

Die Gelchromatographie großer Partikel und ihre Grenzen

Limitation of Particles Size in Gel Chromatography

WOLFRAM GERLICH, HELMUT DETERMANN und THEODOR WIELAND

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

(Z. Naturforsch. **25 b**, 1235—1239 [1970]; eingegangen am 29. Juni 1970)

The behaviour of molecules and particles of 2–400 nm radius in gel chromatography was investigated using sephadex, agarose, and pearl shaped cellulose gel of different porosity. Correlations between elution volumes and particle sizes are given in Fig. 1. We found that particles from ca. 400 nm diameter upwards were more or less irreversibly adsorbed depending on the particle size. So only 15% of rat liver mitochondria and 5% of *E. coli* bacteria could be eluted from the loose cellulose Cu3. It is assumed that this adsorption is due to the absence of Brownian motion of large particles, which therefore are more or less subject to the gravity and to adsorption forces of the gel.

Ein perlförmiges Cellulosegel ist im Laboratorium der Autoren kürzlich hergestellt und in seiner Brauchbarkeit zur gelchromatographischen Trennung hochmolekularer Substanzen untersucht worden¹. Als vorteilhaft gegenüber den weitvernetzten Dextrangelen oder den aus Agarose erhaltenen Gelperlen² wurde die große mechanische und chemische Stabilität des Cellulosegels hervorgehoben. Die Perlen lassen sich in verschieden großer Porosität herstellen¹ und widerstehen dem hydrostatischen Druck bei der Säulenchromatographie gut. Maximale Porosität eines Gels ist deshalb interessant, weil sich die neuere Molekularbiologie mit Teilchen beschäftigt, die über den Größenordnungsbereich von Proteinen (Mol.-Gew. $5 \cdot 10^5$) hinaus bis zu einzelnen Zellen gehen, die möglicherweise chromatographisch getrennt werden sollten. K. KESSELRING und H. REHNER hatten in einigen Versuchen mit aus Cuoxamlösung regenerierten Gelperlen (Cu3) eine partielle Trennung von Rattenlebermitochondrien und -lysosomen beobachtet³. Es war der Zweck der hier beschriebenen Versuche, die chromatographische Trennbarkeit von Partikeln verschiedener Größe prinzipiell und systematisch kennen zu lernen und zu ermitteln, bei welcher Partikelgröße die Grenze einer gelchromatographischen Praktikierbarkeit liegt.

Material und Methoden

Es wurden Cellulosegelperlen verschiedener Porosität (*Vernetzungsgrad*) sowohl aus Cuoxamlösung (Cu)

als auch aus Xanthogenatlösung⁴ (Xa) nach der Vorschrift von l. c.¹ hergestellt und in ihrer Trennleistung untersucht. Die dem Typ Cu oder Xa nachgestellte Zahl gibt den Prozentgehalt an Cellulose an, der in der entsprechenden Lösung vor der Emulsionsregenerierung vorgegeben war. In die Versuche mit einbezogen wurde ferner ein Cellulosefüllstoffgel FS, das durch Regenerieren einer Cuoxamlösung mit Essigsäure erhalten wurde, die unter Stickstoff mit feinstkörnigem CaCO_3 angeteigt war: 30 ml 8-proz. Cuoxamlösung wurden mit 55 g CaCO_3 von 400–700 nm Korngröße angeteigt, das durch Einleiten von CO_2 in eine 60° warme gesättigte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung mit 0,15% CaCl_2 -Gehalt erhalten worden war⁵. Die einheitlich krümelige Masse wurde in einem Erlenmeyerkolben 3 Stdn. unter CO_2 geschüttelt und dann portionsweise in 500 ml 20-proz. Essigsäure eingetragen. Nach 3-stdg. Rühren wurden die feineren Anteile mit einem Sieb von 0,315 mm Maschenweite abgetrennt und die größeren naß durch das Sieb gepreßt. Eine leichte Braunfärbung wurde durch kurze Behandlung mit 0,1 N Salzsäure beseitigt. Die nicht zu verwendenden flockigen Anteile wurden durch ein Sieb mit 0,1 mm Maschenweite abgetrennt.

