

ÜBER EINE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER FREIEN PORPHYRINE UND DEREN ISOMERE

H. MUNDSCHENK

J. Medizinische Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz (Deutschland)
(Eingegangen den 20. Mai 1966)

EINLEITUNG

Zur dünn-schichtchromatographischen Trennung der Porphyrinester wurde bereits eine Reihe von Verfahren beschrieben¹⁻³; demgegenüber liegen über die Trennung der freien Porphyrine, mit Ausnahme einer kürzeren Mitteilung⁴, bisher keine ausführlicheren Untersuchungen vor.

In der vorliegenden Arbeit wird daher untersucht, inwieweit freie Porphyrine sowie deren Strukturisomere dünn-schichtchromatographisch mit dem für Papier empfohlenen Fließmittelsystem — 2,6-Lutidin/Wasser/Ammoniak⁵⁻⁸ — aufgetrennt und anschliessend spektrophotometrisch bestimmt werden können. Neben der Ermittlung der optimalen Trennbedingungen (Fließmittelzusammensetzung, Aktivierung, Kammer-sättigung) war die spektrophotometrische Identifizierung der Porphyrine über die Lage des Absorptionspeaks (Soret-Bande) Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Material

Die zur Durchführung der Untersuchungen benötigten Bezugssubstanzen wurden teilweise durch den Handel bezogen (Coproporphyrin-tetramethylester und Uroporphyrin-octamethylester der Mann Research Laboratories, Inc., New York), teilweise aus leicht zugänglichem Ausgangsmaterial im eigenen Labor hergestellt (Protoporphyrin aus Hämin durch Umsetzung mit Ameisensäure/Eisenpulver). Die in Esterform zunächst vorliegenden Porphyrine wurden in 5 N HCl verseift und in dieser Lösung auf die Platten aufgetragen. In dieser Form bei 4° im Dunkeln aufbewahrt zeigten die Porphyrine auch im Verlaufe von einigen Wochen keine merkliche Änderung der Zusammensetzung.

Zur Prüfung der Reinheit der verwendeten Porphyrine wurde eine papierchromatographische Trennung (Fließmittel: 2,6-Lutidin/Wasser bei mit Ammoniak gesättigter Kammeratmosphäre; Papier: 2043b der Fa. Schleicher & Schüll; absteigend) vorgenommen⁵⁻⁹ und die hierbei erhaltenen R_F -Werte mit Literaturangaben verglichen⁹. Aus der guten Übereinstimmung dieser Werte (Mittelwert aus 10 Einzelbestimmungen):

R_F (beob.) :	0.03 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.83 ± 0.03
R_F^0 :	0.06	0.32	0.56	0.84
Substanz :	Uroporph.	6-COOH-Porph.	Coproporph.	Protoporph.

konnte auf die Identität der verwendeten Porphyrine geschlossen werden. Eine weitergehende papierchromatographische Auftrennung des verwendeten Porphyringemisches konnte aufgrund der stets vorhandenen leichten Randunschärfe der Flecken und der hierdurch bedingten verminderten Auflösung nicht erzielt werden, obwohl dünnschichtchromatographisch noch mindestens 6 weitere, in der Intensität allerdings stark zurücktretende Fraktionen nachgewiesen werden konnten.

Die spektrophotometrischen Messungen (Absorptionsspektrum, Bestimmung der Peaklage x_p) wurden stets mit den nach der DC-Trennung erhaltenen Fraktionen, die nach Abschaben der Kieselgelschicht von der Glasunterlage durch Elution mit 1 N HCl (3×2 ml) erhalten wurden, durchgeführt.

Methodik

Die DC-Trennungen wurden in den im Handel (Fa. Desaga, Heidelberg) erhältlichen Trennkammern (Abmessungen: $210 \times 210 \times 90$ mm), die zur besseren Kammer-sättigung mit Filtrierpapier ausgelegt waren, vorgenommen.

Die Zusammensetzung des Fließmittelsystems 2,6-Lutidin (purum, Fluka AG, Schweiz)/Wasser (Aqua bidest.)/Ammoniak (25 % NH_4OH , p.A.) beeinflusst sehr empfindlich die R_F -Werte der einzelnen Fraktionen⁴. Daher wurden die folgenden Varianten untersucht:

62.5 % (v/v) 2,6-Lutidin/37.5 % (v/v) Wasser (FM A)

66.2 % (v/v) 2,6-Lutidin/33.8 % (v/v) Wasser (FM B)

70.0 % (v/v) 2,6-Lutidin/30.0 % (v/v) Wasser (FM C)

Da die Zusammensetzung des Fließmittels sich sowohl auf den absoluten R_F -Wert wie auch auf die relative Lage der einzelnen Fraktionen untereinander auswirkt, richtet sich die Wahl des Fließmittels vorwiegend nach dem zu untersuchenden Trennproblem.

Zur Durchführung der Trennung wurden die Kammern jeweils mit 250 ml Fließmittel beschickt; ausreichende Kammersättigung mit Ammoniak wurde durch Einstellen eines Becherglases mit 100 ml NH_4OH (25 %) erreicht. Hierbei konnten optimale Bedingungen hinsichtlich der Trennschärfe und Auflösung erst nach einer ca. dreitägigen Kammersättigung erzielt werden.

