

Journal of Chromatography, 146 (1978) 55–65

Biomedical Applications

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 168

MISE EN ÉVIDENCE ET ÉVALUATION DES “MOYENNES MOLÉCULES” DE LA TAILLE DE LA VITAMINE B₁₂ PRÉSENTES DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES DE SUJETS NORMAUX ET DE PATIENTS URÉMIQUES

G. CUEILLE

Rhone-Poulenc Industries, Direction des Recherches et du Développement, Centre de Recherches Nicolas Grillet, Laboratoires de Recherches Analytiques, 13, Quai Jules Guesde, 94400 Vitry sur Seine (France)

(Reçu le 1 décembre 1977; manuscrit modifié reçu le 20 mars 1978)

SUMMARY

Determination of “middle molecules” presenting vitamin B₁₂ molecular size in normal and uremic body fluids

Uremic solutes with the molecular size of vitamin B₁₂ are assumed to be toxic. An analytical method is proposed to detect and separate these solutes in body fluids using two combined techniques: gel filtration on Sephadex G-15 and ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25. The vitamin B₁₂ molecular size has been localized by ultrafiltration through membranes with a defined cut-off. Normal and uremic body fluids (urine, plasma, hemodialysis fluid) have been separated into 9 ultraviolet-absorbing peaks (a to i) by high-speed gel filtration. Peaks b and c present the molecular size of vitamin B₁₂, 10–15 Å molecular diameter in pH 7 aqueous solution. Peak b, which correlates with uremic neuropathy, is separated into 6 sub-peaks (b₁ to b₆) by ion-exchange chromatography, sub-peak b_{4,2} is the only one to correlate with uremic neuropathy. The coefficient of variation in the integrated area of a single peak is 16%. This method gives the chromatographic profile of the vitamin B₁₂ molecular size content from 500 µl of uremic plasma or 100 µl of normal urine within one hour.

INTRODUCTION

L'un des problèmes posé par le traitement de l'insuffisance rénale chronique par hémodialyse concerne l'accumulation dans le plasma des patients urémiques de solutés dits “moyennes molécules” d'une taille comparable à celle de la vitamine B₁₂ [1] et dont certains seraient responsables de la polynévrite des urémiques. De nombreux auteurs ont utilisé la chromatographie d'exclusion stérique (CES) pour essayer de mettre en évidence ces solutés [2–8]. Jusqu'à présent, devant la diversité des conditions analytiques utilisées, il est impossible de relier entre eux les résultats obtenus.

Ce travail décrit l'analyse des liquides biologiques par CES haute performance et discute l'influence de différents facteurs qui interviennent sur le fractionnement de manière à proposer un système d'analyse reproductible. Les fractions qui contiennent des solutés de la taille de la vitamine B₁₂ sont ensuite analysées par chromatographie d'échange d'ions (CEI) haute performance. Cette association de la CES et de la CEI a permis en particulier de mettre en évidence, parmi ces solutés, celui dont une étude ultérieure a montré qu'il est lié à la polynévrte des urémiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation des échantillons

Les échantillons sont constitués par le plasma et l'urine de 24 h de sujets normaux (n = 20) et le plasma et les hémodialysats de patients urémiques dialysés (n = 53).

Avant d'être chromatographiés les plasmas sont ultrafiltrés à travers une membrane RP AN-69 (Rhone-Poulenc Industries, Vitry sur Seine, France) pour éliminer les solutés de poids moléculaire supérieur à 20,000 daltons. Les urines et les hémodialysats sont chromatographiés tels quels.

Les ultrafiltrations sur membrane, destinées à chiffrer le poids moléculaire apparent des solutés, sont réalisées sur module Amicon (diamètre 43 mm) ou Millipore (diamètre 13 mm) sous pression d'azote de 3 bars à 2°.

Les membranes suivantes ont donc été utilisées: RP AN-69 et RP à base d'acétate de cellulose (taux de rejet, T_R : 99% pour la vitamine B₁₂) (Rhone-Poulenc Industries); Pellicon PSAC-1000 (T_R : 90% pour la vitamine B₁₂) (Millipore, Bedford, Mass., É.U.).

T_R est donné par la formule: $T_R = 100 (1 - C_p/C_r)$ où C_p est la concentration en soluté du perméat et C_r celle du rétentat.

