte Reaktionsrohr Vorteile zu bieten^[18], da keine Schlauch- und Kunststoff-Verbindungen wie

Tabelle 2. Parameter für die Berechnung der Bandenverbreiterung σ_i in mehreren Reaktortypen.

	offenes Reaktionsrohr	gepacktes Reaktionsrohr	Mischspirale-Reaktionseinheit
innerer Rohrdurchmesser d_i [cm]	0.05	0.5	0.1
Diffusionskoeffizient D_m [cm ² s ⁻¹]	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$D_{w,25} : 3.5 \cdot 10^{-5}$
Durchflußgeschwindigkeit F_1 [cm ³ s ⁻¹]	—	0.025	0.025
Viskosität η [dyn s cm ⁻²]	—	0.004	0.004
Oberflächenspannung γ [dyn cm ⁻¹]	—	—	25
Teilchendurchmesser der Packung d_p [cm]	—	$1.6 \cdot 10^{-3}$	—
Segmentierungsfrequenz n [s ⁻¹]	—	—	7.3
Konstanten λ_1	—	11	—
λ_2	—	18	—
berechnete Varianz in Abhängigkeit von der Reaktionszeit [s ²]	$\sigma_t^2 = 1.30 \cdot t$	$5.14 \cdot 10^{-2} \cdot t$	$4.97 \cdot 10^{-3} \cdot t$

Tabelle 3. Beispiele für experimentell ermittelte Bandenverbreiterungen σ_i und σ_v in mehreren Reaktortypen.

Offenes Reaktionsrohr (nach [21])

Bestimmung von Thioridazin im Blut. Chromatographie: Verteilung mit ternären Phasen; Reaktion: Oxidation mit Kaliumpermanganat; Detektor: Fluorimeter

$$\sigma_v \cdot 10^{-3} [\text{cm}^3]$$

System: Probenschleife + Durchflußzelle 36

Probenschleife + Durchflußzelle
+ offenes Reaktionsrohr 120

Bedingungen: $t = 5$ [s], $F_1 = 2$ [cm³ min⁻¹], $d_i = 0.04$ [cm], $L = 150$ [cm]

$\sigma_i = 3.6$ [s] (berechnet aus σ_v)

Gepacktes Reaktionsrohr (nach [70])

Bestimmung von Isoenzyme. Chromatographie: an modifiziertem Cellulose-Austauscher; Reaktion: Umsetzung mit Lactat/NAD⁺; Detektor: Photometer oder Fluorimeter

System: mit unporösen Glaskugeln gepackte Säule

Bedingungen: $L = 30$ [cm], $d_i = 0.41$ [cm], $p = 7$ [bar], $d_p = 5 \cdot 10^{-5}$ [cm], $u = 0.4$ [cm s⁻¹], $t = 75$ [s]

$\sigma_i = 3.1$ [s] (berechnet aus Abb. 3 in [70] mit $H = 0.5$ [mm]) [*]

Mischspirale-Reaktionseinheit (nach [11])

Bestimmung von Cyclohexanon. Chromatographie: Verteilung mit ternären Phasen; Reaktion: Umsetzung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin; Detektor: Photometer

$$\sigma_{td}^2 [\text{s}^2]$$

System: Mischspirale I: $L = 2$ [m], $d_i = 0.24$ [cm] 16

Mischspirale II: $L = 1$ [m], $d_i = 0.24$ [cm] 6
Verbindungsteile 11
gesamt 33 ($\sigma_{td,g}^2$)

Bedingungen: $t = 180$ [s], $u = 0.15$ [cm s⁻¹], $k' = 0.3$, $R_{\max} = 3$ (ohne Reaktor), $R = 2.4$ (mit Reaktor); $\sigma_{tc} > 7$ [s] ergibt eine Verringerung der Auflösung R um weniger als 20 % [11]

$\sigma_i = 5.7$ [s] (berechnet aus $\sigma_{td,g}^2$)

[*] σ_{td}^2 beträgt nur ein Drittel des Wertes für die Durchführung der gleichen Reaktion in einem offenen Kapillarrohr von 15.25 [m] Länge und 0.05 [cm] innerem Durchmesser [70].

bei der Mischspirale-Reaktionseinheit benötigt werden. In neueren Arbeiten vergleichen Frei et al.^[19, 20] die verschiedenen Möglichkeiten der „post-column derivatization“.

