

Untersuchungen zur direkten Markierung von Aminosäuren durch hochenergetische ^{11}C -Atome aus Kernreaktionen

Direct Labeling of Amino Acids by Means of Hot ^{11}C -Atoms

G. Gundlach, E. L. Sattler, W. Trampisch und U. Wagenbach *

Zentrum für Biochemie und Strahlencentrum der Universität Gießen

(Z. Naturforsch **31 c**, 377–382 [1976]; eingegangen am 20. April 1976)

^{11}C -Labeling in Solid State, Methionine, Valine, α -Aminobutyric Acid, Amino Acids

Recoil labeling of amino acids can be accomplished in good radiochemical yield in solid state only. Labeling in solution or in mixture with charcoal or silicagel results in formation of a variety of different products.

Die Bedeutung kurzlebiger Isotope für die Untersuchung biologischer Vorgänge sowie zum Zwecke der Diagnostik und Therapie in der Medizin ist unumstritten.

Kurzlebige Isotope erlauben den Einsatz hoher Anfangsaktivitäten bei relativ geringer Strahlenbelastung und in biologischen Systemen die Wiederholung von Untersuchungen nach kurzen Zeiten. Das Vorkommen des Kohlenstoffs in fast jeder biologisch wichtigen Verbindung und die Halbwertszeit des Isotops ^{11}C von 20 min machen dieses Nuklid besonders nützlich. Als Positronenstrahler können die entstehenden Vernichtungsquanten unter 180° -Korrelation bei Koinzidenzbedingungen außerhalb des Organismus gemessen werden. Das führt zu einer wesentlichen Erleichterung der Lokalisierungsmöglichkeiten einer Aktivitätsverteilung.

Schon 1960 wurden mit ^{11}C -Kohlenmonoxid und ^{11}C -Kohlendioxid Lungenfunktionen untersucht^{1, 2}. Danach stieg das Interesse an ^{11}C -Verbindungen. Eine weitere Zunahme der Anwendung dieses Isotops ist zu erwarten³.

Limitierend für die Anwendung kurzlebiger Isotope ist die Schwierigkeit, das Nuklid in die chemischen Verbindungen einzubauen. Die Anwendung von ^{11}C ist demnach nur in solchen Verbindungen möglich, für die schnellverlaufende, möglichst einstufige Syntheseschritte zum Einbau zur Verfügung stehen. Die Biosynthese ist durch die notwendigen oft zeitraubenden Reinigungsschritte zur Isolierung der gewünschten Verbindung nur eingeschränkt an-

wendbar. Erzeugt man das radioaktive Atom (oder die radioaktiven Atome) durch eine Kernreaktion im organischen Molekül (Direktmarkierung), so erwartet man mannigfaltige aktive und zusätzliche durch Radiolyse erzeugte inaktive Reaktionsprodukte. Solche Nebenprodukte müssen durch schnelle Trennverfahren entfernt werden. Im Vergleich zu den Synthesen sind die erreichbaren spezifischen Aktivitäten bei der Direktmarkierung geringer. Ist aber eine gute und schnelle Trennung der direkt markierten Verbindung möglich, so steht unter Umständen die gereinigte Verbindung schon nach kurzer Zeit mit einer genügend hohen spezifischen Aktivität zur Verfügung.

Versuche zur direkten Markierung organischer Verbindungen nach Kernumwandlung sind schon frühzeitig unternommen worden⁴ und wurden stets weiter diskutiert^{5–7}. Für Aminosäuren stammt der erste Hinweis auf eine direkte Markierung aus Versuchen zur hochspannungselektrophoretischen Reinigung der im kristallinen Zustand bestrahlten Substanzen⁸. Die Methode der elektrophoretischen Analyse konnte jedoch nicht alle Zweifel an der radiochemischen Reinheit der Substanz beseitigen. Die vorliegenden Untersuchungen sollen die Befunde zur Markierung von Aminosäuren absichern.