Chromatographie d'exclusion stérique (CES)

Le fractionnement est réalisé sur colonne de verre 75 X 0.635 cm (Technicon, Tarrytown, N.Y., É.U.) remplie de Séphadex G-15 (Pharmacia, Le Chesnay, France) dans les conditions suivantes: injection dans le flux en haut de colonne par l'intermédiaire d'un injecteur à septum (Touzart et Matignon, Paris, France), avec une seringue pointe 3 (Hamilton), de 5-500 µl d'échantillon à analyser; élution par une solution aqueuse 0.0024 M de sulfate de sodium (Normapur; Prolabo, Paris, France) contenant 0.01% d'une solution à 25% (p/v) de Brij 35 (Touzart et Matignon); réglage du débit d'élution à 36 ml/h par une pompe à piston (Dosapro; Milton Roy No. 296 33) couplée à un amortisseur de pulsations (Technicon); détection des éluats en continu dans l'ultraviolet à 254 nm par un détecteur Varian (densité optique pleine échelle 0.04) ou à 206 nm par un détecteur Schoeffel SF 770 (densité optique pleine échelle 0.1); enregistrement des chromatogrammes sur Servotrace PE 1-10 (Sefram, Paris, France) (vitesse d'enregistrement 30 cm/h).

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Le fractionnement est effectué sur des colonnes de verre 8 X 0.635 cm remplies de DEAE-Séphadex A-25 (Pharmacia) dans les conditions suivantes:

injection comme en CES dans le flux, par seringue à travers un septum, de 10–500 μ l de l'échantillon à analyser; élution à un débit de 30 ml/h par un gradient de sulfate de sodium 0.01 M à 0.50 M à raison d'une augmentation régulière de 3.5% par min de solution 0.50 M dans le mélange; le gradient est délivré par un préparateur automatique de gradient Mixograd (Gilson) relié à une pompe péristaltique Minipuls HP-4 (Gilson); détection des éluats en continu dans l'ultraviolet à 254 nm avec un détecteur Varian (densité optique pleine échelle 0.08) et à 206 nm avec un détecteur Schoeffel SF-770 (densité optique pleine échelle 1.0); enregistrement des chromatogrammes sur Varian A-25 (vitesse d'enregistrement 20 cm/h).

Association CES + CEI

Les éluats de la colonne de CES correspondant aux pics à analyser sont dans un premier temps collectés sur la colonne de CEI (Fig. 1); dans un deuxième temps la colonne de CEI est reliée au préparateur automatique de gradient. On analyse soit 500 μ l de plasma, soit 100 μ l d'urine.

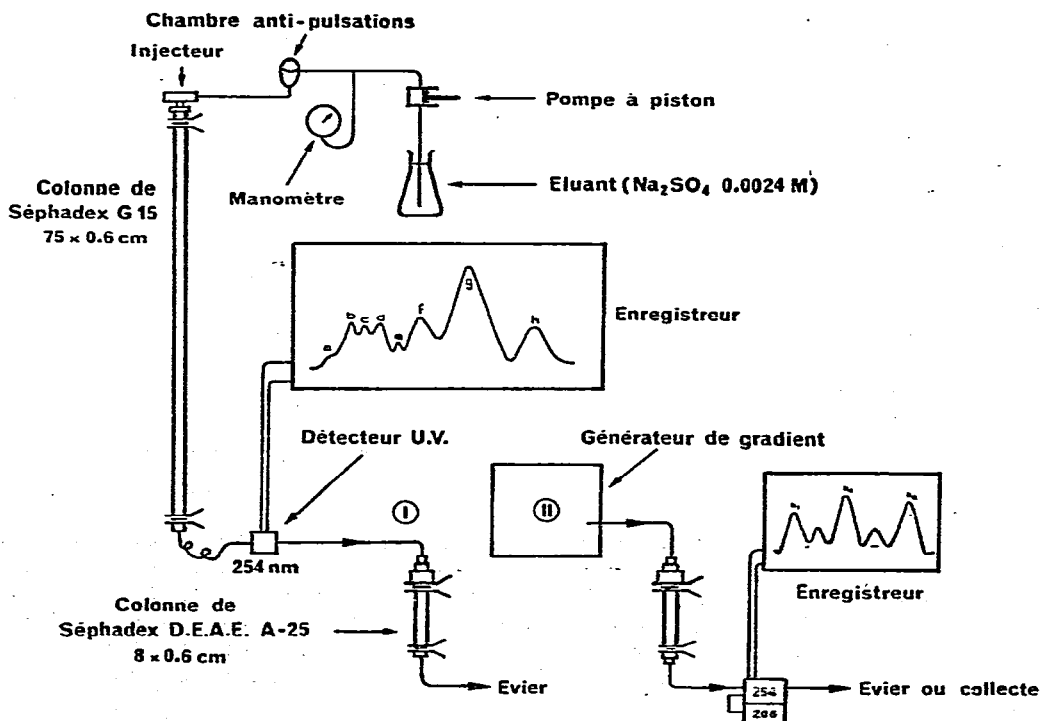


Fig. 1. CES + CEI. I = Fixation des pics b, c ou d sur DEAE-Séphadex A-25 après fractionnement sur Séphadex G-15. II = Éluion des sous-pics par un gradient de concentration de sulfate de sodium (0.01 à 0.50 M).