Die Beschichtung der Glasplatten (200×100 mm) mit Kieselgel G nach Stahl (Fa. E. Merck, Darmstadt) bei einer Schichtdicke von 0.5 mm wurde mit einer an anderer Stelle¹⁰ beschriebenen Vorrichtung vorgenommen. Die an Luft getrockneten DC-Platten wurden anschliessend für 2 h bei 160° aktiviert und im Exsikkator über KOH aufbewahrt.

Zu den Trennungen wurden die Porphyrine in salzsaurer Lösung mit einer Aglaspritze 20 mm vom unteren Rand der aktivierten Platten entfernt aufgetragen, für $\frac{1}{2}$ h im Trockenschrank bei 80° getrocknet und anschliessend in die mit Ammoniak ausreichend gesättigte Trennkammer eingesetzt. Nach einer Entwicklungsdauer von 2 h wurden die Platten herausgenommen und im Abzug mit einem Heizlüfter ("Astron 2000") getrocknet. Anschliessend konnten die einzelnen Fraktionen mit einem Mikrospatel von der Platte abgeschabt und mit 1 N HCl (3×2 ml) von der Trägerschicht eluiert werden.

Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer (PMQ II mit Monochromator M 4 Q III) durchgeführt, dessen Wellenlängenskala mit der diskreten Wasserstofflinie H β bei 486.1 nm absolut nachgeeicht und ständig überwacht wurde. Die Unsicherheit bei der Bestimmung der Lage der Absorptionspeaks λ_p sollte daher einen Betrag von max. ± 0.2 nm nicht übersteigen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Dünnschichtchromatographische Trennung der freien Porphyrine

Zur Ermittlung der für ein gegebenes Trennproblem optimalen Fließmittelzusammensetzung wurden drei Varianten untersucht: FM A, B, C. Drei der hiermit erhaltenen typischen Dünnschichtchromatogramme sind in Fig. 1 dargestellt.

Der Verlauf der R_F -Werte (Mittelwert aus je 10 Einzelbestimmungen) ist sowohl absolut als auch auf den R_F -Wert von Protoporphyrin bezogen in Abhängigkeit von der Anzahl der Carboxylgruppen in Fig. 2 aufgetragen.

Diese Gegenüberstellung zeigt eindrucksvoll den Einfluss des Fließmittels auf die Auftrennung der Porphyrine. So konnten bei gleicher Zusammensetzung des aufzutrennenden Porphyringemisches sowohl hinsichtlich der Struktur des Dünnschichtchromatogramms als auch bezüglich der Anzahl der auftretenden Fraktionen deutliche Unterschiede beobachtet werden. Während mit FM C zwischen Protoporphyrin und Coproporphyrin eine starke Spreizung, zwischen Coproporphyrin und Uroporphyrin dagegen eine Stauchung des Chromatogramms auftritt, ist bei FM A der umgekehrte Fall festzustellen. Lediglich bei FM B kann zwischen der Anzahl der Carboxylgruppen der Porphyrine und den R_F -Werten eine lineare Beziehung beobachtet werden (Fig. 2). Die Konstanz der R_F -Werte von in der gleichen Trennkammer entwickel-

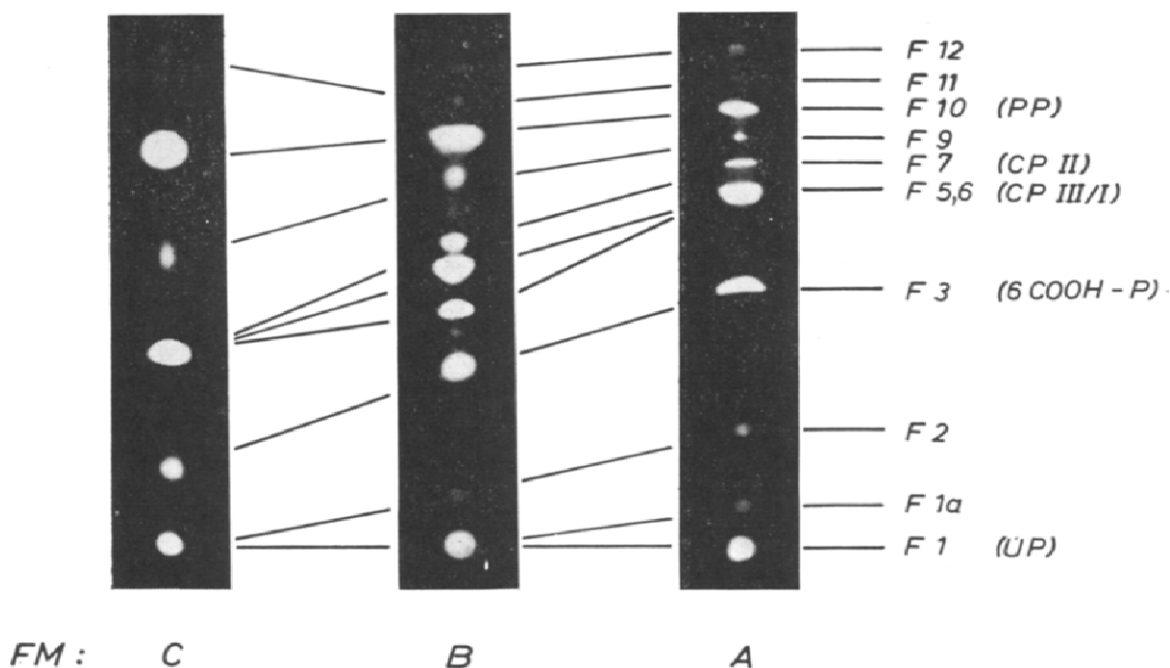


Fig. 1. Einfluss der Zusammensetzung des Fließmittels auf die Auftrennung eines Porphyringemisches auf aktivierten Kieselgelschichten. FM A = 62.5% (v/v) 2,6-Lutidin/37.5% (v/v) Wasser/Ges. mit NH $_3$; FM B = 66.2% (v/v) 2,6-Lutidin/33.8% (v/v) Wasser/Ges. mit NH $_3$; FM C = 70.0% (v/v) 2,6-Lutidin/30.0% (v/v) Wasser/Ges. mit NH $_3$.