Für das Verhältnis aus der Auflösung zweier Signale, wie sie im Durchfluß-Detektor registriert werden, und der durch das chromatographische System erreichten Auflösung R_{\max} bei $\sigma_i = \sigma_{tc}$ und $\sigma_{td} = 0$ gilt (nach ^[8, 11]):

$$R/R_{\max} = [1 + \sigma_{td}^2/\sigma_{tc}^2]^{-1/2} \quad (7)$$

Wird eine Verringerung der Auflösung R_{\max} von 5 % in Kauf genommen, so ergibt sich $\sigma_{td} = 0.33 \sigma_{tc}$. Aus diesen Bedingungen folgt eine Mindest-Retentionszeit von

$$t_{R2} = 2 \sigma_{td} \sqrt{N} \quad (8)$$

(Beispiel: $\sigma_{td} = 2$ [s], $N = 10000$, $t_{R2} = 400$ [s]) bei gegebener Auflösung R für ein Stoffpaar in Abhängigkeit von der Zahl der theoretischen Trennstufen N .

Der Verdünnungseffekt in der Flüssigkeits-Chromatographie kann als das Verhältnis der Konzentration einer Substanz im Bandenmaximum c_{\max} zur Konzentration in der Probe c_0 (nach ^[11]) angegeben werden:

$$\frac{c_{\max}}{c_0} = \frac{V_0}{q(1+k')\sqrt{2\pi LH}} \quad (9)$$

$c_0 V_0$ entspricht der Probenmenge.

Im Reaktor wird die Probenlösung durch die Reagenszugabe und die Bandenverbreiterung weiter verdünnt^[11]:

$$\frac{c_{\max}}{c_0} = \frac{F_1}{F_1 + F_R} \cdot \frac{\sigma_{tc}}{\sigma_i} \cdot \frac{V_0}{q(1+k')\sqrt{2\pi LH}} \quad (10)$$

Für c_{\max} gilt unter der Voraussetzung einer Gauß-Verteilung (siehe ^[21]):

$$c_{\max} = \frac{m_s}{\sqrt{2\pi\sigma_v^2}} \quad (11)$$

3. Anwendungsbeispiele

Die meisten der bisher beschriebenen flüssigkeits-chromatographischen Analysen mit einem (chemischen) Reaktionsdetektor stammen aus der *organisch-chemischen und biochemischen Analytik*. In der Aminosäuren-Analytik wird bereits seit 20 Jahren mit Erfolg die direkte Kopplung einer chromatographischen Trennung (Ionenaustrausch) mit einer chemischen Umsetzung vor der Detektion angewendet, und zwar in automatischen Reaktionssystemen (mit Mischspirale-Reaktionseinheiten)^[22]. Als Reagenzien für die photometrische oder fluorimetrische Aminosäuren-Bestimmung dienten außer dem klassischen Ninhydrin^[18, 23] Phthalaldehyd^[29-32], Fluorescamin^[29, 37, 38] und Pyridoxal^[40] (siehe Tabelle 4). Auch Tren-

Tabelle 4. Anwendungsbeispiele für (chemische) Reaktionsdetektoren.

