

CHROM. 4445

DIE KOMBINIERTE ANWENDUNG DER DÜNNSCHEIT- UND PAPIER-CHROMATOGRAPHIE UND SPEKTROSKOPIE IM MIKROGRAMM-BEREICHEINFÜHRUNG

GUSTAV SZÉKELY

Zentrale Forschung, J.R. Geigy A.G., Basrl (Schweiz)

SUMMARY

Combined application of thin-layer and paper chromatography and spectroscopy in the microgram range. Introduction

Several, partly new microtransfer methods are described for the spectroscopic elucidation or confirmation of the structure of compounds separated by thin-layer chromatography. Using these methods it is possible to transfer small amounts of substance from the adsorbent into the infrared or mass spectrometer.

EINLEITUNG

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist eine ausgezeichnete Mikro-Trennmethode; leider hat sie wenig Aussagekraft bezüglich der chemischen Struktur der aufgetrennten Substanzen. Spektroskopische Methoden hingegen eignen sich sehr gut zur Strukturaufklärung. Sie benötigen jedoch relativ reine Substanzproben. Die chromatographischen und die spektroskopischen Methoden ergänzen sich darum ausgezeichnet und sind für eine kombinierte Anwendung geradezu prädestiniert. STAHL¹ hat bereits die Kombination der DC mit verschiedenen physikalischen, chemischen und biologischen Verfahren zusammenfassend beschrieben und die Begriffe "Kopplung" und "Transfer" festgelegt. Die Kopplung sei eine direkte Kombination zweier Methoden ohne manuelles Eingreifen, der "Transfer" hingegen benötigt manuelle Eingreifen.

Beim Vorhandensein authentischer Vergleichssubstanz ist die Strukturbestätigung einer chromatographisch getrennten Komponente möglich. Dazu genügt in der Regel eine einzige Methode, z.B. Infrarot (IR) oder Massenspektroskopie (MS). Falls keine Vergleichssubstanz zur Verfügung steht, versucht man mit Hilfe der spektroskopischen Informationen einen Strukturvorschlag zu machen. Dazu müsste meistens mehrere spektroskopische Methoden beigezogen werden, z.B. ausser IR und MS auch NMR (Kernmagnetische Resonanz).

Wegen des geringen Substanzbedarfs der IR und MS genügen DC-Flecken mit einigen Mikrogrammen Substanz zur Untersuchung. Bei noch kleineren Substanz Mengen ist eine Anreicherung notwendig. Dies erreicht man z.B. durch strichförmiges Auftragen mit dem Desaga-Autoliner nach STAHL UND DUMONT²⁸ oder mittel zweidimensionaler Anreicherungstechnik nach MILBORROW¹⁹.

Zwischen Dünnschicht- und Papierchromatographie (PC) einerseits und der Spektroskopie im sichtbaren und UV-Bereich anderseits gibt es eine direkte Kopp lungsmöglichkeit. Man kann von sehr kleinen, als chromatographischer Fleck vor liegenden Substanzmengen, Remissions- oder Transmissionsspektren aufnehmen. KORTÜM UND VOGEL¹⁰, HEBER¹¹, KORTE UND WEITKAMP¹⁵, FRODYMA *et al.*⁷ und JORK¹² haben darüber berichtet. Leider ist die Aussagekraft von Spektren in diesen Bereichen gegenüber der IR und MS relativ gering. Wegen des hohen Substanzbe darf ist zur Zeit die Untersuchung eines DC-Flecks mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nicht möglich. Wer heute auf ein NMR-Spektrum angewiesen ist, muss eine Isolierung der Komponente im Milligramm-Bereich vornehmen (1-25 mg), z.B. mittels präparativer Schichtchromatographie. Je kleiner der prozentuelle Anteil der zu isolierenden Komponente ist, desto schwieriger und zeitraubender wird seine Isolierung.

Nachfolgend werden Mikrotransfer-Techniken zwischen Chromatographie und IR sowie MS behandelt.

DC-IR- bzw. PC-IR-MIKROTRANSFER

Die bisher bekannten DC-IR- bzw. PC-IR-Mikrotransfer-Methoden können in Extraktionsmethoden und Überführungsmethoden eingeteilt werden.