ten Platten war zufriedenstellend: So konnten mit dem gleichen Ansatz bis zu 10 DC-Platten (200 × 100 mm) entwickelt werden, wobei die Abweichungen der einzelnen R_F -Werte einen Betrag von $\pm 6\%$ nicht überstiegen.

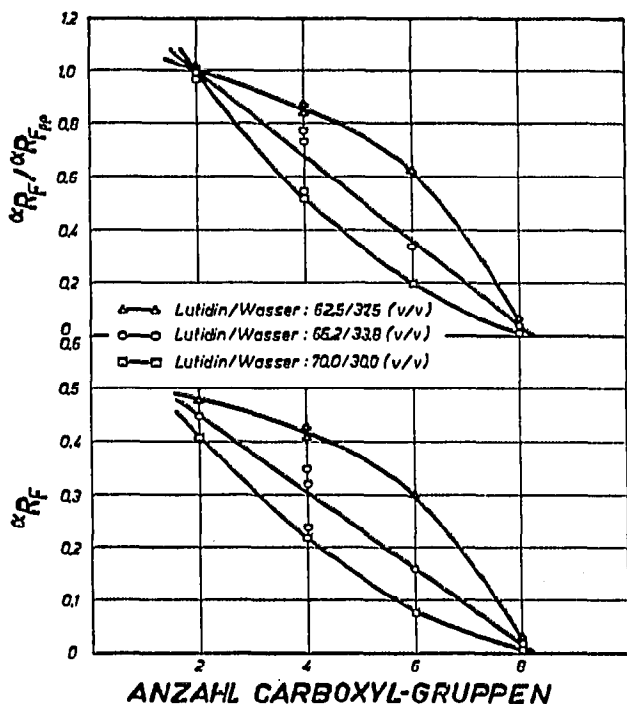


Fig. 2. Verlauf der absoluten (untere Darst.) bzw. auf Protoporphyrin bezogenen (obere Darst.) R_F -Werte in Abhängigkeit von der Anzahl der Carboxylgruppen der einzelnen Porphyrinfractionen.

Bei der eigentlichen Entwicklung konnte die bei Mehrkomponentensystemen oft eintretende Fließmittelentmischung beobachtet werden. Hierdurch wurde das Chromatogramm durch drei Flüssigkeitsfronten F_α , F_β und F_γ in drei Zonen unterteilt. Diese Flüssigkeitsfronten, die nach der Entwicklung auf den Platten kaum zu erkennen waren, konnten derart nachgewiesen werden¹⁰, dass das Porphyringemisch auf einer gegen die Fließrichtung um 45° geneigten Startlinie aufgetragen wurde. Die Lage der Fronten kann aus dem Schnittpunkt der die Substanzflecken der gleichen Fraktion verbindenden Geraden festgelegt werden (Fig. 3).

Hieraus kann die Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms in den einzelnen Phasen verfolgt werden, was die Zuordnung und Identifizierung der einzelnen Fraktionen ganz erheblich erleichtert.

Die Höhe der Temperatur bei der Aktivierung der Kieselgelschichten ist auf die Qualität der Dünnschichtchromatogramme ebenfalls von Einfluss. So ist bei den bei 160° aktivierten im Vergleich zu luftgetrockneten bzw. bei 80° und 120° behandelten Schichten eine deutlich geringere Neigung zur Schwanzbildung bei gleichzeitig schärferer Abgrenzung der Flecken festzustellen.

Der Grad der Kammersättigung mit Ammoniak wirkte sich in gleicher Weise aus: Bei kurzzeitiger (< 1 h) bzw. unvollständiger Sättigung war stets eine leichte Schwanzbildung bei gleichzeitig verminderter Auflösung festzustellen. Optimale Trennbedingungen konnten nach einer dreitägigen Sättigung mit Ammoniak (100 ml NH_4OH auf 250 ml Fließmittel) erzielt werden.