RESULTATS

Chromatographie d'exclusion stérique

Étalonnage de la colonne. Cet étalonnage est destiné à établir la relation

entre le volume d'élution d'un soluté et son poids moléculaire (PM). En CES le volume d'élution (V_e) d'un soluté est lié au volume mort de la colonne (V_0), au volume interne des perles de gel (V_i) et au coefficient de partition (K_d) de ce soluté entre la phase fixe (gel) et la phase mobile (éluant) par la relation: $V_e = V_0 + K_d V_i$. Le volume mort est déterminé par une solution d'albumine humaine à 1 g/l: $V_0 = 7.2$ ml dans nos conditions opératoires. Le volume interne est déterminé à partir du volume d'élution de l'urée, de la créatinine, du chlorure de sodium et de l'eau: $V_0 + V_i = 13.8$ ml dans nos conditions opératoires.

La Fig. 2A représente le taux de rejet, T_R , mesuré pour plusieurs solutés

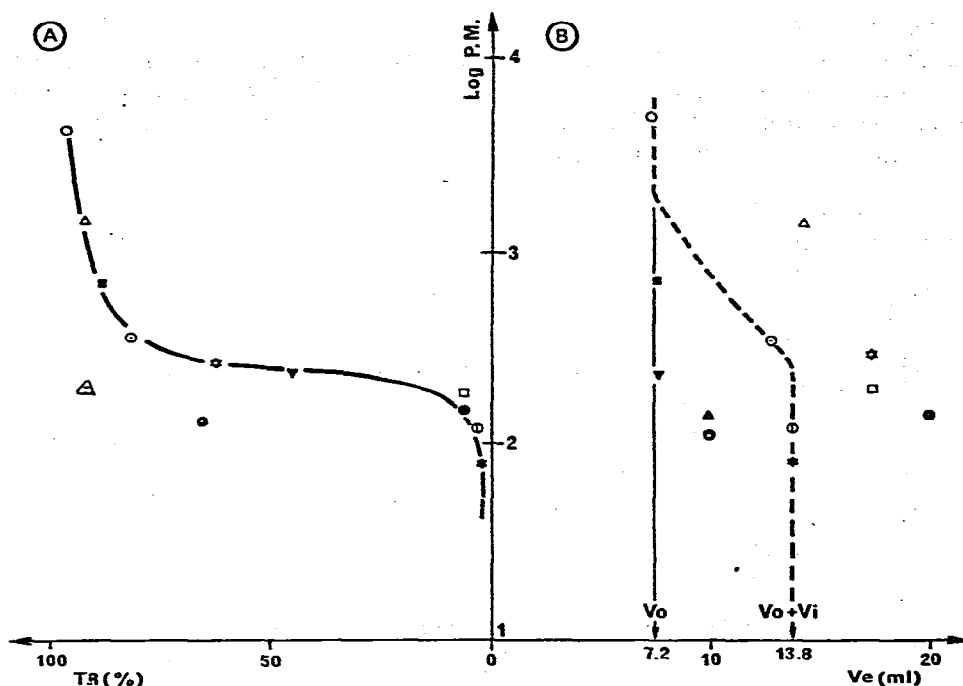


Fig. 2. Comparaison entre: (A) le taux de rejet (T_R) mesuré par ultrafiltration sur membrane RP et (B) le volume d'élution (V_e) obtenu par CES sur Séphadex G-15. Résultats obtenus avec des solutions aqueuses à 1 g/l. \circ , Inuline (5200); Δ , vitamine B_{12} (1355); \blacksquare , calcéine (666); \ominus , glutathion (307); $*$, xanthosine (284); ∇ , acides citrique: iso-citrique, cisaconitique (194); \square , acide hippurique (180); \bullet , acide urique (163); \triangle , Na_2HPO_4 (142); \oplus , Na_2SO_4 (142); \odot , créatinine (113); $*$, urée, chlorure de sodium (60,58,5). - - -, Courbe théorique (perméation pure).

par ultrafiltration sur membrane RP à base d'acétate de cellulose. On observe pour la plupart des solutés que T_R est lié au PM, la seule exception concerne les ions sulfate et phosphate pour lesquels il suggère un PM plus élevé.

Par contre les V_e associés à ces mêmes solutés par chromatographie sur Séphadex G-15 sont, pour un grand nombre d'entre eux, indépendants du PM comme le montre la Fig. 2B. On observe pour plusieurs solutés soit un V_e supérieur à $V_0 + V_i$ ($K_d > 1$: pour l'acide urique, l'acide hippurique, la xanthosine) soit un V_e supérieur à celui attendu d'après les caractéristiques du Sé-