Bei den meisten Chromatographieversuchen wurde die Testsubstanz in 0,5 ml Puffer über einen Dreiweghahn in ein auf 8 °C temperiertes Trennrohr (Serva, Heidelberg HDS 600 \times 12 mm, $V_t = 64$ ml) eingegeben und mit 9 ml Phosphatpuffer, pH 7, pro Stde. von unten nach oben eluiert. Proteine, Bakterien und Nucleinsäuren wurden mit einem registrierenden Durchflußphotometer bei 254 nm (UV-Monitor, Serva, Heidelberg) nachgewiesen. Dextrane wurden im fraktionierten Eluat mit dem Anthrontest bestimmt⁶. Die Elutionsvolumina V_e wurden um das Totvolumen des Systems korrigiert. Die Elutionsausbeute wurde durch Extinktionsmessungen bestimmt.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. TH. WIELAND, MPI f. Medizinische Forschung, Abt. Chemie, D-6900 Heidelberg I, Jahnstr. 29.

¹ H. DETERMANN, H. REHNER u. TH. WIELAND, Makromolekulare Chem. **114**, 273 [1968].

² S. BENGTSSON u. L. PHILIPSON, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **79**, 399 [1964].

³ H. REHNER, Diplomarbeit, Frankfurt a. M. 1967.

⁴ H. ELMGREN, Ark. Kemi **24**, 241 [1965].

⁵ A. JEVINŠ, F. OŠIS u. E. MATNEUSS, Latvijas PSR Zinatnu Akad. Vestis **91**, 87 [1955], C. A. **49**, 15583 [1955].

⁶ K. A. GRANATH and B. E. KVIST, J. Chromatogr. [Amsterdam] **28** (1), 69 [1968].

Substanz	$[\bar{M}_w]$	$[r^*]$ nm	Lit.	[K_{av}]-Werte an Geltyp					
				Xa 6	Xa 4	Xa 3	Cu 3	FS	S 2 B
Cytochrom	$1,3 \cdot 10^4$	1,74	11	0,78	0,93	0,91	1,00	—	1,04
Ribonuclease	$1,36 \cdot 10^4$	1,92	11	0,76	—	—	—	—	—
Chymotrypsin	$2,28 \cdot 10^4$	2,28	11	0,60	—	—	—	—	—
Trypsin	$2,37 \cdot 10^4$	2,41	11	0,67	—	—	—	—	—
Ovalbumin	$4,5 \cdot 10^4$	2,80	11	0,48	—	—	—	—	—
Serumalbumin	$6,7 \cdot 10^4$	3,61	—	0,42	0,73	0,78	0,89	—	0,96
Lactadehydrogenase	$1,42 \cdot 10^5$	4,20	12	0,34	—	—	—	—	—
Dextran 40	$3,9 \cdot 10^4$	4,4	6	0,31	—	0,71	—	—	0,92
Dextran 110	$1,01 \cdot 10^5$	6,5	6	—	—	—	0,77	—	—
Dextran 220	$2,2 \cdot 10^5$	9,5	6	0,02	—	—	—	—	0,69
Fettsäuresynthetase	$2 \cdot 10^6$	12,5	13	—	0,37	0,62	0,64	—	—
Dextran 460	$4,57 \cdot 10^5$	14,1	6	—	0,32	—	—	—	—
Dextran 1040	$1,04 \cdot 10^6$	21,0	6	—	0,19	0,50	—	0,69	—
Dextran 2300	$2,3 \cdot 10^6$	31,4	6	—	—	—	—	0,65	0,39
T3-Phagen	$1 \cdot 10^8$	34,5	7,14	—	—	—	0,54	0,65	—
Dextran 6700	$6,7 \cdot 10^6$	53,8	6	0,01	0,07	0,29	0,37	0,57	0,04
T2-Phagen	$2,15 \cdot 10^8$	100	7,14	—	—	—	0,30	—	—
Lysosomen	$2 \cdot 10^{11}$	200	—	—	—	—	0,07	—	—
Mitochondrien	$1,1 \cdot 10^{11}$	350	—	—	—	—	0,02	—	—
<i>Staphylococcus albus</i>	$5,3 \cdot 10^{11}$	500	14	—	—	—	0,01	—	—
<i>E. coli</i>	$2,5 \cdot 10^{12}$	1000	14	0	0	0	0	0,17	0