Bei den Extraktionsmethoden wird der zerstörungsfrei lokalisierte Fleck von der DC-Platte gekratzt bzw. aus dem Papier ausgeschnitten, die Substanz mit einem flüchtigen Lösungsmittel extrahiert, vom Sorptionsmittel durch Filtrieren oder evtl. auch durch Zentrifugieren befreit und anschliessend zur Trockene eingedampft. DOSKOČILOVÁ⁴, HAYDEN¹⁰, SELIGSON *et al.*²⁴ und TORIBARA UND DI STEFANO²⁵, haben als Trennmethode die PC verwendet, während BEYERMANN¹, BEYERMANN UND RÖDER², ČERNÝ *et al.*³, FONTANGES *et al.*⁸, MCCOY UND FIEBIG¹⁷, NASH *et al.*²⁰ und SNAVELY UND GRASSELLI²⁶ die DC bevorzugt haben. Zur Aufnahme der Spektren wird der eingedampfte Extrakt entweder in wenig Lösungsmittel wieder gelöst oder es wird ein Mikro-Kaliumbromid Pressling hergestellt. Dazu muss die Lösung nach Zugabe von einigen Milligrammen KBr eingedampft werden. BEYERMANN¹ bzw. BEYERMANN UND RÖDER² haben eine reflexionsspektroskopische Technik angewendet. Der DC-Extrakt wird auf ein poliertes V4A Spiegelchen von 2-4 mm Durchmesser getropft und darauf eingedampft. Dank des Randwinkelphänomens³⁰ können kleine Lösungsmittelmengen ohne Verlust eingedampft werden.

Der Nachteil dieser Extraktionsmethoden liegt nach unserer Erfahrung darin, dass die auf diese Weise präparierten Proben noch Sorptionsmittel enthalten. Wir konnten durch Filtrieren und Zentrifugieren die feinsten Sorptionsmittel-Partikel nicht entfernen; die Folge war, dass in den IR-Spektren störende Signale aufraten. Kieselgel z.B. zeigt starke Signale bei ca. 9 μ.

Viel bessere Resultate erreichten wir mit den Überführungsmethoden. Die Substanz wird aus dem Fleck mit wenig Lösungsmittel in KBr überführt. Der erste Teil der KBr-Menge dient dabei als Filter für das Sorptionsmittel und wird weg geworfen. Die restliche KBr-Menge, welche den grössten Teil der gewünschten Substanz enthält, ist frei von Sorptionsmittel und wird zur Herstellung des Mikropresslings verwendet.