Reagens	Substanz oder Substanzgruppe	Detection [a]
Ninhydrin	Aminosäuren [18, 23], Amine [24, 25], Polyamine [26, 27], γ -Aminobuttersäure [28]	F, A
Phthalaldehyd	Aminosäuren [29–32], Amine [30, 33], Catecholamine [33], Peptide [34], 5-Hydroxyindolessigsäure [35], N-Methylcarbamate [36]	F
Fluorescamin	Aminosäuren [29, 37, 38], Peptide [39]	F
Pyridoxal	Aminosäuren [40]	F
Ethyldiamin	Catecholamine [4, 41, 42]	F
Oxidationsmittel		
a) Kaliumhexacyanoferrat(III)	Catecholamine [43–48]	F
b) Kaliumpermanganat	Thioridazin und Metabolite [21]	F, A
c) Cer(IV)sulfat	Arenecarbonsäuren [49–51], Kohlenhydrate [52, 53], Phenole [54], 5,6-Dihydro-2-methyl-1,4-oxathiazin-3-carboxanilid [55]	F, A
d) Chromsäure	Hydroxycarbonsäuren [56, 57]	F, A
e) Periodat	Hydroxycarbonsäuren [56, 57]	F, A
Natriumiodid	Hydroperoxide [8]	A
Tetrazolumblau	Zucker [58]	A
Neocuproin	reduzierende Zucker [59]	A
Säure-Base-Indikatoren	Carbonsäuren [60–62]	A
Carbazol	Hydroxycarbonsäuren [56, 57], Uronsäuren [63]	A
Phenol	Kohlenhydrate [64]	A
Sulfanilsäure/N-(1-Naphthyl)ethyldiamin	Nitrosamide [65]	A
7-Chlor-4-nitrobenzofuran (NBD-Chlorid)	Prolin, Hydroxyprolin [66]	F
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Cyclohexanon [11]	A
Säuren (Salz-, Schwefel-, Essigsäure)	Glykoside [20], Kohlenhydrate [67], Östrogene [68]	F
Semicarbazid	Citral [69]	E
6,6'-Dinitro-3,3'-dithiodibenzoesäure	Enzyme [70]	A
p-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoat	Enzyme [70]	A
Lactat/NAD ⁺	Enzyme [70, 71]	A, F
Cholinesterase	Organophosphorverbindungen, Carbamate, Insektizide [72, 73]	A
Molybdat	Monofluorophosphat [74]	A
4-(2-Pyridylazo)resorcin (PAR)	Metallionen [75, 76]	A
Luminol	Metallionen [77–79]	F
Zineon	Zink [80]	A
Cer(IV)sulfat	Polythionate [81]	

[a] A: Absorptionsmessungen; F: Fluoreszenzmessungen; E: Elektrochemische Detektion.

nungen von Peptiden wurden mit einer Umsetzung mit Phthalaldehyd^[34] oder Fluorescamin^[39] verbunden. Diese Methoden wurden zum Teil auf die Bestimmung von Aminen übertragen^[24–27, 30, 33]. Zur Analyse biogener Amine wie der Catecholamine werden nach den chromatographischen Trennungen spezielle chemische Umsetzungen in Mischspiralen-Reaktionseinheiten durchgeführt: a) Umsetzung mit Ethyldiamin^[4, 41, 42], b) Oxidation zu fluorimetrisch erfassbaren Trihydroxyindolen^[43–48]. Dank der selektiven Umsetzung zu Trihydroxyindolen ist unter Verwendung der „reversed-phase“-HPLC sogar die direkte Bestimmung der Catecholamine im Urin ohne vorherige Abtrennung möglich^[48], siehe auch^[85].

Andere Oxidationsmittel wie Kaliumpermanganat^[21], Cer(IV)sulfat^[49–54], Chromsäure^[56, 57] und Periodat^[56, 57] fanden in Verbindung mit der Flüssigkeits-Chromatographie zur fluorimetrischen und absorptionsspektrometrischen Bestimmung verschiedener organischer Substanzen Verwendung (siehe Tabelle 4). Oxidierende Verbindungen wie Hydroperoxide wurden mit Natriumiodid umgesetzt; das gebildete Iod wurde photometrisch im Durchfluß bestimmt^[8]. Für die Analyse reduzierender Zucker sind Redox-Indikatoren wie Tetrazolumblau und Neocuproin geeignet^[58, 59].

Carbonsäuren lassen sich nach ionenaustausch-chromatographischen Trennungen mit Säure-Base-Indikatoren nachweisen^[60–62]. Weitere Reagentien sind in Tabelle 4 zu finden.