Tab. 1. Molgewichte \bar{M}_w , Partikelradien r und K_{av} -Werte der verwendeten Eichsubstanzen. * Für $r > 34$ nm und Fettsäuresynthetase ist der halbe größte Partikeldurchmesser, für $r < 34$ nm und Dextran 6700 der Stokes'sche Radius angegeben. Für die Dextrane wurde r entsprechend $r \sim \sqrt[3]{M}$ nach l. c. ⁶ errechnet. M ist für Partikel mit $r > 200$ nm das Gewicht entsprechend großer Wassertropfchen in Daltons. Weitere Angaben bei Abb. 1.

Die Proteine wurden von Serva, Heidelberg, bzw. Boehringer, Mannheim, bezogen. Die Dextrane mit enger Mol.-Gew.-Verteilung stammten von K. A. GRANTH, Fa. Pharmacia. Die Fettsäuresynthetase, ein Multienzymkomplex aus Hefe wurde uns liebenswürdigerweise von Herrn Dr. E. SCHWEIZER, München, zur Verfügung gestellt. Die *E. coli*-Phagen T2 und T3 wurden ungereinigt aus der Suspensionskultur (Titer $10^9 - 10^{10}$) unter sterilen Bedingungen chromatographiert und im fraktionierten Eluat mit dem Plaquetest auf einem *E. coli*-Zellrasen quantitativ nachgewiesen⁷. Mitochondrienfraktionen wurden aus frischer Rattenleber durch Homogenisieren nach Potter-Elvehjem und differentieller Zentrifugation erhalten⁸. Die Mitochondrien wurden anhand ihres Gehaltes an Glutamatdehydrogenase⁹, die Lysosomen mit saurer β -Glycerophosphatase¹⁰ als Leitenzym quantitativ nachgewiesen.

Ergebnisse

Zur Kennzeichnung der verschiedenen Geltypen wurde der Elutionsparameter $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ für insgesamt 21 Substanzen mit bekanntem Partikelradius säulenchromatographisch gemessen.

V_e ist das Elutionsvolumen der Substanz, V_t das Gesamtvolumen der Gelpackung, V_0 das Leervolumen der Gelpackung. V_0 wurde mit einer Suspension von gefriergetrockneten *E. coli*-Zellen gemessen. (Nur am Geltyp FS werden diese Partikel nicht ausgeschlossen. Hier wurde V_0 nicht gemessen, sondern V_0/V_t zu 0,42 angenommen.)

Die erhaltenen Werte sind in Tab. 1 zusammengefaßt und in Abb. 1 graphisch dargestellt. Die Meßwerte folgen für die einzelnen Gele mit ausreichender Genauigkeit den Geraden in Abb. 1, so daß folgender Gleichungstyp erhalten wird:

$$K_{av} = -a \cdot \log r + b.$$

Diese Beziehung wurde in ähnlicher Form schon für vernetzte Dextrangele angegeben, dort wurde anstelle des Partikelradius r das Mol.-Gew. globulärer Proteine eingesetzt¹¹. Da in der vorliegenden Untersuchung Eichsubstanzen aus den verschiedensten Stoffklassen verwendet wurden, wurde K_{av} als Funktion des Partikelradius angegeben.

⁷ U. SCHÄFER, Dissertation, Frankfurt a. M. 1969.

⁸ G. D. BIRNIE and S. M. FOX, Subcellular Components, Butterworths Publ., London 1969.

⁹ H. U. BERGMAYER (Herausg.), Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

¹⁰ R. GIANETTO and CH. DE DUVE, Biochem. J. **59**, 433 [1955].

¹¹ H. DETERMANN u. W. MICHEL, J. Chromatogr. [Amsterdam] **14**, 317 [1964].