Die beschriebenen Überführungsmethoden sind eigentlich für DC bestimmt. Es

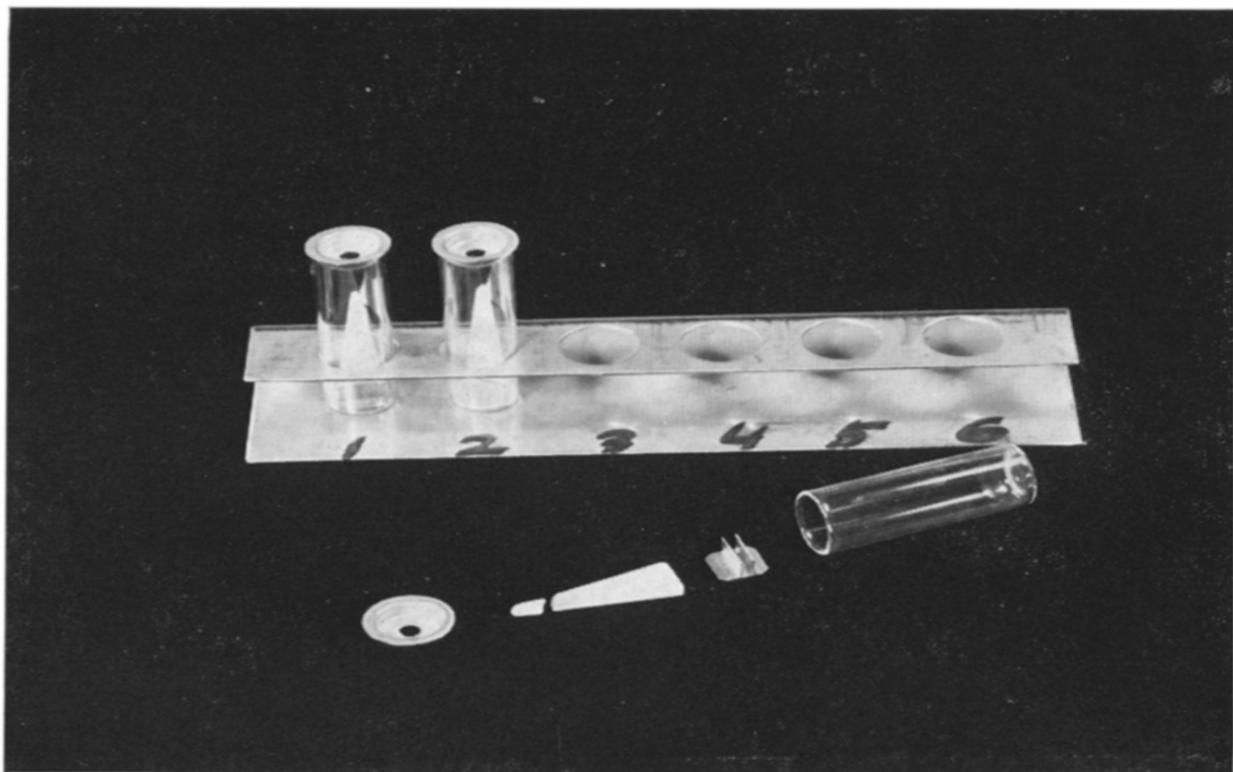


Fig. 1. Wick-Stick T.M. Ausrüstung der Fa. Harshaw Chemical Company für DC-IR Mikrotransfer.

wäre aber denkbar, einige davon auch für die PC anzupassen.

Die *Wick-Stick Methode* wurde von GARNER UND PACKER⁸ beschrieben. Das Kernstück ist ein aus KBr vorgepresstes, saugfähiges Dreieck von 25 mm Höhe, 8 mm Basis und 2 mm Dicke. Dieses ist unter der Bezeichnung "Wick-Stick T.M." (Fig. 1) kommerziell erhältlich (Harshaw Chemical Company). Das Dreieck wird in eine Halterung eingespannt und in ein zylindrisches Gläschen gestellt. Das Sorptionsmittel, welches die abgetrennte Substanz enthält, wird mittels eines Trichterchens auf den Boden des Gläschens geschüttet. Dann wird die Substanz durch Zugabe von wenig Lösungsmittel aus dem Sorptionsmittel extrahiert. Die Lösung steigt im Wick-Stick durch Kapillarkräfte und das Lösungsmittel verdunstet im oberen Bereich. Die Substanz wird dabei nach oben transportiert und an der Spitze des Dreiecks angereichert. Meist kann man hier sogar farblose Substanzen als hellgelbe Fleckchen erkennen. Die Spitze wird abgeschnitten, getrocknet und zur Herstellung des Presslings verwendet. Der grosse Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie untergrundfreie Spektren liefert. Das Sorptionsmittel (Kieselgel oder Alox) wird nämlich im unteren Teil des Wick-Sticks praktisch vollständig zurückgehalten. In unserem Labor erhielten wir mit dieser Methode gute IR-Spektren mit nur 10 μ g starken DC-Flecken. Es wurden zwischen 50 und 80% der eingesetzten Substanzmenge wiedergefunden.

Bei der *Direct Transfer Methode* nach RICE²¹ wird der Fleck zerstörungsfrei lokalisiert und mit einem Stift in Tropfenform umrandet (Fig. 2, Phase A). Die Überführung wird auf der DC-Platte vorgenommen. Dazu muss die Sorptionsschicht