phadex G-15 (vitamine B₁₂) ce qui dans les deux cas indique des interactions avec le gel [6, 7, 9, 10]. Ainsi la vitamine B₁₂ ne peut pas être utilisée comme étalon. Le comportement des acides citrique, iso-citrique et cis-aconitique est plus intéressant. La Fig. 2B montre qu'ils sont élués comme des solutés de PM plus élevé que le leur. De plus l'expérience démontre que leur volume d'élué dépend du pH de l'élué, il augmente quand le pH diminue jusqu'à une valeur compatible avec leur PM à pH 3. Ce comportement peut être interprété en tenant compte de la nature chimique du Séphadex G-15. La matrice du gel contient en effet des groupements acides carboxyliques [11] qui lui confèrent des propriétés d'échangeur de cations. Des substances chargées négativement seront exclues du gel si la force ionique de l'élué est trop faible (inférieure à 0.01 M). Ainsi il suffira de diminuer le pH ou d'augmenter la force ionique de l'élué [11, 12] pour éliminer ces effets secondaires. La Fig. 2B renseigne également sur le comportement particulier des sulfates et des phosphates [11, 13, 14] qui sont élués comme des solutés de PM plus élevés.

De tout ceci il résulte qu'il est impossible d'effectuer l'étalonnage universel d'une colonne de CES. Cependant par ultrafiltration sur membrane RP ou Millipore on associe à chacun des pics repérés par CES un T_R qui permet d'attribuer un PM apparent aux solutés correspondant à chacun de ces pics.

Liquides biologiques des sujets normaux. La Fig. 3 représente les chromatogrammes, obtenus par CES, de l'urine et du plasma de sujets normaux. A 254 nm 9 pics détectés dans l'urine sont repérés de a à i dans l'ordre des

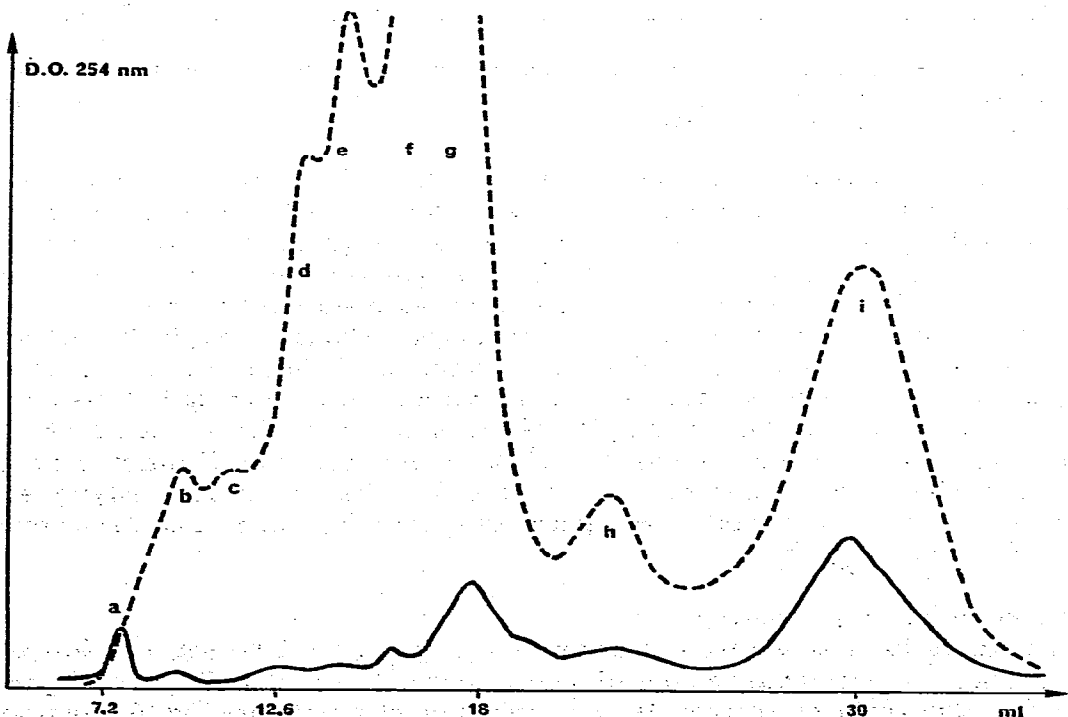


Fig. 3. Chromatographie de l'urine et du plasma de sujet normal sur Séphadex G-15. — — —, 5 µl urine; —, 25 µl plasma.

volumes d'éluion croissants. Tous les pics de l'urine sauf le pic c sont présents dans le plasma à des concentrations beaucoup plus faibles. A 206 nm le même nombre de pics est repéré avec des intensités plus fortes.