¹² R. JAENICKE u. S. KNOF, European J. Biochem. **4**, 157 [1968].

¹³ F. LYNEN, in: COLOWICK, KAPLAN, Methods in Enzymology, Vol. **14**, p. 17, Academic Press, New York and London 1969.

¹⁴ L. E. HAWKER: Einführung in die Biologie der Mikroorganismen, Stuttgart 1962.

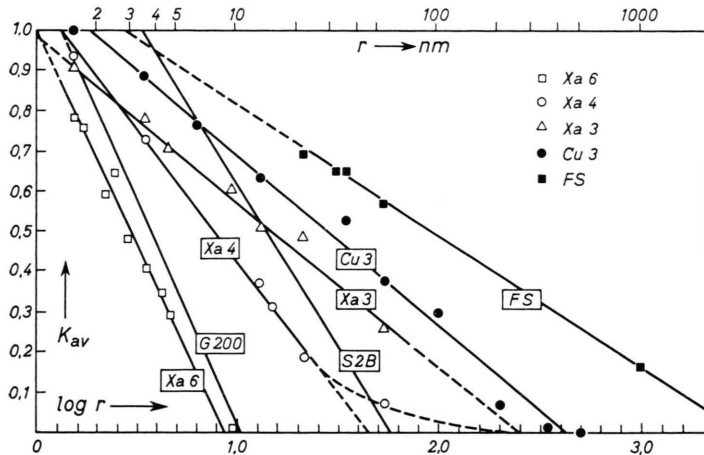


Abb. 1. Zusammenhang zwischen K_{av} und Partikelgrößen r . Xa 6, Xa 4, Xa 3 sind perlförmige Gele aus Cellulosexanthogenatlösung mit 6, 4 bzw. 3% Cellulosegehalt. Bei Cu3 wurde die Cellulose in Schweizers Reagenz gelöst. FS ist Cellulosegel, in das ein feinkörniger Füllstoff eingeschlossen wurde, der nachträglich herausgelöst besonders große Poren zurückläßt. S 2B ist 2-proz. Agarosegel, G 200 ist vernetztes Textran (Firma Pharmacia). Für G 200 wurde Gleichung 1 aus l. c.¹¹ von M auf r umgerechnet.

Aus Abb. 1 lassen sich einige quantitative Meßzahlen für die Trennleistung eines Gels erhalten; sie sind in Tab. 2 zusammengestellt. Der Faktor a , die Steigung der Geraden, ist ein Maß für die Breite der Porengrößenverteilung und zugleich für das relative Separationsvolumen zweier verschieden großer Partikelsorten.

Geltyp	a	b	$[r_{\min}]$	$[r_{\max}]$	$[P(w/v)]$
Xa 6	1,07	1,01	1,0	8,5	23
G 200	1,18	1,20	1,3	10	5
Xa 4	0,76	1,21	1,3	42	11
S 2 B	0,81	1,42	3,3	59	2
Xa 3	0,42	1,02	1,0	250	11,5
Cu 3	0,43	1,13	1,9	410	7,5
FS	0,32	1,13	2,9	3400	7

Tab. 2. Charakteristische Daten für verschiedene Cellulosegele. Sephadex G 200 und Sepharose 2B.

Der Radius, für den $K_{av} = 1$ wird, gibt die untere Grenze des Trennbereichs, sozusagen die Einschlußgrenze r_{\min} eines Gels an. Für $K_{av} = 0$ entspricht der Radius der Ausschlußgrenze r_{\max} eines Gels. Daneben wird auch der Polymergehalt der gequollenen

Gele angegeben, der einen Anhaltspunkt für die mechanische Stabilität des Gels gibt. Ein anschauliches Bild des Trennbereichs von Cu3 gibt Abb. 2.

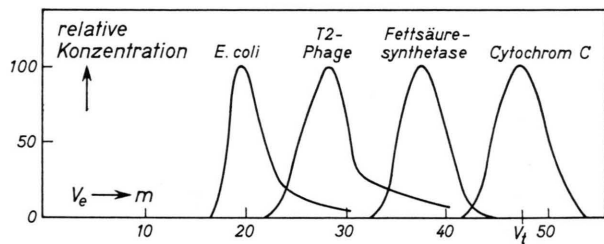


Abb. 2. Normierte Elutionskurven an Cu3, Säule 300×15 mm.