Experimentelle Angaben

Die Bestrahlung der Proben erfolgt mit Hilfe des in Gießen zur Verfügung stehenden 65 MeV-Linearbeschleunigers. Die Energie der bei den Aktivierungsversuchen verwendeten Elektronen beträgt 40–45 MeV, die mittlere Stromstärke 20 μA , die Wiederholfrequenz 100 Hz und die Impulslänge

* Teil der Diplomarbeit U. Wagenbach.
Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. G. Gundlach, Zentrum für Biochemie, Friedrichstr. 24, D-6300 Gießen.

2 μsec . Zur Erzeugung der für den $^{12}\text{C}(\gamma, n)^{14}\text{C}$ -Prozeß notwendigen harten Bremsstrahlung wird in etwa 8 cm Abstand von der Probe ein 5 mm starkes Wolfram-Target in den Strahl gefahren. Eine Ablenkung von Restelektronen ist nicht mehr möglich. Die Intensität der Bremsstrahlung wird mit einer Durchstrahlionisationskammer überwacht. Der Strahl wird mit Hilfe eines Leuchtschirms justiert. Die Dauer der Bestrahlung für eine optimale ^{14}C -Ausbeute liegt zwischen 5 und 20 min. Sie wird für jede Versuchsserie neu bestimmt. Um die thermische Belastung und die Strahlenschädigung der Substanzen möglichst gering zu halten, werden die in Polyäthylenkapseln eingewogenen Aminosäuren mit Trockeneis umgeben und gekühlt.

Bei der Bestrahlung der Aminosäure entstehen gleichzeitig die Isotope ^{15}C und ^{13}N . Ihre kurze Halbwertszeit gewährleistet, daß bei Beginn der Aktivitätsmessung der Hydrazone nach quantitativen Gesichtspunkten nur noch ^{14}C -Aktivität vorhanden ist.

Die Aminosäuren Methionin, Valin, Leucin, Alanin, Glycin und α -Aminobuttersäure werden direkt in Proben von je 40 mg bestrahlt. Methionin wurde zusätzlich aus einer wäßrigen Lösung gefriergetrocknet. Da die lyophilisierte Aminosäure ein großes Volumen einnimmt, wurden nur Proben von 20 mg zur Bestrahlung gebracht. Valin und Methionin wurden zur Bestrahlung in wäßriger Lösung in der Konzentration von 40 mg Aminosäure pro ml verwendet. Bei der Bestrahlung der Aminosäuren in Mischung mit Adsorbentien wurden jeweils 20 mg Aminosäure im Gemisch mit 500 mg Adsorbens verwendet. Dazu wurden 100 mg Aminosäure in 4 ml Wasser gelöst und mit 2,5 g Adsorbens (Kieselgel H oder Aktivkohle) in 6 ml Wasser gemischt. Die Aufschwemmung wurde gefriergetrocknet.

Alle verwendeten Substanzen waren analysenrein oder von der besten erhältlichen Qualität. Die ^{14}C -universell markierten Aminosäuren bezogen wir von Amersham-Buchler. Die Dünnschichtchromatogramme wurden mit DC-Fertigplatten Kieselgel H F₂₅₄ (Merck) durchgeführt. Als Pufferlösung pH 5,0 diente ein Citrat-Natronlauge-Titrisol. Ninhydrin wurde als gesättigte wäßrige Lösung, 2,4-Dinitrophenylhydrazin 0,4-prozentig in 2 N Salzsäure verwendet.

Die Destillationsapparatur (modifiziert nach ¹⁴) für den Aldehyd bestand aus 2 Rundkolben (einer davon eisgekühlt), die durch eine Brücke mit einem Hahn zum Vakuumanschluß verbunden waren.

Zur Messung der Radioaktivität diente ein Radio-Dünnschicht-Chromatograph (Friesicke-Höpfner), zur Remissionsmessung ein Chromatogramm-Spektrophotometer (Carl Zeiss). Die Eichung der Meß-

geräte für die Radioaktivität erfolgte mit Hilfe eines bekannten ^{22}Na -präparates im Bohrloch.