Liquides biologiques de sujets urémiques. Tous les pics de l'urine (Fig. 4)

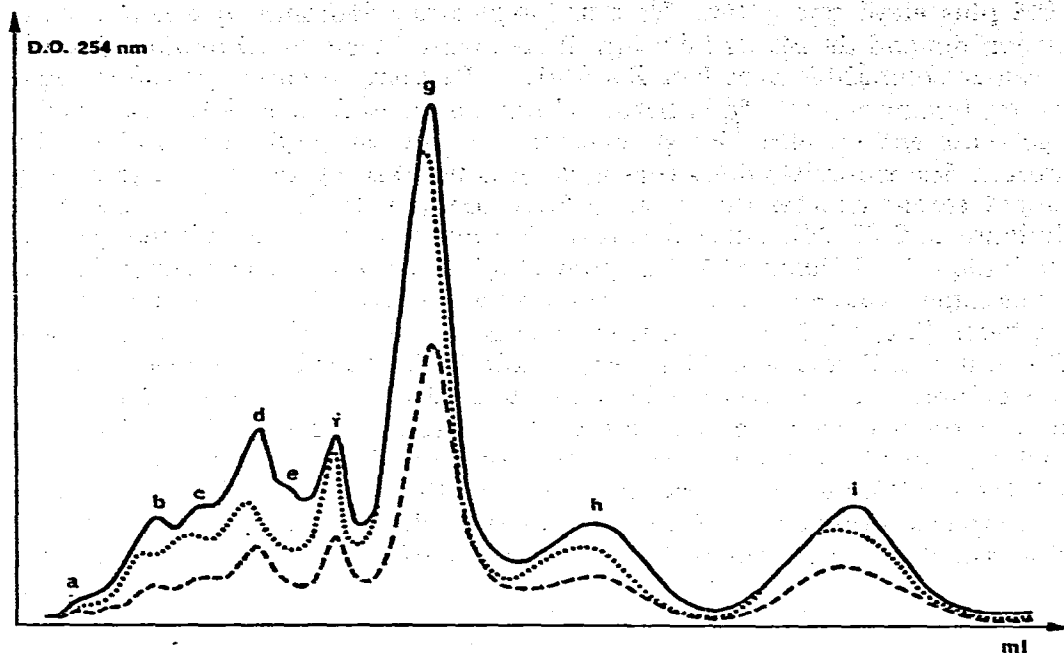


Fig. 4. Chromatographie du plasma d'un urémique avant et après dialyse et du bain de dialyse sur Séphadex G-15. —, 25 µl plasma avant dialyse; — — —, 25 µl plasma après dialyse; , 50 µl bain de dialyse.

se retrouvent dans le plasma des sujets urémiques. Tous ces pics contiennent des solutés dialysables. L'ultrafiltration sur membrane RP et Millipore montre que seuls les pics b et c correspondent à des solutés qui se comportent comme la vitamine B₁₂ (Tableau I). Ces solutés, bien que se comportant de la même façon vis à vis des membranes, ont des volumes d'éluion différents sur Séphadex G-15. L'influence du caractère échangeur d'ions du Séphadex est ici retrouvée. Ainsi le montre la Fig. 5: les volumes d'éluion des pics b et c augmentent avec la force ionique de l'éluant; les solutés correspondants contiennent donc des substances chargées négativement en milieu aqueux à pH 7. Le choix du sulfate de sodium 0.0024 M comme solution d'éluion repose sur la meilleure séparation des pics b et c dans les conditions analytiques. Il faudra toutefois noter qu'à pH 7 plusieurs polyacides comme l'acide citrique sont élués avec le pic b.

Chromatographie d'échange d'ions

La séparation des solutés qui composent le pic b a été l'objet d'un intérêt particulier. Le chromatogramme obtenu à partir du pic b isolé par CES préparative d'un bain de dialyse de sujet urémique et représenté Fig. 6 a permis de détecter:

à 254 nm: 5 sous-pics b₁, (b₂ + b₃), b_{4,2}, b₅ et b₆

TABLEAU I

TAUX DE REJET MESURÉS POUR LES PICS a À i SUR DEUX TYPES DE MEMBRANES, RP ET MILLIPORE

Ces valeurs sont calculées à partir des pics obtenus en CES avec du plasma de patients urémiques.

Solutés correspondant aux pics	T_R (%)	
	Sur membrane RP à base d'acétate de cellulose	Sur membrane Millipore PSAC-1000
a	100	100
b	90-95	65-70
c	90-95	65-70
d	80-84	40-45
e-i	50-55	0-10