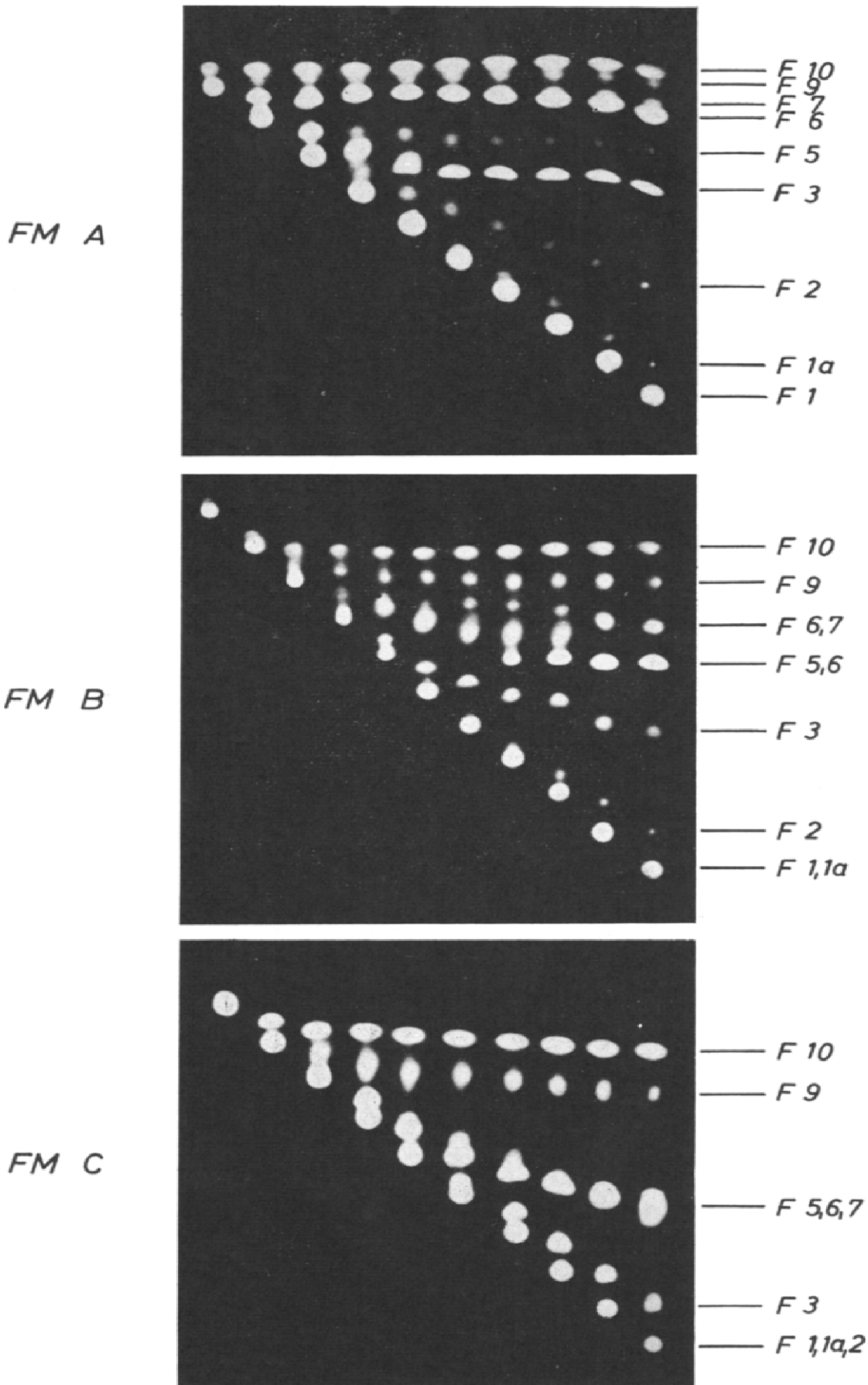


Fig. 3. Nachweis der Fließmittelentmischung bei der Auftrennung der Porphyrine auf aktivierten Kieselgelschichten für die verschiedenen Fließmittelsysteme (FM A, B und C).

Einer der bestechendsten Vorzüge der Dünnschichtchromatographie im Vergleich zu anderen Trennverfahren ist der hohe Kontrastumfang, der den Nachweis von hinsichtlich der Intensität sich stark unterscheidenden Substanzen selbst bei kleinen Unterschieden der R_F -Werte noch gestattet. So konnte bei einer Auftragung eines Porphyringemisches mit steigender Menge eine Auftrennung und Identifizierung der einzelnen Fraktionen auch dann noch erreicht werden, wenn die aufgetragenen Substanzmengen sich um den Faktor 32 unterschieden (Fig. 4). Ein Einfluss auf die R_F -Werte konnte hierbei nicht beobachtet werden.

Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Porphyrine können im UV-Licht anhand der intensiven Rotfluoreszenz sehr empfindlich nachgewiesen werden. So wird die Porphyrinmenge, die hierbei mit Sicherheit noch erkannt werden kann, auf 1–5 ng geschätzt.

Aber auch für die präparative Aufarbeitung der Porphyrine erscheint die DC-Technik geeignet. So werden bei bandförmiger Auftragung (Fig. 5) bereits bei einer Schichtdicke von 0.5 mm Substanzmengen von 10 μg Porphyrine/cm aufgetrennt, ohne dass störende Einflüsse (Schwanzbildung, Randunschärfe der Flecken u.a.) sich bemerkbar machten.