Alle Arbeitsgänge wurden nach einem genauen Zeitplan durchgeführt. Nach dem Ende der Bestrahlung wurden jeder in 2 ml Wasser gelösten Probe 0,5 μCi ^{14}C -Aminosäure zugesetzt, aliquote Teile abgenommen und die Aktivität bestimmt. Nach genau 5 min wird eine Wasserdampfdestillation zur Abtrennung flüchtiger Anteile angeschlossen. Nach 9 min wird Ninhydrinlösung zugefügt, der sich bildende Aldehyd abdestilliert, mit dem 2,4-Dinitrophenylhydrazin abgefangen und bei 0 °C kristallisiert. Die Kristalle werden nach 20 min durch Nutschen von der Mutterlauge getrennt, mit 2 N Salzsäure kalt gewaschen und im Vakuum bei 100 °C getrocknet. Nach 35 min kann ein aliquoter Teil des getrockneten Hydrazons auf die Dünnschichtplatte aufgetragen werden. Mit Toluol wird das Chromatogramm entwickelt und 50 min nach Ende der Bestrahlung die Radioaktivitätsverteilung wiederholt gemessen. Eine letzte Messung erfolgt nach 24 h, um den Gehalt an ^{14}C zu ermitteln.

Ergebnisse und Diskussion

Bei der Bestrahlung von Aminosäuren unter gleichzeitiger Bildung von ^{14}C -Atomen durch den $^{12}\text{C}(\gamma, n)^{14}\text{C}$ -Prozeß muß man mit Radiolyse- oder Reaktionsprodukten rechnen, die sich im ungünstigen Falle um ein oder zwei C-Atome von der bestrahlten Aminosäure unterscheiden. Zur Untersuchung, in welchem Ausmaß eine direkte Markierung der bestrahlten Substanz vorlag, wurde daher mit Hilfe der Ninhydrinreaktion die Aminosäure unter Abspaltung von Kohlendioxid und Ammoniak zum korrespondierenden, um ein C-Atom ärmeren Aldehyd zerlegt. Der entstehende Aldehyd wurde destilliert und kristallin mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin als 2,4-Dinitrophenylhydrazon abgetrennt. Diese mehrstufige Reaktionskette (Zerlegung des Moleküls, Destillation des Aldehyds, Kristallisation des Derivates), die mit einem chromatographischen Reinigungsschritt abgeschlossen wird und die mit einer Wasserdampfdestillation zur Abtrennung flüchtiger Reaktionsprodukte vor der Umsetzung mit Ninhydrin eingeleitet wurde, soll die Erfassung mitgeschleppter, chemisch ähnlicher Substanzen minimieren. Dementsprechend ist es notwendig, die Trennfähigkeit des chromatographischen Systems so zu gestalten, daß die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Aldehyde, die sich nur um ein Kohlenstoffatom von dem der eingesetzten Aminosäure entsprechenden

Tab. I. ^{14}C -Gehalt der bestrahlten Aminosäuren. In der ersten Spalte ist die Zahl der Versuche angegeben, deren Mittelwert den Angaben in den Spalten I–IV zugrunde liegt. Alle Angaben beziehen sich auf das Ende der Aktivierung. In der zweiten Hälfte der Spalte wird die auf I bezogene radioaktive Ausbeute (nach gemessenen Impulsen) in % angegeben.

I, ^{14}C -Aktivität der bestrahlten Probe nach dem Lösen in Wasser.

II, ^{14}C -Aktivität der Aminosäuren nach Entfernung flüchtiger Anteile durch Wasserdampfdestillation.

III, ^{14}C -Aktivität der Dinitrophenylhydrazone ohne chromatographische Abtrennung möglicher Verunreinigungen.

IV, ^{14}C -Aktivität der Dinitrophenylhydrazone nach der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit Toluol als Fließmittel.