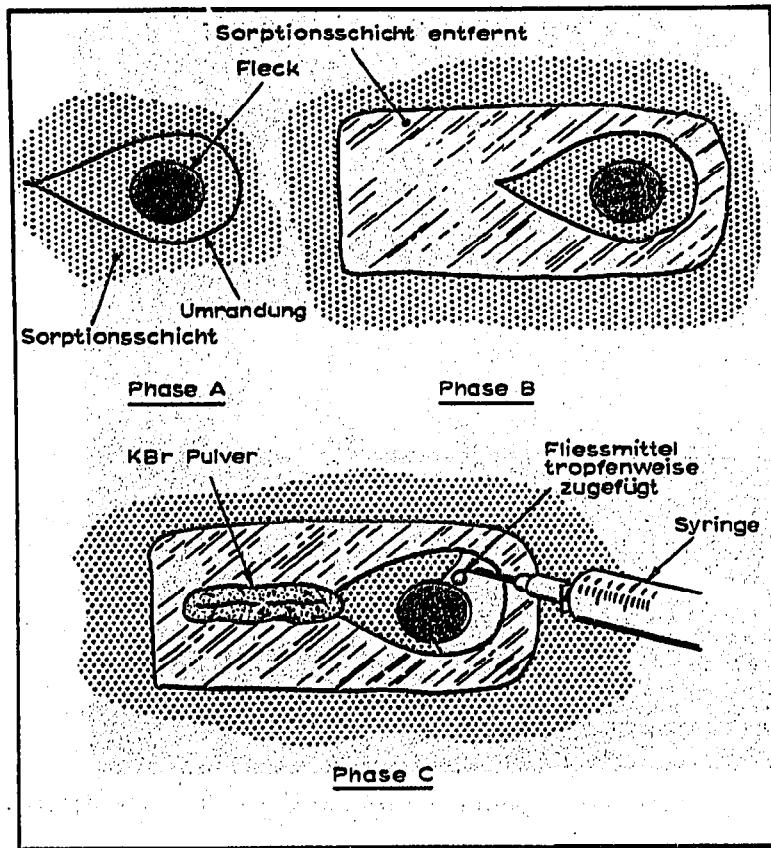


Fig. 2. Schematische Darstellung der DC-IR "Direct-Transfer Methode" nach RICE²¹.

ausserhalb der markierten Fläche entfernt werden (Fig. 2, Phase B). Dann werden ca. 20 mg KBr-Pulver auf die Platte gegeben, so dass ein 6-8 mm langer und 2 mm breiter Hügel entsteht. Dieser muss mit der Spitze des Flecks Kontakt haben (Fig. 2, Phase C). Dann spült man die Substanz vom Sorptionsmittel in die zweite Hälfte des KBr-Hügels hinüber. Die erste Hälfte des KBr-Hügels, welche sich an den Fleck anfügt, ist mit beträchtlichen Mengen Sorptionsmittel verunreinigt und wird deshalb verworfen. Die zweite Hälfte, welche die Substanz enthält, wird zum Herstellen des Mikropresslings verwendet. Die Methode von RICE bewährte sich in unserem Labor gleich gut wie die Wick-Stick Methode. Es ist zu beachten, dass zu rasche Lösungsmittel-Zugabe zu Substanzverlusten führen kann, weil die Lösung nicht nur in den KBr-Hügel, sondern auch auf die blanke Platte fliesst.

DE KLEIN¹⁴ hat die Methode von RICE modifiziert, indem er das KBr-Pulver nicht in Form eines geraden, sondern eines halbmondförmigen Hügels um den Fleck auf der Glasplatte anordnet. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Varianten besteht jedoch darin, dass sich der Hügel bei der KLEIN-Methode nicht mehr in direktem Kontakt mit dem Sorptionsmittel-Fleck befindet, sondern 1-2 mm davon entfernt ist. Außerdem übernimmt das KBr nicht mehr die Rolle eines Filters wie dies bei anderen Überführungsmethoden der Fall ist, weil die ganze KBr-Menge zur Herstellung des Presslings verwendet werden muss. Die halbmondförmige Anordnung ermöglicht zwar eine gute Ausbeute, aber die erhaltenen IR-Spektren zeigen—

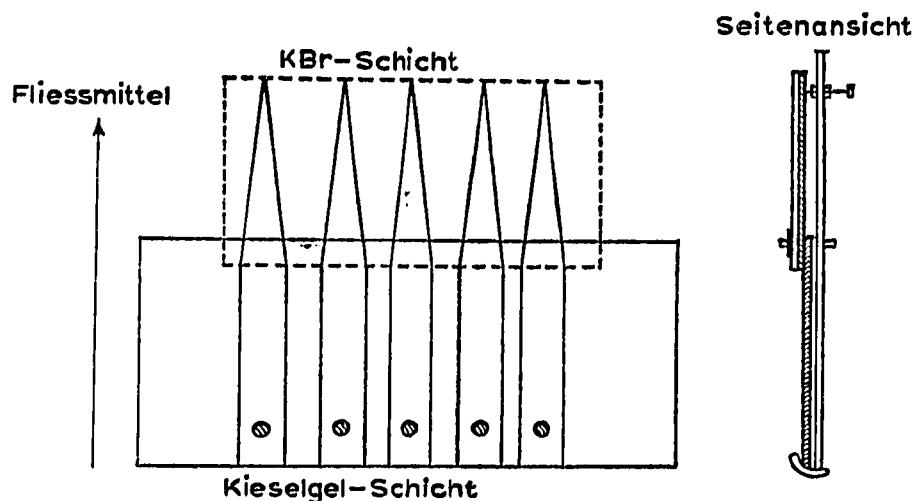


Fig. 3. Schematische Darstellung der DC-IR "Plate Transfer Methode" nach GOODMAN⁹.