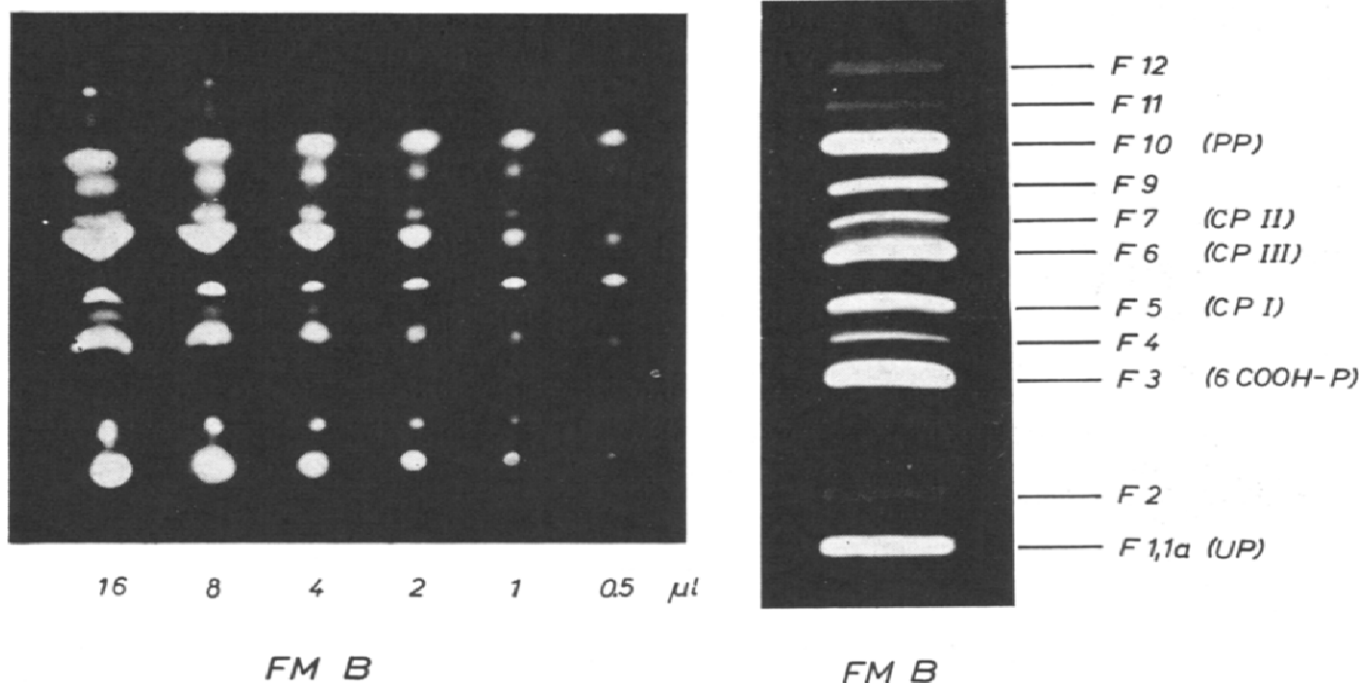


Fig. 4. Auftrennung eines Porphyringemisches auf aktivierten Kieselgeschichten bei steigender Substanzmenge. Konzentration der aufgetragenen Lösung: 1 μl enthält 0.25 μg Coproporphyrin; 0.05 μg Protoporphyrin; 0.025 μg Uroporphyrin.

Fig. 5. Auftrennung eines Porphyringemisches auf aktivierten Kieselgeschichten bei bandförmiger Auftragung.

Spektrophotometrische Bestimmung und Identifizierung der Porphyrine

Porphyrine zeigen die für konjugierte Tetrapyrrole charakteristischen Absorptionsbanden. Hierbei ist das bei 400 nm liegende Soret-Maximum besonders zu deren Bestimmung geeignet^{11,12} (Fig. 6).

Bei der analytischen Bestimmung der Porphyrine ist allerdings zu beachten,

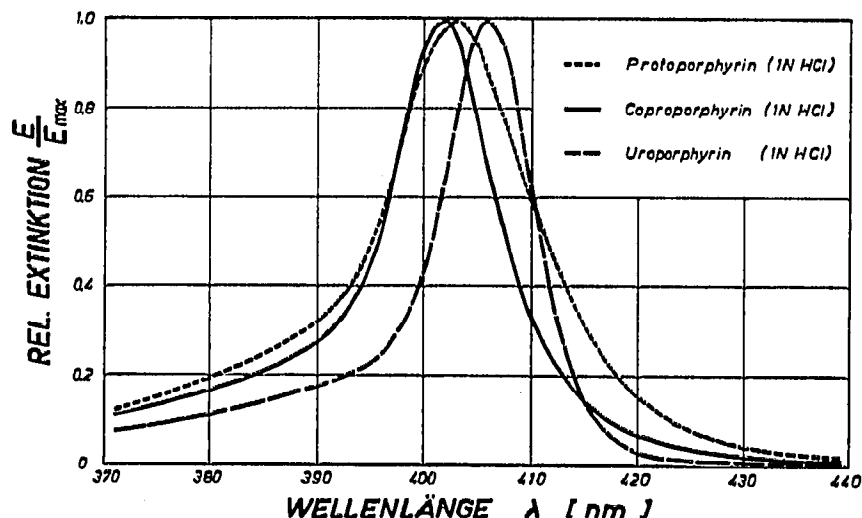


Fig. 6. Normierter Verlauf des Absorptionsspektrums von Uroporphyrin, Coproporphyrin und Protoporphyrin im Bereich von 370–440 nm, gemessen mit einem Zeiss-Spektralphotometer (PMQ II/M 4 Q III).

dass sowohl die spezifische Extinktion $E_{1\text{ cm}}^1 \frac{\mu\text{g/ml}}$ als auch die Lage des Absorptionsmaximums λ_p entscheidend von der Azidität der Lösung abhängt^{11–14} (Fig. 7).