Substanz	Zahl der Versuche N	I Aktivität der rohen Probe		II Aktivität nach Wasserdampfdest.		III Aktivität des Hydrazons krist.		IV Aktivität des Hydrazons chrom.	
		[$\mu\text{Ci}/\text{mg } ^{12}\text{C}$]	[%]	[$\mu\text{Ci}/\text{mg } ^{12}\text{C}$]	[%]	[$\mu\text{Ci}/\text{mg } ^{12}\text{C}$]	[%]	[$\mu\text{Ci}/\text{mg } ^{12}\text{C}$]	[%]
L(–)-Methionin kristallisiert	35	3,23	100	1,99	61,4	0,47	11,7	0,43	10,7
gefriergetrocknet		1,41	100	—	—	0,26	15	0,23	13,0
L(+)-Valin kristallisiert	5	1,89	100	1,09	58,1	0,99	42,0	0,82	34,7
L-Leucin kristallisiert	3	0,93	100	0,69	74,5	0,40	36,1	0,36	32,6
L(+)- α -Alanin kristallisiert	3	0,26	100	0,22	83,7	0,16	41,7	0,16	41,2
Glycin kristallisiert	3	0,36	100	0,28	75,2	0,17	23,8	0,15	20,9
L- α -Aminobuttersäure kristallisiert	5	1,66	100	1,24	74,2	0,68	30,8	0,61	27,5
L-Methionin in wäßriger Lösung	5	2,22	100	1,36	61,2	0,35	9,9	0,11	4,1
L-(+)-Valin in wäßriger Lösung	2	2,57	100	1,87	72,8	0,20	6,4	0,07	2,2

Aldehyd unterscheiden*, getrennt werden. Eine Reihe beschriebener Lösungsmittelgemische^{9, 10} zeigt nur ungenügend trennende Wirkung. Imprägnierungsverfahren mit 2-Phenoxy-äthanol^{11, 12} und Undecan führen ebenfalls nicht weiter, da die Fraktionen in die Breite diffundieren. Lediglich die nicht beschriebenen Lösungsmittel Benzol und Toluol zeigen gute Trenneigenschaften.

Von besonderem Vorteil sind die hohen Fließgeschwindigkeiten und die vollständige Äquilibrierung der Gasphase bei einem Lösungsmittel aus einer Komponente. Mit Toluol als Lösungsmittel wird die Trennung der Hydrazone aus den Aminosäuren Methionin, Leucin, Valin und α -Aminobuttersäure glatt erreicht, eine teilweise Trennung des Glycinhydrazons von Alaninhydraxon ist möglich. Die Anwendung von schnellfließenden „Rapidplatten“

verbietet sich wegen der übermäßigen Ausbreitung der Substanz durch starke Diffusion. Die Trennschärfe des Systems bleibt bei den notwendigen hohen Konzentrationen so gut, daß zugesetzte inaktive Aminosäure weniger als 1% der Radioaktivität verschleppt (Abb. 1).

Die Versuchsergebnisse zur Aktivierung von Aminosäuren sind in der Tab. I zusammengefaßt. Man erkennt, daß der Anteil der flüchtigen Aktivität (gasförmig in die Kristallmatrix der aktivierten Aminosäure eingeschlossene und wasserdampf-flüchtige Substanzen) im allgemeinen nicht mehr als 40% der Gesamtaktivität ausmacht. Abschätzungen der im gesamten Prozeß gebildeten gasförmigen Aktivierungsprodukte lassen eine Erhöhung um annähernd den Faktor 2 annehmen. Der Aktivitätsverlust bei der Überführung der Aminosäure in ihren korrespondierenden Aldehyd bzw. dessen Dinitrophenylhydraxon beruht zum Teil auf der Abtrennung der Carboxylgruppe als CO_2 .

Die Zahlen der Spalte III berücksichtigen diesen Verlust nicht, da exakte Messungen über die ^{14}C -

* Zur Vereinfachung der Schreibweise und zum leichteren Verständnis werden die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der mit der Aminosäure durch die Ninhydrinreaktion korrespondierenden Aldehyde im folgenden als Aminosäurehydraxon bezeichnet, z. B. Valinhydraxon, Methioninhydraxon usw.