Für chromatographisch getrennte, chemisch modifizierte Substanzen eignet sich auch die elektrochemische Detektion, wie am Beispiel des Citrals mit Semicarbazid gezeigt wurde^[69].

Für Enzymanalysen werden spezielle Reagentien und Reaktionssysteme beschrieben^[70, 71]. In der Umweltanalytik wird die enzymatische Hemmung von Cholinesterase zur Indikation

für Organophosphorverbindungen, Carbamate und Insektizide eingesetzt^[72, 73].

Auch in der *anorganischen Analyse* finden Umsetzungen nach ionenaustausch-chromatographischen Trennungen mit Molybdat, Metallreagentien oder auch Cer(IV)sulfat Anwendung^[74–81].

Die in Tabelle 4 aufgeführten Beispiele sind nicht nach klassischer und moderner (Hochdruck-)Flüssigkeits-Chromatographie in Säulen unterschieden. Nach Engelhardt^[82] liegt die Grenze der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie zur klassischen Flüssigkeits-Chromatographie bei Packungsteilchen über 50 μm Durchmesser. Snyder und Kirkland^[83] charakterisieren die moderne Säulen-Chromatographie als schnelle Flüssigkeits-Chromatographie mit hohen Trennleistungen und kurzen Trennzeiten von wenigen Minuten bis zu etwa einer Stunde („high-speed“ oder „high-performance liquid chromatography“). Weitere Beispiele für Reaktionen in Systemen mit kontinuierlichem Durchfluß in Verbindung mit der klassischen Säulen-Chromatographie sind in der Monographie von Foreman und Stockwell^[84] aufgeführt.

4. Ausblick: Entwicklungstendenzen

Selektive chemische Umsetzungen mit einem variablen Durchfluß-Detektor in Verbindung mit leistungsfähigen Trennsystemen schaffen Möglichkeiten für die direkte und empfindliche Analyse einzelner Substanzen in komplexen Matrices wie Urin und Blut ohne Probenvorbereitung.

Beispiele für derartige Anwendungen von Reaktionsdetektoren wurden u. a. für Kohlenhydrate im Urin und Serum^[52],

für freies Prolin und Hydroxyprolin im Serum^[66] sowie für freies Adrenalin und Noradrenalin im Urin^[48] (Abb. 3) beschrieben. Als weiteres Beispiel sei die direkte Bestimmung von Dopamin und Serotonin in Gehirnhomogenaten nach „reversed-phase“-chromatographischer Trennung und Umsetzung mit Phthalaldehyd angeführt (Abb. 4) (siehe auch^[85]).