Volume d'éluion en ml

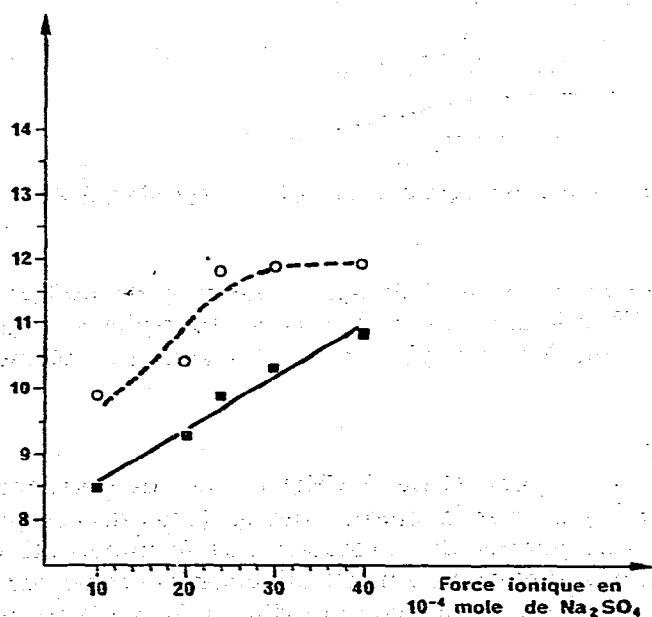


Fig. 5. Variation du volume d'éluion avec la force ionique de l'éluant en CES sur Séphadex G-15. —, Pic b; ---, pic c.

à 206 nm: 4 sous-pics b_1 , ($b_2 + b_3$), $b_{4,1}$ et b_5 .

Les sous-pics $b_{4,1}$ et $b_{4,2}$ sont pratiquement confondus, le sommet du sous-pic $b_{4,1}$ correspond à un léger épaulement du sous-pic $b_{4,2}$ à 254 nm.

Association CES + CEI

En CES l'injection de 500 μl de plasma, au lieu de 25 μl , ou de 100 μl d'urine, au lieu de 5 μl , est rendue nécessaire par la perte de sensibilité provoquée en CEI par le gradient d'éluion. Il a été vérifié que cette injection 20 fois plus forte en CES ne modifiait pas la séparation des pics b, c et d. Tous

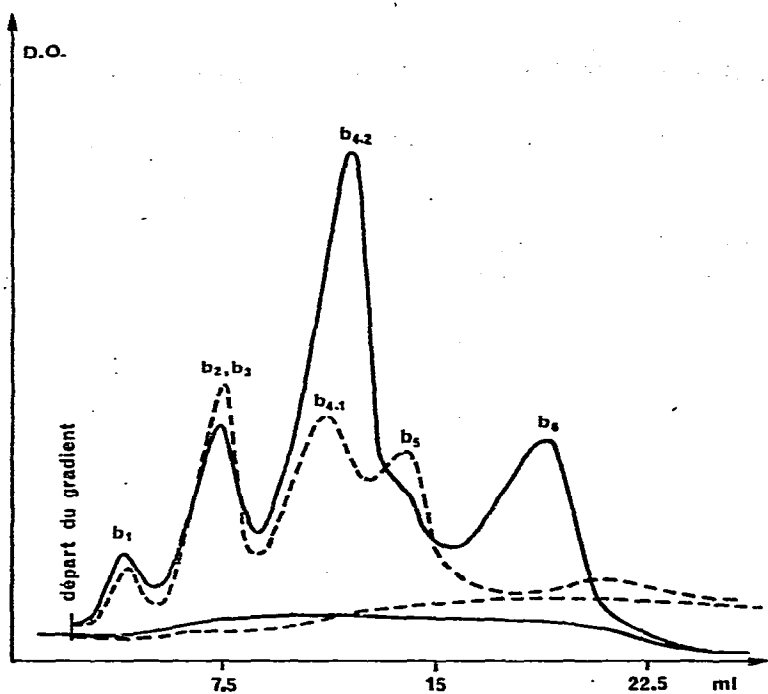


Fig. 6. Fractionnement du pic b par chromatographie sur DEAE-Séphadex A-25. —, 254 nm; ---, 206 nm.

les sous-pics b_1 à b_6 sont effectivement repérés après injection de 500 μ l de plasma et collecte du pic b. Chez le sujet normal tous ces sous-pics sont présents dans l'urine alors que seuls les sous-pics ($b_2 + b_3$) sont notablement repérés dans le plasma.

Reproductibilité de la méthode

L'analyse par chromatographie liquide (CES + CEI) permet de déterminer la concentration des solutés détectés par la mesure des surfaces de ces pics.

Les vérifications suivantes ont permis de constater: que le même pic est toujours repéré au même volume d'élution, sur 10 injections l'erreur sur ce volume ayant été de $\pm 1.2\%$; qu'à un même volume d'un même échantillon déposé sur la colonne correspond pour chaque pic la même surface. Ainsi pour 13 injections d'un même plasma durant 18 mois, avec changement de la colonne de CES tous les mois, la surface du pic b a été de $404 \pm 64 \text{ cm}^2/\text{ml}$ soit une reproductibilité de 16%. Cette reproductibilité est suffisante pour classer les malades urémiques suivant l'importance des pics détectés. Il faut d'ailleurs noter que sur une même colonne de CES cette reproductibilité est de 10% ce qui signifie qu'une partie de la dispersion est liée, comme il était prévisible, au changement de colonne. Il semble néanmoins important d'intégrer dans la reproductibilité des résultats le changement de colonne. Il est en effet impossible de calibrer entre elles les colonnes sur un échantillon universel car la réponse de la colonne dépend de la nature du soluté déposé sur la colonne.