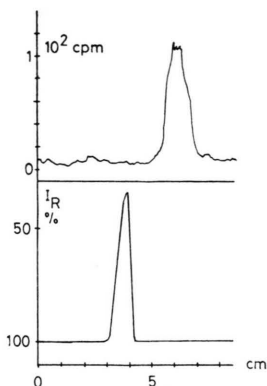


Abb. 1. Trennung des ^{14}C -Leucin von zugesetztem inaktiven Methionin. In der oberen Hälfte der Abb. die Verteilung der Radioaktivität, in der unteren Hälfte die Remissionsmessung der Substanz bei 480 nm mit Angabe des Startpunktes und der Lösungsmittelfront (cpm = Impulse pro Minute, I_R = Intensität des reflektierten Lichtes in %).

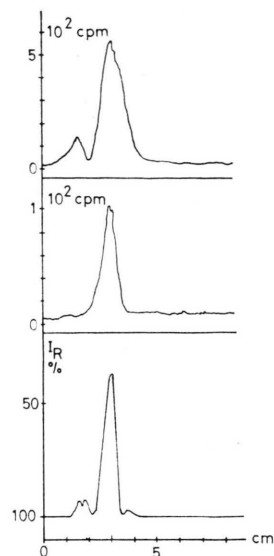


Abb. 2. Verteilung von ^{11}C - und ^{14}C -Radioaktivität im Chromatogramm des Methioninhydrazons. Der obere Kurvenzug stellt die Aktivitätsverteilung von $^{11}\text{C} + ^{14}\text{C}$ 77 min nach Ende der Bestrahlung dar. Die mittlere Kurve zeigt die Verteilung nach dem Abklingen der ^{11}C -Aktivität (24 h nach Ende der Bestrahlung). Man beachte die unterschiedlichen Maßstäbe und daß bei einem Vorschub von 2 cm/min zur Registrierung gegen Ende der Kurvenaufzeichnung bereits $1/4$ Halbwertszeit für ^{11}C vergangen ist. Die untere Kurve ist als Remissionmessung ein Maß für die Substanzverteilung.

Aktivität der Carboxylgruppe noch nicht ausreichend vorliegen. Auffallend ist die geringe Ausbeute bei der Aminosäure Methionin. Dieser Befund wird durch die Reaktivität der Thiomethylgruppe verständlich. Sulfoxid und Sulfon z.B. haben ihre Flüchtigkeit mit Wasserdampf verloren und werden dementsprechend nicht erfaßt. Der nach der Kristallisation erfolgende Reinigungsschritt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie führt zu keiner wesentlichen Abnahme der spezifischen Radioaktivität, ein Beweis dafür, daß die vorgeschalteten Trennschritte bereits zu einer weitgehenden Reinigung der Präparate führten. Darüberhinaus läßt sich bei Untersuchung der Radioaktivitätsverteilung auf den Dünnschichtchromatogrammen feststellen, daß die gemessenen Radioaktivitäten auch mit der Lage der Substanzen übereinstimmen (Abb. 2). Während bei den Aminosäuren Valin¹³, Leucin und α -Aminobuttersäure eine Asymmetrie der Radioaktivitätspeaks innerhalb des Meßfehlers nicht feststellbar ist, fällt für das Methionin eine Rechtsverbreiterung des ^{11}C -peaks (obere Kurve) auf. Obwohl am rechten Schenkel höchstens 10% der Aktivität gefunden werden, läßt sich diese Aktivität stets mit einem kleinen chromatographischen Fleck rechts von der Hauptschubstanzmenge korrelieren. Die Substanz hat einen R_F -Wert, der dem des α -Aminobuttersäurehydrazons entspricht. Dieses Derivat ist als Radiolyseprodukt aus Methionin denkbar. Eine nähere Identifizierung ist bisher nicht erfolgt.