Bei der Chromatographie einer Mitochondrienfraktion aus Rattenleber an Cu3 ergab sich eine nach Abb. 3 eben nachweisbare Trennung von Mitochondrien und Lysosomen ähnlich der von REHNER und KESSELRING mit Cu2 erhaltenen³. Das Maximum der Glutaminsäuredehydrogenase-Aktivität (Mitochondrien) lag nur um eine Fraktion vor dem der sauren Phosphatase (Lysosomen); eine effektive Trennung war also nicht zu erreichen.

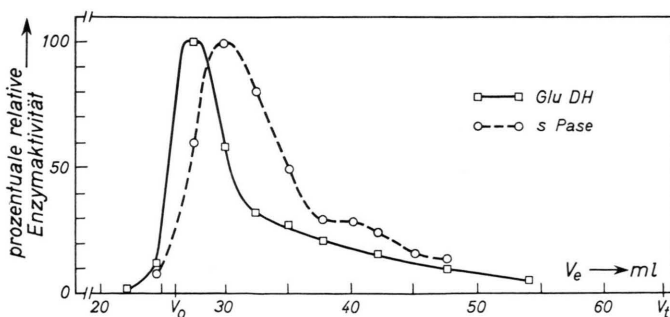


Abb. 3. Verteilung der Leitenzymaktivitäten von Mitochondrien (Glu DH) und Lysosomen (s Pase). 1 ml 20-proz. Mitochondrienfraktion wurde an Cu3 mit 0,25 M Saccharose, 0,002 M Tris/HCl pH 7,4 bei 5 °C eluiert. Säule 600 × 12 mm.

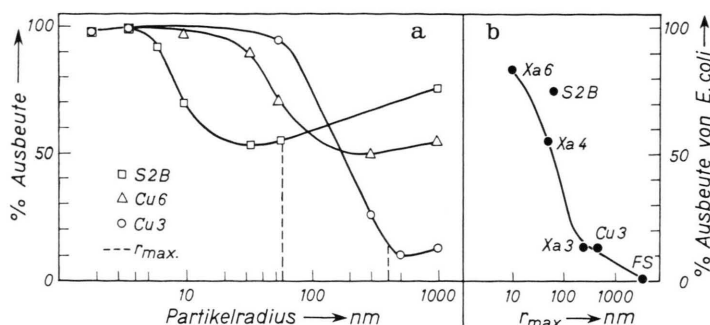


Abb. 4 a (links). Elutionsausbeute als Funktion der Partikelgröße r . Als Substanzen wurden verwendet (in der Reihenfolge zunehmender Größe): Cytochrom C, Rinderserumalbumin, Dextran 40, Dextran 220, Dextran 2300, Dextran 6700, Mitochondrienfraktion, Staphylokokken und *E. coli*.

Abb. 4 b (rechts). Elutionsausbeute von gefriergetrockneten *E. coli* als Funktion der Ausschlußgrenze r_{max} verschiedener Gele.

Bei der Chromatographie von Mitochondrien und Bakterien wird nur ein Teil der aufgegebenen Substanzmenge im Eluat wiedergefunden. Je größer die betreffende Partikelart ist, desto größer ist der im Gelbett irreversibel adsorbierte Anteil. Dieser Zusammenhang ist für drei Gelarten in Abb. 4 a dargestellt. Der prozentuale Anteil des eluierten Materials wird hier als Elutionsausbeute bezeichnet. Im Bereich, in dem Partikelgröße und Ausschlußgrenze r_{max} des Gels übereinstimmen, findet man ein Minimum der Elutionsausbeute. Wie die Ausschlußgrenze der Gele die Elutionsausbeute von *E. coli*-Zellen beeinflusst, zeigt Abb. 4 b.