DISCUSSION

(1) Le volume d'élution d'un soluté sur Séphadex G-15 ne dépend pas uniquement de son PM mais aussi de sa nature chimique surtout si ce soluté est ionisable [11]. Par contre, en ultrafiltration sur membrane, les taux de rejet mesurés sont fonction des PM des solutés, la seule exception concernant les ions sulfates et phosphates. Ces anions, comme en CES, se comportent comme des solutés de PM plus élevés. Ce comportement particulier est dû à l'hydratation qui donne à ces anions un diamètre plus important que celui des ions libres [11]. Nous avons confirmé cette interprétation en observant la variation du taux de rejet mesuré pour l'ion phosphate avec le changement de pH. Ce taux de rejet passe de 90% à pH 7 (forme Na_2HPO_4) à 18% à pH 3 (forme NaH_2PO_4). La diminution de taille que suggère cette variation va bien dans le sens d'une diminution de l'hydratation puisque celle-ci est fonction de la charge des molécules.

Pour tenir compte de toutes ces observations, il semble préférable de dire que les pics b et c contiennent des solutés qui à pH 7 en milieu aqueux ont une taille comparable à celle de la vitamine B_{12} (diamètre moléculaire libre 14.6 Å) [15] plutôt que d'attribuer à ces solutés le PM de la vitamine B_{12} .

(2) Le système de CES a été comparé à celui décrit par Fürst et collaborateurs [6, 7]. Ces auteurs utilisent pour l'ultrafiltration préliminaire des plasmas une membrane Amicon Centriflo qui retient les solutés de PM supérieurs à 50,000 daltons et du Séphadex G-15 pour la séparation chromatographique ultérieure mais dans des conditions analytiques différentes des nôtres. Cette comparaison a conduit aux remarques suivantes: la préparation des échantillons de plasmas par ultrafiltration à travers la membrane RP AN-69 est préférable car il existe dans l'ultrafiltrat obtenu avec la membrane Centriflo des solutés qui sont élués avec le pic b (pic 8 de Fürst), solutés qui sont absents de l'ultrafiltrat sur RP AN-69. De ce fait ces auteurs ne peuvent détecter que les solutés que nous repérons dans les pics c et d (pic 7 de Fürst); l'ordre d'élution est le même dans les deux systèmes mais nos conditions permettent une analyse plus rapide (1 h 20 au lieu de 4 h) et montrent plus nettement les différences qui existent entre les échantillons analysés.

(3) La détection dans l'ultraviolet à 206 nm permet de détecter en milieu biologique le maximum de solutés [16]. Cependant, en CES, la détection à 254 nm est suffisante pour repérer les pics a à i. En CEI il est en revanche indispensable d'effectuer la détection avec deux longueurs d'ondes 206 et 254 nm pour repérer le maximum de solutés. De plus le rapport d'absorption 254/206 permet de mieux différencier les pics (différence entre $b_{4,1}$ et $b_{4,2}$).

(4) La séparation des produits d'origine biologique par CEI sur des supports à base de polystyrène ne permettait pas d'obtenir des résultats satisfaisants [17]. Ainsi les solutés correspondant aux pics b et c après fixation sur résine Dowex 1-X8 n'ont pas pu être élués alors que Takita et al. [18] utilisent une résine comparable (Amberlite) pour fractionner les polypeptides urinaires. Les supports à base de polydextran introduits par Porath et Lindner [19] ont été largement utilisés avec succès pour fractionner des produits biologiques. Malheureusement ces supports non rigides et gonflables ont une résistance limitée à la pression. Ils ne peuvent donc pas être utilisés dans de véritables conditions

de chromatographie haute performance où des débits d'élution élevés sont rendus nécessaires. Un compromis a donc été choisi entre la rapidité d'analyse et la résolution.

(5) La technique associant CES + CEI et décrite ici, est applicable à l'analyse de tous les pics a à i avec des modifications sur les conditions de CEI. Elle a été utilisée pour rechercher plus particulièrement parmi les solutés de la taille de la vitamine B₁₂ celui correspondant au pic b_{4,2} qui est responsable de la polynévrite des urémiques [20]. Nous considérons qu'il est indispensable de procéder à ce type de fractionnement, afin de visualiser le maximum de solutés contenus dans les liquides biologiques, avant d'entreprendre l'identification des métabolites présents dans l'urine ou dans les prélèvements d'hémodialysats de patients urémiques. La chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse [21-26] est une technique qui a été largement utilisée avec efficacité dans ce domaine mais qui laisse dans l'ombre des produits, soit très polaires, soit de PM élevés non transformables en dérivés volatils et donc non chromatographiables en phase gazeuse [21]. Nous avons précisément observé cette situation au cours de l'étude des solutés qui constituent le pic b. Nous y avons identifié par cette technique les acides citrique, iso-citrique, cisaconitique, tratrique et un produit non identifié alors que le soluté responsable de la polynévrite des urémiques (pic b_{4,2}) ne peut pas être transformé en dérivé volatil.