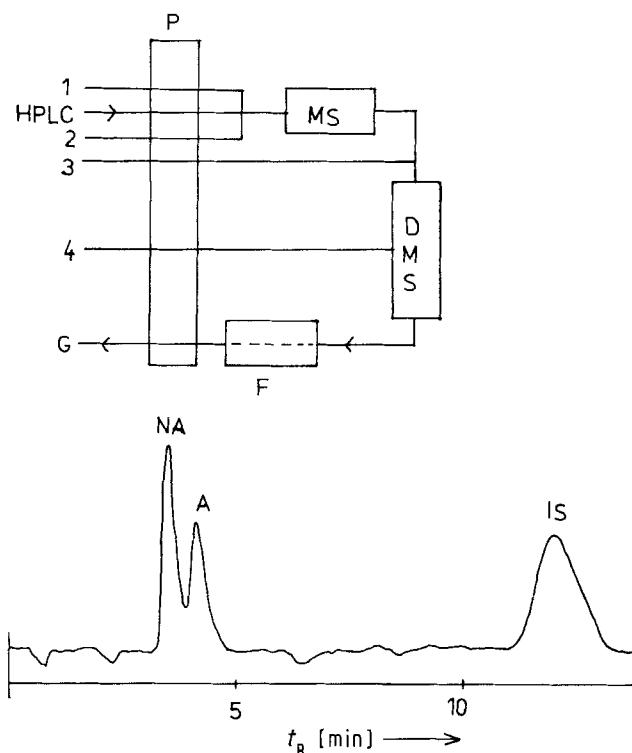


Abb. 3. Direktbestimmung von Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA) in 200 µl Urin durch Kopplung von „reversed-phase“-Chromatographie (Säule: LiChrosorb RP 18, mobile Phase: 0.05 M Phosphatpuffer pH = 3, Durchflußgeschwindigkeit: 1.5 [ml min⁻¹], Druck: 60 [bar]) mit einem (chemischen) Reaktionsdetektor. IS bedeutet interner Standard.
Fließschema: 1: Oxidationslösung: 0.3 M Formiatpuffer pH = 4/0.1 M Borsäure/0.1 % Kaliumhexacyanoferrat(III)/2 · 10⁻³ % Kupferacetat (Schlauch: d_1 0.76 [mm]); 2: Luft (Schlauch: d_1 1.42 [mm]); 3: Reduktionslösung: 5 % Mercaptoethanol in Wasser/20 % Natriumsulfit in Wasser/10 M Natronlauge in Volumenverhältnis 1:1:1 (Schlauch: d_1 0.76 [mm]); 4: 4 M Essigsäure/4 % Borsäure (Schlauch: d_1 1.14 [mm]); G: Gesamtschlauch d_1 1.85 [mm]; P: Schlauchpumpe; F: Fluorimeter (Anregung 405 nm, Fluoreszenz-Kantenfilter 450 nm, Empfindlichkeit 0.03 µA/Vollausschlag); MS: Mischspirale, DMS: Doppelmischspirale (d_1 2.4 [mm]).
Urinprobe: 14.5 ng Adrenalin/ml und 59 ng Noradrenalin/ml (entspricht: 2.9 ng Adrenalin und 11.8 ng Noradrenalin in der Säule) [48].

Solche Analysenverfahren verringern vor allem in der Spurenanalyse organischer Substanzen Probleme der Abtrennung aus dem Material, der Stabilität der Substanzen oder der für die Flüssigkeits-Chromatographie hergestellten Derivate und verkürzen außerdem die Analysenzeit gegenüber einem Verfahren, das aus Abtrennung, Probenderivatisierung und chromatographischer Analyse besteht. Eine andere Zielsetzung für solche Verbundsysteme aus Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographen und (chemischen) Reaktionsdetektoren ist die Trennung und Bestimmung möglichst vieler Stoffe in einem Arbeitsgang. Hierfür sind als Beispiele vor allem die Analyse von Aminosäuren, von Kohlenhydraten sowie von Metallionen zu nennen, die sich mit Gruppenreagentien umsetzen und somit nach einer chromatographischen Trennung gemeinsam bestimmen lassen (siehe Tabelle 4). Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses Verfahrens ist ein selektives chroma-

tographisches System mit hoher Trennleistung. In der Aminosäuren-Analytik konnte infolge der Entwicklungen in der mo-