hauptsächlich bei Verwendung von polaren Überführungsmitteln—starke Kontaminationen von mitgeschlepptem Schichtmaterial.

GOODMAN⁹ hat die *Plate Transfer Methode* entwickelt. Seine ursprüngliche Idee war die simultane Herstellung von Kieselgel und KBr-Schichten auf einer einzigen Platte mittels eines in zwei Kammern geteilten Streichgerätes. Diese Methode konnte nicht realisiert werden, da die beiden Schichten keine laterale Bindung ergaben. Er arbeitet mit zwei verschiedenen Platten: die erste wird mit dem Sorptionsmittel und die zweite mit KBr-Pulver beschichtet. Auf der ersten Platte wird das zu untersuchende Gemisch getrennt und zerstörungsfrei nachgewiesen. Darauf wird die Platte um 90° gedreht und oben mit der zweiten Platte verbunden (Schicht gegen Schicht gemäss, Fig. 3). Die zerstörungsfrei nachgewiesenen Komponenten werden nun von der Trennschicht in die KBr-Schicht hinübergespült. Eine etwa 2 cm² grosse Fläche der 0.5 mm dicken KBr-Schicht wird zur Herstellung des Presslings verwendet. Die Nachweisgrenze wird mit ca. 50 μ g angegeben.

DC-MS MIKROTRANSFER

Bisher verwendete Methoden

Die bis heute bekannten Methoden zum Mikrotransfer zwischen DC und MS sind unserer Meinung nach mit verschiedenen Nachteilen behaftet. FETIZON⁵ hat aus einer grösseren Anzahl von 0.25 mm DC-Platten mehrere Milligramme Substanz durch Extraktion isoliert und zur Aufnahme der Massenspektren eingesetzt. Auch wir haben diese Methode in unseren Laboratorien erprobt, mit dem Unterschied, dass wir 1-2 mm dicke préparative Schichten verwendeten. Dieses Vorgehen ist sicher, aber zeitraubend.

Den einfachsten Weg ist McFADDEN¹⁸ gegangen, indem er das abgeschabte Schichtmaterial zusammen mit der darauf adsorbierten Substanz direkt in den Massenspektrographen einbrachte. SPITTELER²⁶ hat jedoch darauf hingewiesen, dass diese direkte Technik unüberwindliche Schwierigkeiten bereitet. Der Massenspektrograph wird mit Sorptionsmittelstaub verschmutzt und es muss mit einem mehrtägigen Aus-

fall des Gerätes gerechnet werden. Ausserdem ist der Untergrund hoch und die Entgasung des Schichtmaterials nicht möglich.

SCHWARTZ und Mitarb.^{22,23} haben die zerstörungsfrei lokalisierte Substanz aus dem DC-Fleck einer Platte mit wenig Lösungsmittel extrahiert, den Extrakt eingengt und aliquote Teile des Konzentrats mit 1–5 µg Substanz zur Aufnahme der Spektren verwendet. Auf diese Weise erhaltene Spektren haben einen starken Untergrund und die von der Substanz stammenden Signale sind kaum zu erkennen. Die Methode ist nur für die Untersuchung leicht erkennbarer chlorhaltiger Verbindungen geeignet. KAISER¹³ hat die DC-Trennung auf Quarzplatten ausgeführt und die Flecken von "unten" mit einer kleinen Sauerstoff-Wasserstoff-Flamme erhitzt. Die Substanz wird dabei verdampft und gelangt mit Hilfe eines inerten Trägergases in einen Massenspektrographen. Voraussetzung ist dabei, dass die zu untersuchende Substanz unzersetzt verdampfbar ist. Dies ist nicht immer möglich, da sich bekanntlich zahlreiche organische Substanzen unter Hitze-Einwirkung zersetzen, besonders wenn sie sich im adsorbiertem Zustand befinden. KAISER empfiehlt für solche Fälle die Verwendung von weniger aktivem Material, aber er weist gleichzeitig darauf hin, dass dann die Trennung erschwert wird.