Zur Identifizierung der in einem komplexen Dünnschichtchromatogramm auftretenden Fraktionen erscheint neben anderen physikalischen bzw. chemischen Kenndaten (Schmelzpunkt, R_F -Wert, Infrarotspektrum u.a.) die Lage der Soretbande λ_p als leicht nachprüfbares Kriterium besonders geeignet. Da bei Strukturisomeren die λ_p -Werte übereinstimmen^{12,15}, konnte somit stets eindeutig entschieden werden, ob es sich bei den im Dünnschichtchromatogramm auftretenden benachbarten Fraktionen um Isomere oder aber um Porphyrine mit unterschiedlicher Anzahl an Carboxylgruppen handelt.

Bei der Elution der Porphyrine von der Kieselgelschicht mit HCl werden Bestandteile, insbesondere Eisen, mit herausgelöst, die die Genauigkeit der Bestimmung

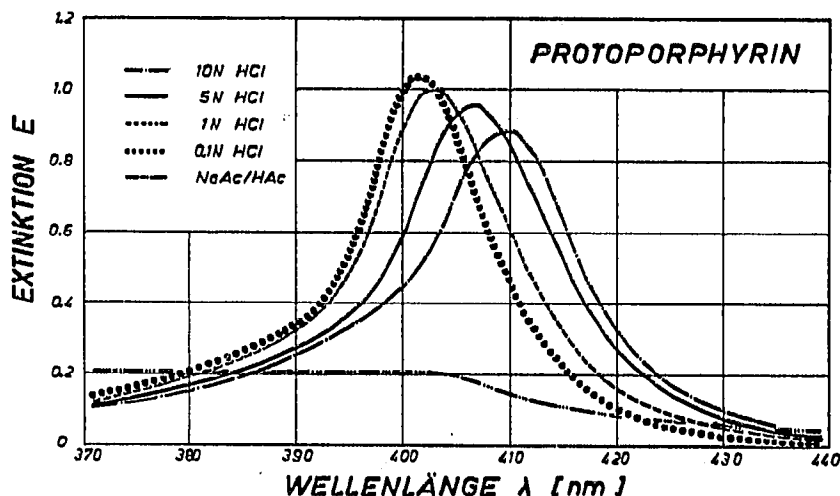


Fig. 7. Einfluss der Azidität der Lösung auf den Verlauf des Absorptionsspektrums (λ_p , $E_{1\text{ cm}}^1 \frac{\mu\text{g/ml}}$) von Protoporphyrin im Bereich von 370–440 nm. Bei jeder Bestimmung wurde die gleiche Protoporphyrinmenge vorgegeben.

beeinträchtigen. Hierbei wird der Absorptionspeak durch einen nahezu exponentiell ansteigenden Untergrund überlagert, der eine Berechnung der Porphyrinkonzentration mit den für einen konstanten bzw. linearen Untergrund abgeleiteten Beziehungen^{13,14} nur mit erhöhter Unsicherheit gestattet. So betrug der hierdurch verursachte Fehler in dem dargestellten Beispiel (Fig. 8) immerhin 16 %.

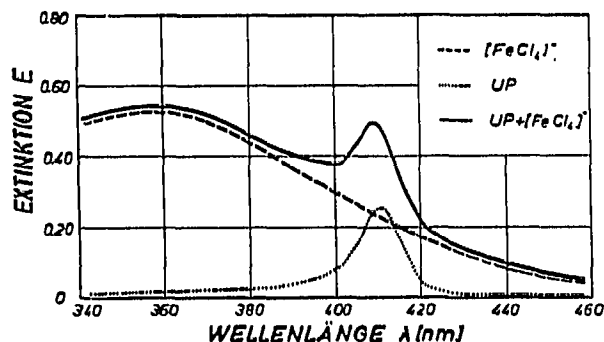


Fig. 8. Beispiel einer Überlagerung eines Absorptionspeaks von Uroporphyrin durch einen nicht linearen Untergrund ($(\text{FeCl}_4)^-$).

Diese Fehlerquelle konnte auf einfache Weise dadurch ausgeschaltet werden, dass stets eine gleich grosse Fläche der Kieselgelschicht der gleichen Platte mit 1 N HCl (3×2 ml) behandelt und das Eluat bei der spektrophotometrischen Messung als Vergleichslösung eingesetzt wurde.

Die chemische Ausbeute bei der Aufarbeitung und Bestimmung der Porphyrine war recht zufriedenstellend: So konnten die einzelnen Porphyrine, Uroporphyrin, Coproporphyrin und Protoporphyrin bei der dünnenschichtchromatographischen Trennung und anschliessenden Elution mit 1 N HCl (3×2 ml) mit einer Ausbeute von (98.4 ± 3.5) %, (97.5 ± 4.5) % und (59.2 ± 2.5) % wiedergewonnen werden. Bei Verwendung von organischem Elutionsmittel (z.B. Aceton/Salzsäure) werden auch bei Protoporphyrin höhere Ausbeuten erwartet. Eine Umsetzung der Porphyrine während der Trennung und sich anschliessenden Aufarbeitung konnte nicht beobachtet werden.

Zur Prüfung der Reinheit der bei der spektrophotometrischen Bestimmung ausgewerteten Absorptionspeaks können mit Vorteil die k -Werte¹²⁻¹⁴ herangezogen werden. So konnten für die dünnenschichtchromatographisch gereinigten Porphyrine folgende Werte erhalten werden:

$$k(\text{UP}) = 1.885; k(\text{CP}) = 1.860; k(\text{PP}) = 1.920.$$

Zur Auswertung komplexer Absorptionsspektren können, sofern höhere Anforderungen hinsichtlich der Genauigkeit und Auflösung gestellt werden, die an anderer Stelle zur Zerlegung komplexer γ -Spektren beschriebenen Verfahren¹⁶⁻¹⁸ empfohlen werden.