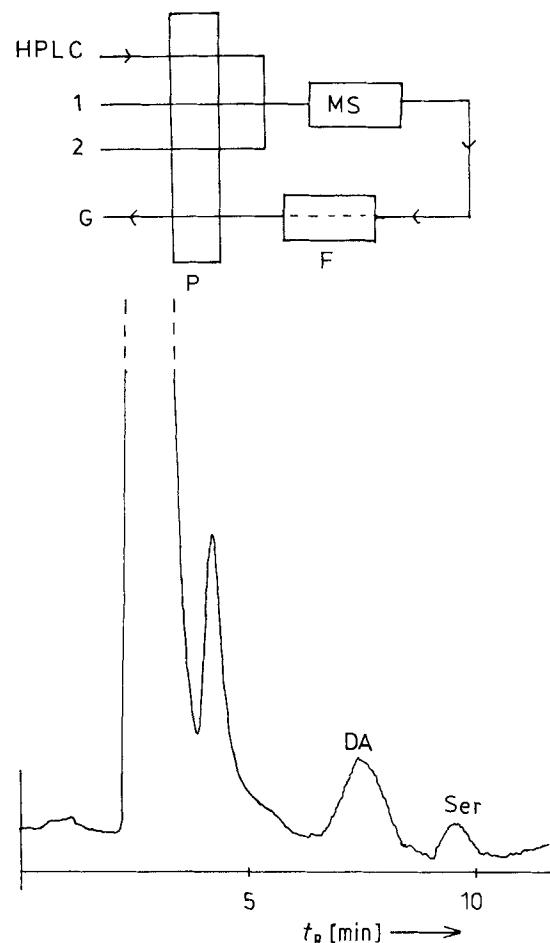


Abb. 4. Direktbestimmung von Dopamin (DA) und Serotonin (Ser) in 50 µl eines Hirnhomogenates (1.5 g Rattenhirn in 10 ml 0.1 N Salzsäure homogenisiert) durch Kopplung von „reversed-phase“-Chromatographie (Säule: LiChrosorb RP 18, mobile Phase: 20 % Methanol in einer wässrigen Lösung von 0.4 M Essigsäure/Borsäure pH = 3.2, Durchflußgeschwindigkeit: 1.2 [ml min⁻¹], Druck: 80 [bar]) mit einem (chemischen) Reaktionsdetektor.
Fließschema: 1: Reagens: Phthalaldehyd, 0.02 Gew.-%/0.05 Vol.-% Mercaptoethanol in 0.2 M Boratpuffer pH = 9 (Schlauch: d_1 0.76 mm); 2: Luft (Schlauch: d_1 0.76 mm); G: Gesamtschlauch (d_1 1.14 mm); P: Schlauchpumpe; F: Fluorimeter (Anregung 365 nm, Fluoreszenz-Kantenfilter 450 nm, Empfindlichkeit: 0.3 µA/Vollausschlag); MS = Mischspirale.

dernen Flüssigkeits-Chromatographie die Analysenzeit von mehr als 12 Stunden^[22] auf weniger als eine Stunde verringert werden^[38].

Außerdem kann mit den beschriebenen Systemen die Richtigkeit von Analysenergebnissen überprüft werden, wie das folgende Beispiel zeigt: Für die Analyse biogener Amine in biologischem Material wurden störungsfreie Analysenverfahren durch die Kombination von Abtrenn- und Anreicherungsverfahren (Ionenaustausch, Flüssig-flüssig-Verteilung) mit selektiven chemischen Umsetzungen entwickelt. Am Beispiel des Serotonins ließ sich durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie und chemische Umsetzung mit fluorimetrischer Messung nach der Trennung zeigen, daß das für Gehirnproben gebräuchliche Abtrennverfahren mit *n*-Butanol bei Urinproben falsche (zu hohe) Werte ergibt. Im Chromatogramm wird neben dem Serotonin-Signal ein weiteres Signal registriert, das ohne Trennung trotz selektiver Umsetzung (mit Phthalal-

dehyd in salzsaurer Lösung bei 80°C) als Serotonin gemessen wurde^[86].

Eingegangen am 23. Mai 1978 [A 261]