Mit steigender Temperatur wird die Elutionsausbeute erhöht, so für *E. coli* an Cu3 von 9% bei 20° auf 47% bei 45°.

Der irreversibel adsorbierte Anteil der Partikel wird teilweise doch noch vom Elutionsstrom herausgelöst, so daß nach dem eigentlichen Elutionspeak die Substanz mit einer gegenüber dem Maximum 100–1000-fach verringerten Konzentration weiterhin über große Volumina im Eluat erscheint. Dieser Effekt tritt auch bei Partikeln auf, die in nicht meßbarem Umfang irreversibel adsorbiert werden, wie z. B. beim T2- und T3-Phagen. An Sepharose 2B wurde diese Erscheinung von U. SCHÄFER besonders gründlich untersucht⁷.

Manche Proteine werden an den Cellulosegelen reversibel adsorbiert, so daß sie deutlich später eluiert werden, als ihrer Größe entspricht. Speziell γ -Globuline des Serums werden an allen Cellulosegelen hinter V_t eluiert. Diese Retardierung hängt wahrscheinlich mit einer spezifischen Affinität dieser Proteinklasse (Antikörper) zur Polysaccharidmatrix zusammen.

Diskussion

An Abb. 1 sind neben den Eichgeraden der untersuchten Cellulosegele zum Vergleich auch die entsprechenden Kennlinien für Sephadex G 200 und Sepharose 2 B eingezeichnet. Xa6 entspricht in seinem Trennbereich etwa G 200, z. B. gleicht die Trennung von DNS und RNS an Xa6 vollkommen der an G 200 erreichten¹⁵. Ein wichtiger Vorteil an Xa6 ist seine ausgezeichnete mechanische Stabilität, die hohe Durchflußraten ermöglicht. Xa4 entspricht in seiner Porosität etwa einem 4-proz. Agarosegel (hier nicht eingezeichnet), weist jedoch eine etwas flachere Kennlinie auf. Die Ausschlußgrenzen von Xa3, Cu3 und besonders FS liegen deutlich höher als die der Agargele und der porösen Glasperlen¹⁶. Der große Trennbereich der Gele — bei Cu3 reicht er von $r=2$ bis 400 nm — bedingt ihre geringe Trennschärfe. An Cu3 z. B. muß sich die Partikelgröße zweier Substanzen mindestens um den Faktor 5 unterscheiden, wenn eine zufriedenstellende Trennung erreicht werden soll (s. Abb. 2). Aus diesem Grund können Mitochondrien und Lysosomen an Cellulosegelen nur unvollkommen getrennt werden.

Noch entscheidender wird der Erfolg der Gelchromatographie durch die auftretende irreversible Adsorption eingeschränkt. Mitochondrien werden an Cu3 zu 85% adsorbiert, *E. coli*-Zellen an FS vollständig. Zur Erklärung dieses Effektes kann man annehmen, daß die thermische Bewegung der Partikeln mit Durchmessern größer als 400–500 nm nicht mehr ausreicht, diese gleichmäßig über das freie Flüssigkeitsvolumen zu verteilen. Unter dem Einfluß der Schwerkraft und unspezifischer, schwacher Adsorptionskräfte (London-Kräfte, hydrophobe

¹⁵ F. BARTOLI and C. ROSSI, J. Chromatogr. [Amsterdam] **28**, 30 [1967].

¹⁶ W. HALLER, J. Chromatogr. [Amsterdam] **32**, 676 [1968].

Wechselwirkung, H-Bindung) bleiben diese großen Partikel im Gelbett liegen.

Der Anwendungsbereich der Gelchromatographie kann also auch durch die Verwendung makroporöser Cellulosegele nicht entscheidend erweitert werden. Man kann annehmen, daß es sich hierbei um eine prinzipgebundene Grenze handelt. Im konventionellen Anwendungsbereich können die Cellulosegele we-

gen ihrer guten mechanischen und chemischen Eigenschaften Vorteile bieten.