Damit eine klare Zuordnung der ^{11}C -Aktivität erleichtert und eine Ausbeuteberechnung ermöglicht

wurde, ist jeder Probe direkt nach der Bestrahlung ^{14}C -Aminosäure zugesetzt worden. Während für alle anderen untersuchten Aminosäuren eine eindeutige Korrelation zwischen ^{11}C - und ^{14}C -Aktivität möglich war, mußte für das Methionin die Aktivität des in Bezug auf die Radioaktivitätsverteilung unvollständig abgetrennten (dies ist begründet durch die Breite des Schlitzes im Endfensterzählrohr) kleinen Flecks berücksichtigt werden. Außerdem bleibt bei allen Aminosäuren ein geringer Teil der ^{11}C -Aktivität am Start liegen. Auch diese Aktivität korreliert mit einem Substanzfleck, verständlicherweise aber nicht mit der ^{14}C -Aktivität. Bei der Untersuchung der relativ an Sauerstoff und Stickstoff reichen Aminosäuren Glycin und Alanin ergab sich neben vergleichsweise geringen Aktivierungsraten, wie bereits bekannt¹⁵, auch eine Asymmetrie der Radioaktivitätsverteilungen.

Bei der Aktivierung von Aminosäuren in wäßriger Lösung findet man erwartungsgemäß eine erhebliche Heterogenität der Verteilung von ^{11}C . Das Chromatogramm in Abb. 3 macht deutlich, daß die ^{11}C -Aktivität von der Hauptschubstanzmenge abtrennbar

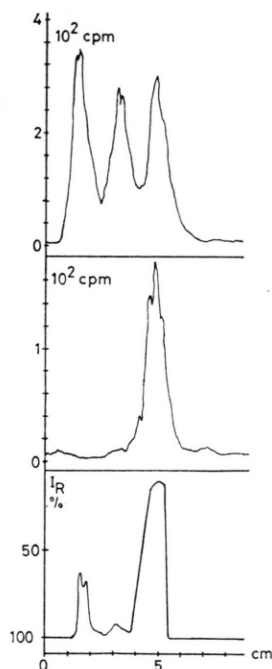


Abb. 3. Verteilung der ^{11}C -Aktivität im Vergleich zur ^{14}C -Aktivität im Chromatogramm des Hydrazons nach Bestrahlung von Valin in wäßriger Lösung.

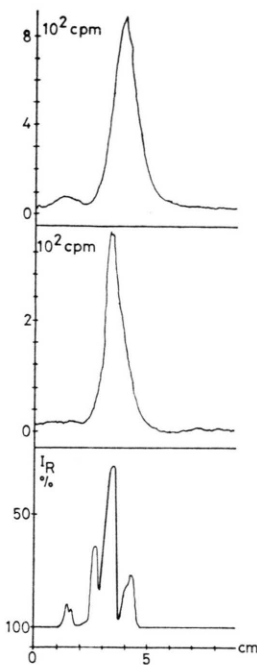


Abb. 4. ^{11}C -Aktivitäts- und Substanzverteilung von Methioninhydrazon nach Bestrahlung im Gemisch mit Kieselgel im Vergleich zur ^{14}C -Aktivität. Der obere Kurvenzug zeigt die Verteilung 54 min nach Ende der Bestrahlung (vgl. Legenden zu Abb. 1 und 2).

ist. Es ist klar, daß unter der Wirkung des γ -Strahls in wäßriger Lösung die Zahl der möglichen und möglich denkbaren Reaktionen, die zu Nebenprodukten führen, erheblich groß wird. Heiße ^{11}C -Atome können mit bei der Aktivierung entstehenden H- und OH-Radikalen, sowie eventuellen Fragmentierungsprodukten reagieren, wobei radioaktive Verbindungen entstehen, die mit der bestrahlten Aminosäure nicht mehr identisch sind. Beim Valin z. B. wird bei der Chromatographie trotz der vorhergehenden Reaktionen etwa die Hälfte der Aktivität am Startpunkt zurückgehalten. Eine weitere ^{11}C -Aktivitätsmenge weist einen R_F -Wert auf, der kleiner als der des Valinhydrazons ist. Ähnliches wird bei der Bestrahlung von Methionin in wäßriger Lösung gefunden. Nur eine geringe ^{11}C -Aktivität (annähernd 3% der Ausgangsaktivität) läßt sich den Aminosäurehydrazonen zuordnen.