- [1] R. P. W. Scott: Liquid Chromatography Detectors. Elsevier, Amsterdam 1977.
- [2] J. F. Lawrence, R. W. Frei: Chemical Derivatization in Liquid Chromatography. Elsevier, Amsterdam 1976.
- [3] M. S. F. Ross, J. Chromatogr. 141, 107 (1977).
- [4] G. Schwedt, Chromatographia 10, 92 (1977).
- [5] L. R. Snyder, J. Chromatogr. 125, 287 (1976).
- [6] I. Halász, P. Walkling, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 74, 66 (1970).
- [7] R. P. W. Scott, P. Kucera, J. Chromatogr. Sci. 9, 641 (1971).
- [8] R. S. Deelder, M. G. F. Kroll, J. H. M. van den Berg, J. Chromatogr. 125, 307 (1976).
- [9] L. R. Snyder, H. J. Adler, Anal. Chem. 48, 1017 (1976).
- [10] L. R. Snyder, H. J. Adler, Anal. Chem. 48, 1022 (1976).
- [11] R. S. Deelder, P. J. H. Hendricks, J. Chromatogr. 83, 342 (1973).
- [12] J. Hrdina: 6th Colloquium in Amino Acid Analysis. Technicon Monograph 3, 87 (1968).
- [13] R. D. Begg, Anal. Chem. 43, 854 (1971).
- [14] R. E. Thiers, R. R. Cole, W. J. Kirsch, Clin. Chem. 13, 451 (1967).
- [15] W. H. C. Walker, G. A. Pennock, G. K. McGowan, Anal. Chim. Acta 27, 421 (1970).
- [16] I. Halász, H. D. Gerlach, A. Kroneisen, P. Walkling, Z. Anal. Chem. 234, 97 (1968).
- [17] J. F. K. Huber, J. A. R. J. Hulsman, Anal. Chim. Acta 38, 305 (1967).
- [18] K. M. Jonker, H. Poppe, J. F. K. Huber, Chromatographia 11, 123 (1978).
- [19] R. W. Frei, L. Michel, W. Santi, J. Chromatogr. 142, 261 (1977).
- [20] J. C. Gfeller, G. Frey, R. W. Frei, J. Chromatogr. 142, 271 (1977).
- [21] R. G. Muusze, J. F. K. Huber, J. Chromatogr. Sci. 12, 779 (1974).
- [22] D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958).
- [23] G. Ertringhausen, H. J. Adler, A. S. Reichler, J. Chromatogr. 42, 355 (1969).
- [24] H. Hatano, K. Sumizu, S. Rokushika, F. Murakami, Anal. Biochem. 35, 377 (1970).
- [25] P. Vandekerckhove, H. K. Henderickx, J. Chromatogr. 82, 379 (1973).
- [26] H. Adler, M. Margoshes, L. R. Snyder, C. Spitzer, J. Chromatogr. 143, 125 (1977).
- [27] C. W. Gehrke, K. C. Kuo, R. L. Ellis, J. Chromatogr. 143, 345 (1977).
- [28] C. E. Vandercook, R. L. Price, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57, 124 (1974).
- [29] J. R. Benson, P. E. Hare, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 619 (1975).
- [30] J. R. Cronin, P. E. Hare, Anal. Biochem. 81, 151 (1977).
- [31] M. Roth, A. Hampai, J. Chromatogr. 83, 353 (1973).
- [32] M. Roth, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 361 (1976).
- [33] G. Schwedt, Anal. Chim. Acta 92, 337 (1977).
- [34] E. H. Creaser, G. J. Hughes, J. Chromatogr. 144, 69 (1977).
- [35] H. H. Brown, M. C. Rhindress, R. E. Griswold, Clin. Chem. 17, 92 (1971).
- [36] H. A. Moye, S. J. Scherer, Anal. Lett. 10, 1069 (1977).
- [37] A. M. Felix, G. Terkelsen, Arch. Biochem. Biophys. 157, 177 (1973).
- [38] K. Zech, W. Voelter, Chromatographia 8, 350 (1975).
- [39] R. W. Frei, L. Michel, W. Santi, J. Chromatogr. 126, 665 (1976).
- [40] M. Maeda, A. Tsuji, S. Ganno, Y. Onishi, J. Chromatogr. 77, 434 (1973).
- [41] A. Kojima-Sudo, Ind. Health 12, 153 (1974).
- [42] K. Mori, Jap. J. Ind. Health 17, 170 (1975).