CONCLUSION

En associant la chromatographie liquide haute performance d'exclusion stérique et d'échange d'ions il est possible d'analyser en 1 h les solutés de la taille de la vitamine B₁₂ contenus dans 100 µl d'urine de sujet normal ou dans 500 µl de plasma de patient urémique. Le système chromatographique décrit est utilisé pour suivre, chez les patients urémiques dialysés, la concentration plasmatique du soluté repéré comme sous-pic b_{4,2} et qui est responsable de la polynévrite des urémiques.

RESUME

On décrit l'analyse chromatographique des solutés urémiques dont certains de la taille de la vitamine B₁₂ seraient toxiques. Les liquides biologiques de sujets normaux et urémiques (500 µl de plasma ou 100 µl d'urine) sont fractionnés par chromatographie d'exclusion stérique sur Séphadex G-15 en 9 pics (a à i) qui absorbent à 254 nm. Par ultrafiltration sur membrane on attribue aux solutés élués dans les pics b et c la taille de la vitamine B₁₂. Le pic b est fractionné par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Séphadex A-25 en 6 sous-pics (b₁ à b₆); le sous pic b_{4,2} est lié à la polynévrite des urémiques. La méthode proposée est rapide (1 h) et reproductible (coefficient de variation de la surface des pics = 16%).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A.L. Babb, P.D. Farrel, D.A. Urelli et B.H. Scribner, *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs*, 18 (1972) 98.
- 2 M. Gajdos et R. Dzurik, *Int. Urol. Nephrol.*, 5 (1973) 331.
- 3 R. Dzurik, V. Hupkova, P. Cernacek, E. Valovicova et T.R. Niederland, *Clin. Chim. Acta*, 46 (1973) 77.
- 4 P. Dall'Aglio, C. Buzio, V. Cambi, L. Arisi et L. Migone, *Proc. Eur. Dialysis Transplant. Ass.*, 9 (1972) 408.
- 5 N.K. Man, B. Terlain, J. Paris, G. Werner, A. Sausse et J.L. Funck-Brentano, *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs*, 19 (1973) 320.
- 6 A. Gordon, J. Bergström, P. Furst et L. Zimmerman, *Kidney Int.*, 7 (1975) S-45.
- 7 P. Furst, J. Bergström, A. Gordon, E. Johnsson et L. Zimmerman, *Kidney Int.*, 7 (1975) S-272.
- 8 L. Migone, P. Dall'Aglio et C. Buzio, *Clin. Nephrol.*, 3 (1975) 82.
- 9 P. Andrews, *Lab. Pract.*, 16 (1967) 851.
- 10 J.-C. Janson, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 12.
- 11 M. Rinaudo, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 11 (1974) 2285.
- 12 D. Eaker et J. Porath, *Sep. Sci.*, 2 (1967) 507.
- 13 B.Z. Egan, *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 382.
- 14 C.A. Burtis, G. Goldstein et C.D. Scott, *Clin. Chem.*, 16 (1970) 201.
- 15 D.M. Green, G.D. Antwiller, J.W. Moncrief, J.F. Decherd et R.P. Popovich, *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs*, 22 (1976) 627.
- 16 R.L. Schriener, R.C. Fuson et D.Y. Curtis, *The Systematic Identification of Organic Compounds*, Wiley, New York, 1962, p. 179.
- 17 O. Mikeš, P. Štrop, J. Zbrožek et J. Čoupek, *J. Chromatogr.*, 119 (1976) 339.
- 18 T. Takita, K. Miyoshi, K. Kumada et H. Nishi, *Agr. Biol. Chem.*, 38 (1974) 745.
- 19 J. Porath et E.B. Lindner, *Nature (London)*, 191 (1961) 69.
- 20 J.L. Funck-Brentano, N.K. Man, A. Sausse, J. Zingraff, J. Boudet, A. Becker et G.F. Cueille, *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs*, 22 (1976) 163.
- 21 E. Jellum, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 427.
- 22 T.L. Masimore, H. Veening, W.J.A. VandenHeuvel et D.A. Dayton, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 247.
- 23 A. Thompson et S.P. Markey, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1313.
- 24 F.W. Bultitude et S.J. Newham, *Clin. Chem.*, 21 (1975) 1329.
- 25 J.E. Mrochek, W.C. Butts, W.T. Rainey et C.A. Burtis, *Clin. Chem.*, 17 (1971) 72.
- 26 A.M. Lawson, R.A. Chalmers et R.W.E. Watts, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 1283.