Die Bestrahlung von Methionin im Gemisch mit Adsorbentien wie Aktivkohle oder Kieselgel H führt zu ^{11}C -aktiven Produkten, die im Chromatogramm nicht an der für das Methionin erwarteten Stelle auftreten (Abb. 4). Der größte Teil der ^{11}C -Aktivität ist der Aminosäure nicht zuzuordnen. In diesen

Chromatogrammen tritt eine deutliche Heterogenität der kristallisierten Hydrazone auf.

Die Ergebnisse der Bestrahlung von Aminosäuren in kristallinem Zustand, nach Gefriertrocknung, in wäßriger Lösung und im Gemisch mit Adsorbentien legen es nahe, daß das Gelingen der Rückstoßmarkierung von der Mikroumgebung der Aminosäuremoleküle abhängt. Ein Zusammenhang zwischen molekularer Ordnung und Markierbarkeit läßt sich daraus vermuten. Eine höhere spezifische Aktivität läßt sich nur dann erreichen, wenn das Kristallgitter der Aminosäuren intakt bleibt. Versuche zur Unterscheidung, ob das ^{11}C -Rückstoßatom auf seinem Platz bleibt bzw. dahin zurückkehrt (Rückefang, reentry) oder nach einer gewissen „Wanderungsstrecke“ einen Platztausch vornimmt, sind zur Zeit im Gang.

Die Ergebnisse aus den Bestrahlungsversuchen ermutigen zu der Annahme, daß eine direkte Markierung organischer Verbindungen mit dem Isotop ^{11}C möglich ist. Voraussetzung für eine Nutzung ^{11}C -markierter Verbindungen in Biologie und Medizin ist die Erarbeitung optimierter Bedingungen für die Bestrahlung und für die einfache Abtrennung der

gewünschten Verbindung von ähnlichen Substanzen. Verlauf und Ausbeute der Direktmarkierung mit

^{11}C müssen an anderen Verbindungen mit unabhängigen Methoden überprüft werden.

- ¹ C. P. Dollery, J. F. Fowler, P. Hugh-Jones, C. M. E. Methews u. J. B. West, *Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung* **5**, 88 [1963].
- ² J. B. West u. C. T. Dollery, *J. Appl. Physiol.* **17**, No. 1, 9–13 [1962].
- ³ A. P. Wolf, D. R. Christman, J. S. Fowler u. R. M. Lambrecht, *Proc.-IAEA-WHO Symp. Copenhagen*, **I**, p. 197, Vienna 1973.
- ⁴ L. S. Ruben u. D. Kamen, *Phys. Rev.* **59**, 349 [1941].
- ⁵ A. P. Wolf, *Advan. Phys. Org. Chem.* **2**, 201 [1964].
- ⁶ R. Wolfgang, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **16**, 15 [1965].
- ⁷ G. Stöcklin, *Chemie heißer Atome*, Verlag Chemie, Weinheim 1969.
- ⁸ W. Trampisch, E. L. Sattler u. A. Schraub, *Biophysik* **7**, 355 [1971].
- ⁹ G. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, 2. Auflage, p. 215, Springer Verlag, Berlin 1967.
- ¹⁰ J. H. Dhout u. C. de Rooy, *Analyst (London)* **86**, 74 [1961].
- ¹¹ G. Urbach, *J. Chromatogr.* **12**, 196 [1963].
- ¹² L. M. Libbey, *J. Chromatogr.* **14**, 273 [1964].
- ¹³ U. Wagenbach, G. Gundlach, W. Trampisch u. E. L. Sattler, *Naturwissenschaften*, im Druck.
- ¹⁴ A. Leismann u. F. Turba, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **306**, 273 [1957].
- ¹⁵ W. Trampisch u. E. L. Sattler, *Kerntechnik*, im Druck.