- [43] A. Kojima-Sudo, Ind. Health 11, 105 (1973).
- [44] A. Kojima-Sudo, Ind. Health 13, 69 (1975).
- [45] K. Mori, Jap. J. Ind. Health 17, 116 (1975).
- [46] K. Mori, Ind. Health 12, 171 (1974).
- [47] G. Schwedt, J. Chromatogr. 143, 463 (1977).
- [48] G. Schwedt, Z. Anal. Chem. 293, 40 (1978).
- [49] S. Katz, W. W. Pitt, Anal. Lett. 5, 177 (1972).
- [50] S. Katz, W. W. Pitt, G. Jones, Clin. Chem. 19, 817 (1973).
- [51] S. Katz, W. W. Pitt, J. E. Mrochek, J. Chromatogr. 104, 303 (1975).
- [52] S. Katz, S. R. Dinsmore, W. W. Pitt, Clin. Chem. 17, 731 (1971).
- [53] S. Katz, W. W. Pitt, J. E. Mrochek, S. Dinsmore, J. Chromatogr. 101, 193 (1974).
- [54] A. W. Wolkoff, R. H. Larose, J. Chromatogr. 99, 731 (1974).
- [55] A. W. Wolkoff, F. J. Onuska, M. E. Comba, R. H. Larose, Anal. Chem. 47, 754 (1975).
- [56] B. Carlsson, T. Isaksson, O. Samuelson, Anal. Chim. Acta 43, 47 (1968).
- [57] B. Carlsson, O. Samuelson, Anal. Chim. Acta 49, 247 (1970).
- [58] K. Mopper, E. T. Degens, Anal. Biochem. 45, 147 (1972).
- [59] M. H. Simatupang, H. H. Dietrich, Chromatographia 11, 89 (1978).
- [60] L. Kesner, E. Muntywyler, Anal. Chem. 38, 1164 (1966).
- [61] K. W. Stahl, G. Schäfer, W. Lamprecht, J. Chromatogr. Sci. 10, 95 (1972).
- [62] R. H. Gaddy, R. S. Dorsett, Anal. Chem. 40, 429 (1968).
- [63] S. Johnson, O. Samuelson, Anal. Chim. Acta 36, 1 (1966).
- [64] R. L. Jolley, W. W. Pitt, C. D. Scott, Anal. Biochem. 28, 300 (1969).
- [65] G. M. Singer, S. S. Singer, D. G. Schmidt, J. Chromatogr. 133, 59 (1977).
- [66] M. Roth, Clin. Chim. Acta 83, 273 (1978).
- [67] S. Katz, L. H. Thacker, J. Chromatogr. 64, 247 (1972).
- [68] Sj. van der Wal, J. F. K. Huber, J. Chromatogr. 135, 305 (1977).
- [69] B. Fleet, C. J. Little, J. Chromatogr. Sci. 12, 747 (1974).
- [70] T. D. Schlabach, S. H. Chang, K. M. Goodning, F. E. Regnier, J. Chromatogr. 134, 91 (1977).
- [71] R. R. Schröder, P. J. Kudirka, E. C. Toren, J. Chromatogr. 134, 83 (1977).
- [72] K. A. Ramsteiner, W. D. Hörmann, J. Chromatogr. 104, 438 (1975).
- [73] H. A. Moye, T. E. Wade, Anal. Lett. 9, 891 (1976).
- [74] C. Benz, R. M. Kelley, Anal. Chim. Acta 46, 83 (1969).
- [75] K. Kawazu, J. S. Fritz, J. Chromatogr. 77, 397 (1973).
- [76] K. Kawazu, M. Shibata, H. Kakiyama, J. Chromatogr. 115, 543 (1975).
- [77] A. Hartkopf, R. Delumyea, Anal. Lett. 7, 79 (1974).
- [78] M. P. Neary, R. Seitz, D. M. Hercules, Anal. Lett. 7, 583 (1974).
- [79] W. R. Seitz, W. W. Sudyan, D. M. Hercules, Anal. Chem. 44, 957 (1972).
- [80] H. Matsui, Anal. Chim. Acta 66, 143 (1973).
- [81] A. W. Wolkoff, R. H. Larose, Anal. Chem. 47, 1003 (1975).
- [82] H. Engelhardt: Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. 2. Aufl. Springer, Berlin 1977.
- [83] L. R. Snyder, J. J. Kirkland: Introduction to Modern Liquid Chromatography. Wiley-Interscience, New York 1974.
- [84] J. K. F. Foreman, P. B. Stockwell: Automatic Chemical Analysis. Wiley, New York 1975.
- [85] G. Schwedt, Instrument und Forschung, im Druck (1979).
- [86] M. Angst, Teil der Diplomarbeit, Gesamthochschule Siegen 1978.