Die Peaklage kann durch graphische Differentiation¹⁷ des gemessenen Spektrumsverlaufes auf einfache Weise erhalten werden (Fig. 9). Für Extinktionen $E \geq 0.30$ ist eine Bestimmung auf mind. ± 0.2 nm möglich.

Von 6 der insgesamt 13 dünnenschichtchromatographisch nachzuweisenden Fraktionen (Fig. 1) wurde die Abhängigkeit der Peaklage von der HCl-Konzentration untersucht (Fig. 10).

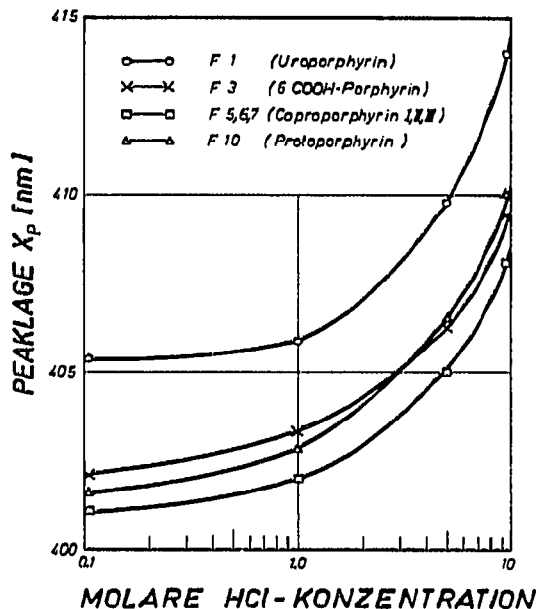
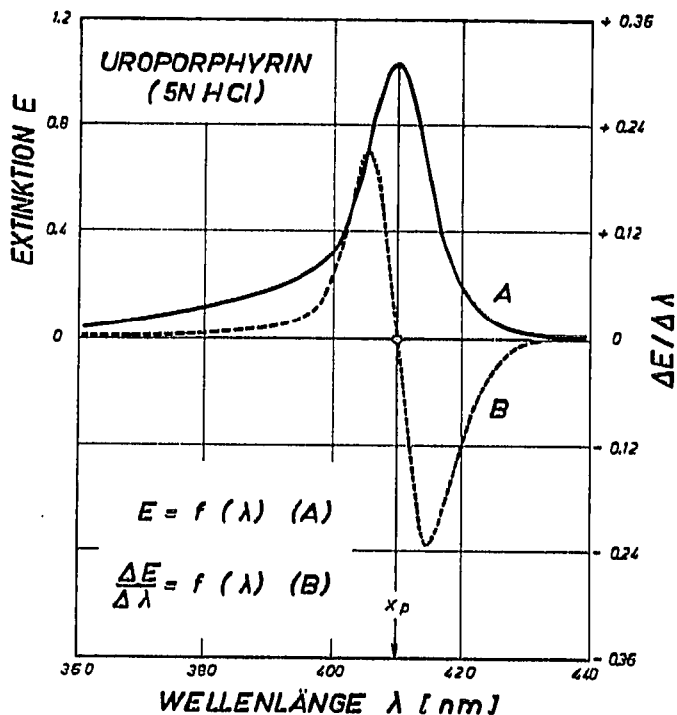


Fig. 9. Bestimmung der Lage des Absorptionspeaks λ_p durch graphische Differentiation des gemessenen Spektrumsverlaufes.

Fig. 10. Einfluss der HCl-Konzentration auf die Lage der Absorptionspeaks λ_p der einzelnen Porphyrine.

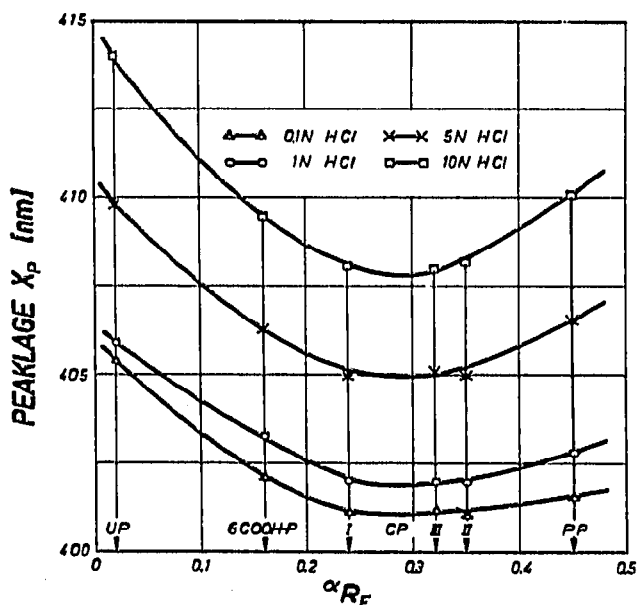


Fig. 11. Auftragung der Peaklagen λ_p in Abhängigkeit von den R_f -Werten der zugehörigen Porphyrinfraktionen. Fließmittel: FM B.