Wir haben versucht, die Nachteile der oben beschriebenen Methoden zu umgehen. Eine brauchbare Mikrotransfer-Methode sollte:

ohne Beschränkung in den jeweils verwendeten Sorptionsmitteln möglichst viele Substanz-Klassen erfassen können,

qualitativ gute, Untergrund-freie Spektren liefern,

weniger Zeit in Anspruch nehmen als die für die Isolierung von Milligramm-Mengen Substanz erforderlich ist,

das MS-Gerät nicht über längere Zeit blockieren.

Neue Methoden

Die guten Erfahrungen mit der Wick-Stick und der Direkt Transfer Methode nach RICE für die IR-Spektroskopie haben uns ermuntert, auch den DC-MS Transfer mittels KBr auszuführen.

Ein ca. 80 mm langes Schmelzpunkttröhrchen mit 1 mm Innendurchmesser wird mit fein pulverisiertem KBr (Korngrösse = ca. 5 µ) bis 6 mm unterhalb des Randes gefüllt. Dann wird ein 8 mm langes, mit Aceton gewaschenes Glaswollebüschel mit einem dünnen Glasstäbchen in das Schmelzpunkttröhrchen gestopft, so dass ein etwa 3 mm langer Propfen entsteht. Zur Erleichterung dieser Arbeit verwendet man am besten eine Leuchtlupe. Das untere Ende des Röhrchens wird so abgeschnitten, dass eine 50 mm lange mit KBr gefüllte Mikrosäule zur weiteren Verwendung zurückbleibt.

Der für den Transfer vorgesehene Fleck wird von der DC-Platte abgekratzt und in einem kleinen Reagenzgläschen gesammelt. Zum Herauslösen der Substanz aus dem Sorptionsmittel werden mittels einer Mikrospritze ca. 30 µl Lösungsmittel (z.B. Methylenechlorid, Aceton, Methanol) zugegeben. Dann stellt man die vorbereitete Mikrosäule mit dem Glaswolle-Propfen nach oben senkrecht in das Gläschen hinein und stützt sie mit einer Metallkappe (Fig. 4). Sobald das Lösungsmittel in die Säule aufgestiegen ist, werden weitere 30 µl Lösungsmittel in das Gläschen gegeben. Dies wird, wenn notwendig, nochmals wiederholt, bis die Substanz in den oberen Teil der Säule gewandert ist. Bei farbigen Verbindungen kann die Überführung leicht ver-

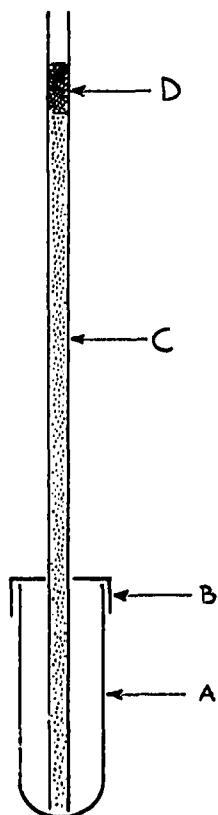


Fig. 4. Schematische Darstellung der DC-MS Mikrotransfer Methode mittels KBr-gefüllter Mikrosäule. A = Reagenzgläschen; B = Metallkappe; C = KBr-gefüllte Mikrosäule (Durchmesser 1 mm); D = Glaswolle.

folgt werden. Für farblose Substanzen muss die benötigte Lösungsmittelmenge in Vorversuchen ermittelt werden. Dazu wird eine KBr-Füllung mit Zusatz von 2% anorganischem Fluoreszenzindikator (z.B. ZS Super der Fa. Riedel de Haen) verwendet und die Säule unter kurzwelligem UV-Licht, nach Zugabe von jeweils 30, 60, 90, etc. μ l Lösungsmittel beobachtet. Der untere 15 mm lange Teil der Säule wirkt, wie im Fall von Wick-Stick, als Filter. Nach Aufsteigen der letzten Portion Lösungsmittel wird dieser abgebrochen und weggeworfen. Der zurückgebliebene obere Teil enthält die gewünschte Substanz und wird in das Massenspektrometer eingeführt, nachdem auch das andere Ende der Säule mit Glaswatte zugestopft worden ist.