Den Herren Prof. Dr. G. MAY und Apotheker U. SCHÄFER danken wir für die Unterstützung bei den Versuchen mit Bakteriophagen. Die Arbeit wurde durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Massenspektrometrische Fragmentierung von trifluoracetylierten Terpenolen

Fragmentation Patterns of Terpenols by Mass Spectrometry

WILHELM EBBIGHAUSEN, EBERHARD BREITMAIER, GÜNTHER JUNG
und WOLFGANG VOELTER

Chemisches Institut der Universität D-74 Tübingen

(Z. Naturforsch. **25 b**, 1239—1248 [1970]; eingegangen am 12. Juni 1970)

Several trifluoroacetylated aromatic, aliphatic, monocyclic and bicyclic terpenols have been investigated by combined gas chromatography-mass spectrometry. The fragmentation patterns of these compounds are discussed.

Zur Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen mit Hydroxylgruppen wie Kohlenhydrate¹⁻³, Terpenole^{4,5}, Flavone⁶, Nukleoside⁷ und Steroide⁸⁻¹¹ eignen sich deren Trifluoracetyl-derivate. Die Verbindungen sind schnell und einfach darzustellen. Auf Grund ihrer Flüchtigkeit und thermischen Stabilität können sie gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht werden. Außerdem eignen sich diese Derivate zur Untersuchung mit der Fluorkernresonanzspektroskopie. Jede Trifluoracetylgruppe liefert ein Singulettsignal, dessen chemische Verschiebung in charakteristischer Weise von der chemischen Umgebung der Fluor-atome abhängt.

Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen war auch das massenspektrometrische Fragmentie-

ungsverhalten der Trifluoracetyl-derivate von Terpenolen von Interesse. Bei der Identifizierung und Isolierung von Terpenalkoholen aus ätherischen Ölen bietet sich eine Kombination der Fluorresonanzsensortechnik¹⁻¹¹ mit der Gaschromatographie und der Massenspektrometrie an.

Diskussion der Massenspektren von trifluoracetylierten Terpenolen

1. Aromatische Terpenole

Die Trifluoracetyl-(TFA)-Derivate von aromatischen Terpenolen sind besonders gut durch ihre Massenspektren charakterisierbar. Mit Ausnahme von Dihydrozimtalkohol tritt in allen Fällen der M⁺-

Sonderdruckanforderungen an Dr. W. EBBIGHAUSEN, Chem. Institut, D-7400 Tübingen.

¹ G. JUNG, W. VOELTER, E. BREITMAIER u. E. BAYER, *Tetrahedron Letters* [London] **1969**, 3785.

² G. JUNG, H. PAUSCHMANN, W. VOELTER, E. BREITMAIER u. E. BAYER, *Chromatographia* **3**, 26 [1970].

³ G. JUNG, W. VOELTER, E. BREITMAIER u. E. BAYER, *Liebigs Ann. Chem.* **734**, 136 [1970].

⁴ E. BREITMAIER, G. JUNG, W. VOELTER u. E. BAYER, *Tetrahedron* [London] **26**, 2053 [1970].

⁵ G. SCHNEIDER, E. BREITMAIER, G. JUNG u. W. VOELTER, *Tetrahedron* [London] **1970**, im Druck.

⁶ W. VOELTER, G. JUNG, E. BREITMAIER u. E. BAYER, in Vorbereitung.

⁷ G. JUNG, W. VOELTER, E. BREITMAIER u. E. BAYER, in Vorbereitung.

⁸ E. BREITMAIER, W. VOELTER, G. JUNG u. E. BAYER, *Angew. Chem.* **82**, 82 [1970], *Internat. Edition* **9**, 75 [1970].

⁹ G. JUNG, E. BREITMAIER, W. VOELTER u. E. BAYER, *Steroids* **15**, 275 [1970].

¹⁰ W. VOELTER, G. JUNG, E. BREITMAIER u. E. BAYER, *Organic Magnetic Resonance* **2**, 251 [1970].

¹¹ G. JUNG, W. VOELTER u. E. BREITMAIER, VI. *Internat. Sympos. für Mikrochemie*, *Transacta Vol. A*, S. 89 [1970], Verlag der Wiener Medizin. Akademie.