Die für F 5,6 und 7 erhaltenen x_p -Werte stimmten innerhalb einer Streubreite von ± 0.1 nm überein, was nur durch das Auftreten von drei Isomeren von Coproporphyrin zu erklären ist. Die für Uroporphyrin und Coproporphyrin erhaltenen Peaklagen zeigten mit den in der Literatur angegebenen Werten^{11,12} z.T. ausgezeichnete Übereinstimmung. Eine Erklärung für die gegenüber den Literaturangaben deutlich herabgesetzten Werte für Protoporphyrin konnte nicht gefunden werden. Auffallend ist auch die Diskrepanz der k -Werte für Protoporphyrin.

Besonders aufschlussreich für die Einordnung der einzelnen Fraktionen ist eine Auftragung der ermittelten Peaklagen x_p gegen die zugehörigen R_F -Werte (Fig. 11). So konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei F 9 offenbar nicht um ein 3-COOH-Porphyrin handelt, da der erhaltene x_p -Wert sich nicht in den steten Kurvenverlauf einordnen liess. F 3 konnte sowohl über den papierchromatographisch erhaltenen R_F -Wert als auch über die Peaklage als 6-COOH-Porphyrin identifiziert werden. Für die übrigen intensitätsschwachen Fraktionen, die weder papierchromatographisch nachzuweisen waren noch über die Peaklage, aufgrund der nur beschränkt zur Verfügung stehenden Substanzmenge, identifiziert werden konnten, wird aus den dünn-schichtchromatographisch erhaltenen R_F -Werten angenommen, dass es sich um Strukturisomere (F 1a = Isomere von Uroporphyrin; F 4 = Isomere von 6-COOH-Porphyrin; F 8 = Isomere von 3-COOH-Porphyrin) bzw. um weitere Glieder aus der Porphyrinreihe (F 2 = 7-COOH-Porphyrin; F 11/12 = Hämatoporphyrin/Mesoporphyrin) handelt. Eine endgültige Bestätigung dieser Annahme steht noch aus.

DANK

Herrn Prof. Dr. R. DUESBERG möchte ich für die grosszügige Förderung dieser Arbeit sehr herzlich danken. Herrn Dozent Dr. R. CLOTTEN, Freiburg, bin ich für einführende Hinweise ebenfalls zu Dank verpflichtet.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Auftrennung der freien Porphyrine und deren Isomere auf aktivierten Kieselgelschichten mit dem auch für Papier verwendeten Fließmittelsystem — 2,6-Lutidin/Wasser bei Ammoniak sättigung — wird eingehend untersucht. Hierbei erweist sich insbesondere die Zusammensetzung des Fließmittels, in geringerem Umfang aber auch der Grad der Kammersättigung mit Ammoniak und die Höhe der Aktivierungstemperatur, auf die Trennung von Einfluss.

Neben anderen physikalischen oder chemischen Kenndaten kann mit Erfolg die Peaklage der Soretbande, die durch graphische Differentiation des gemessenen Spektrumsverlaufes auf einfache Weise erhalten wird, als zuverlässiges Kriterium für die Identität eines Porphyrinderivates herangezogen werden. Hierbei ist allerdings die Abhängigkeit von der Azidität der Lösung zu beachten.

SUMMARY

The separation of free porphyrins and their isomers on activated Kieselgel layers was investigated, using the solvent system 2,6-lutidine/water saturated with ammonia, which is also employed in paper chromatography. This investigation showed

that especially the composition of the solvent mixture has an influence on the separation; the degree of saturation of the chamber with ammonia and the activation temperature also have an effect, but to a lesser extent.

In addition to other physical or chemical data, the peak position of the Soret band, obtained in a simple manner by graphical differentiation of the measured absorption curve, can successfully be used as a reliable criterion for identifying a porphyrin derivative. However, the dependence on the acidity of the solution must be taken into consideration.

LITERATUR

- 1 E. DEMOLE, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 24.
- 2 R. W. BALEK UND A. SZUTKA, *J. Chromatog.*, 17 (1965) 127.
- 3 T. C. CHU UND E. J. -H. CHU, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 46.
- 4 J. JENSEN, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 236.
- 5 R. E. H. NICHOLAS UND C. RIMINGTON, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1 (1949) 12.
- 6 R. KEHL UND W. STICH, *Z. Physiol. Chem.*, 289 (1951) 6.
- 7 L. ERIKSEN, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5 (1953) 155.
- 8 L. ERIKSEN, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 10 (1958) 319.
- 9 L. HEILMEYER, *Die Störungen der Bluthämsynthese*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964.
- 10 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962.
- 11 J. BRUGSCH UND F. KUBOWITZ, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 244.
- 12 C. RIMINGTON, *Biochem. J.*, 75 (1960) 620.
- 13 C. RIMINGTON UND S. L. SVEINSSON, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2 (1950) 209.
- 14 T. K. WITH, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 7 (1955) 193.
- 15 E. M. JOPE UND J. R. P. O'BRIEN, *Biochem. J.*, 39 (1945) 239.
- 16 H. MUNDSCHENK, *Nucl. Instr. Methods*, (1966), im Druck.
- 17 H. MUNDSCHENK, *Nucl. Instr. Methods*, (1966), im Druck.
- 18 H. MUNDSCHENK, *Nucl. Instr. Methods*, (1966), im Druck.

J. Chromatog., 25 (1966) 380-390