Die Spektren werden mit einem CEC 21-110B Massenspektrometer aufgenommen. Die Proben werden durch das Direkt-Einlass-System eingeführt, dessen Probenkopf so abgeändert ist, dass die Kapillare hineingesteckt werden kann. Dasjenige Ende der Kapillare, welches die Substanz enthält, kann unabhängig von der Ionenquelle geheizt werden. Die auf diese Weise erhaltenen Massenspektren sind mit jenen der direkt aufgenommenen reinen Substanzen vergleichbar. Der Substanzbedarf lag im günstigsten Fall bei 1 μ g. Die Background-Peaks aus dem Schichtmaterial sind vernachlässigbar. In letzter Zeit haben wir noch weitere Modifikationen der DC-MS Mikrotransfer Technik versucht, von denen eine kurz beschrieben sei:

Die Überführung wird zuerst gleich wie in der Wick-Stick Methode vorgenom-

men. Dann wird die Spitze verrieben, mit wenig Lösungsmittel extrahiert und die Lösung auf das eine Ende eines Oxidkeramikstäbchens (Degussit AL 23) aufgetropft (Fig. 5). Man lässt das Lösungsmittel jeweils verdampfen; gegebenenfalls wird durch leichtes Erwärmen mit einer Infrarotlampe beschleunigt. Nachdem alles Lösungsmittel verdunstet ist, wird das Stäbchen in das Massenspektrometer eingeführt.

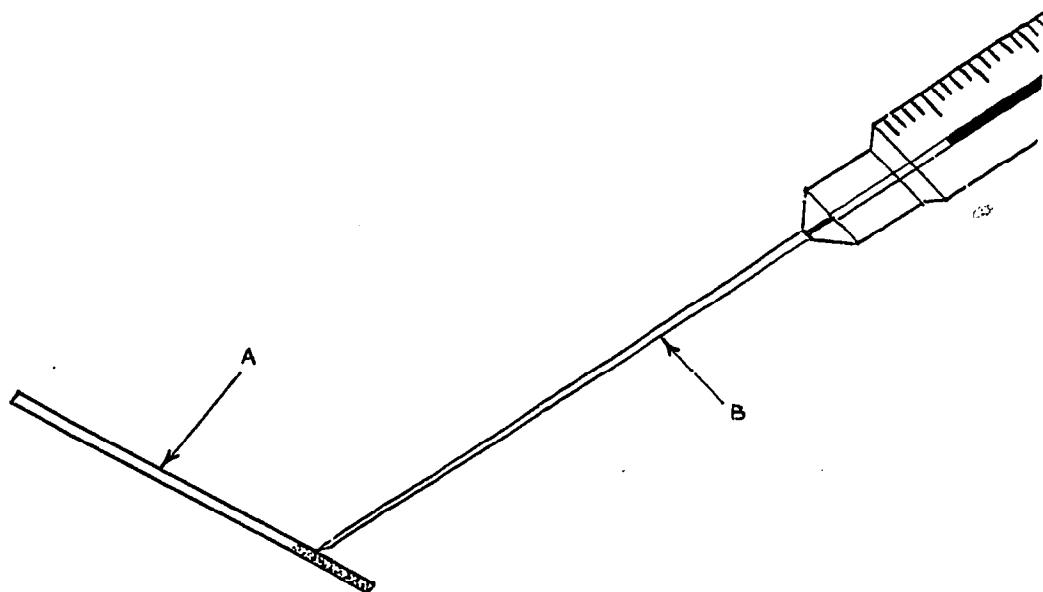


Fig. 5. Schematische Darstellung der DC-MS Mikrotransfer Methode mittels Oxidkeramikstäbchen. A = Degussit AL 23-Stäbchen der Fa. Degussa (Frankfurt a.M.); B = Mikrospritze mit dem Extrakt aus der Wick-Stick Spitze.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Mikrotransfer-Arbeiten in einem staub- und dampfarmen Labor ausgeführt werden müssen. Alle Glaswaren, die mit der zu transferierenden Substanz in Kontakt kommen, müssen peinlich sauber sein. Die selbsthergestellten Kieselgel- oder -Alox-Schichten werden unmittelbar vor der DC mit abs. Methanol gewaschen. Dazu werden die aktivierten Platten in eine abs. Methanol enthaltende Trennkammer gestellt. Sobald die Lösungsmittelfront den oberen Rand erreicht hat, wird die Platte herausgenommen und die obere, 20 mm breite Schicht abgekratzt und verworfen. Dieser Teil enthält die allfällig vorhandenen organischen Verunreinigungen aus dem Schichtmaterial. Nach dem Waschen werden die Platten reaktiviert. Fluoreszenzpigment-enthaltende Schichten sollen keine UV-Licht-absorbierenden Zonen mehr enthalten, sonst sind sie unbrauchbar. Fliessmittel und Überführungsmittel müssen von reinster Qualität sein.

DANK

Für wertvolle Mitarbeit bei der Überprüfung bzw. Entwicklung dieser Mikrotransfer Techniken danke ich Frau M. SPITZER und Herrn R. DELLEY, sowie den Herren K. O. ALT, Dr. W. RICHTER und Dr. P. WITZ für die spektroskopischen Entwicklungsarbeiten.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur spektroskopischen Strukturaufklärung bzw. -bestätigung von dünnsschicht-chromatographisch getrennten Verbindungen werden verschiedene, teilweise neue Mikrotransfer Methoden beschrieben. Diese ermöglichen die Überführung kleiner Substanzmengen aus dem Schichtmaterial in das Infrarot- bzw. Massenspektrometer.

LITERATUR

- 1 K. BEYERMANN, *Z. Anal. Chem.*, 226 (1967) 16.
- 2 K. BEYERMANN UND E. RÖDER, *Z. Anal. Chem.*, 230 (1967) 347.
- 3 V. ČERNÝ, J. JOSKA UND L. LÁBLER, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 26 (1961) 1658.
- 4 D. DOSKOČILOVÁ, *Chem. Listy*, 55 (1961) 193.
- 5 M. FETIZON, in G. B. MARINI-BETTOLI (Herausgeber), *Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 1964, S. 69.
- 6 R. FONTANGES, P. HERITIER UND P. COEUR, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 1223.
- 7 M. M. FRODÝMA, R. W. FREI UND D. J. WILLIAMS, *J. Chromatog.*, 13 (1964) 61.
- 8 H. R. GARNER UND H. PACKER, *Appl. Spectry.*, 22 (1967) 122.
- 9 G. W. GOODMAN, in E. J. SHELLARD (Herausgeber), *Quantitative Paper- and Thin-Layer Chromatography*, Academic Press, London, New York, 1968, S. 91.
- 10 A. L. HAYDEN, *J. Pharm. Sci.*, 51 (1962) 617.
- 11 U. HEBER, *Z. Anal. Chem.*, 161 (1958) 409.
- 12 H. JORK, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 17.
- 13 R. KAISER, *Chem. Britain*, 5 (1969) 54.
- 14 W. J. DE KLEIN, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 667.
- 15 F. KORTE UND H. WEITKAMP, *Angew. Chem.*, 70 (1958) 434.
- 16 G. KORTÜM UND J. VOGEL, *Angew. Chem.*, 71 (1959) 451.
- 17 R. N. MCCOY UND E. L. FIEBIG, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 593.
- 18 W. H. MCFADDEN, *Separation Sci.*, 1 (1966) 723.
- 19 B. V. MILBORROW, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 194.
- 20 N. NASH, P. ALLEN, A. BEVENUE UND H. BECKMANN, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 421.
- 21 D. D. RICE, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 1907.
- 22 M. A. SCHWARTZ, P. BOMMER UND F. M. VANE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 121 (1967) 508.
- 23 M. A. SCHWARTZ, F. M. VANE UND E. POSTMA, *Biochem. Pharmacol.*, 17 (1968) 965.
- 24 H. SELIGSON, B. KRAMER, D. SELIGSON UND H. BALTRUSH, *Anal. Biochem.*, 6 (1963) 362.
- 25 M. K. SNAVELY UND J. G. GRASSELLI, *Develop. Appl. Spectry.*, 3 (1963) 119.
- 26 G. SPITTELER, in H. KIENITZ (Herausgeber), *Massenspektrometrie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse, 1968, S. 427.
- 27 E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 3.
- 28 E. STAHL UND E. DUMONT, *J. Chromatog.*, 39 (1969) 157.
- 29 T. Y. TORIBARA UND V. DI STEFANO, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 1519.
- 30 W. H. WESTPHAL, *Physik*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1950, S. 148.