

tur im Bad gemessen); $n_D^{22} = 1,516$. Das Präparat gab mit Tetranitromethan eine hellgelbe Farbreaktion.

3,368 mg Subst. gaben 10,815 mg CO_2 und 3,662 mg H_2O

$\text{C}_{18}\text{H}_{30}$ Ber. C 87,73 H 12,27% Gef. 87,63 H 12,17%

$[\alpha]_D = +39^\circ$ ($c = 0,82$)

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung W. Manser) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Es wird der Abbau der Dextro-pimarsäure (III) zum trans-7,12-Dimethyl-7-äthyl-1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13-dodekahydro-phenanthren (IX) beschrieben. Die Verbindung IX soll zum Vergleich der Konfiguration der Ringverknüpfungsstellen der Ringe A und B der Di- und Triterpene einerseits und der allo-Steroide anderseits verwendet werden.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

299. Eine interferometrische Mikro-Methode für Diffusionsmessungen

von H. Labhart, W. Lotmar und P. Schmid

(25. IX. 51.)

1. Apparatur.

Vor einiger Zeit haben Labhart & Staub¹⁾ über ein Verfahren der Mikro-Elektrophorese berichtet, bei welchem die Ausmessung der Konzentrationsstufen auf interferometrischem Wege erfolgt. Es wurde dazu die Interferometeranordnung von Jamin benutzt, wobei das durch ein Linsensystem erzeugte Bild der Elektrophoresezelle entsprechend der Konzentrationsverteilung von Interferenzstreifen durchgezogen war. Wegen des kleinen Kanalquerschnitts von $1,5 \times 5$ mm konnte auf einen Thermostaten verzichtet werden, ohne dass störende Konvektionsströmungen in der Zelle auftraten.

Nach diesen Prinzipien wurde von der Firma Kern & Co., Aarau, ein Mikro-Elektrophoreseapparat entwickelt, wobei durch Wahl einer abgeänderten Interferometeranordnung noch eine Verdopplung der Empfindlichkeit erreicht werden konnte²⁾.

¹⁾ H. Labhart & H. Staub, Helv. **30**, 1954 (1947).

²⁾ W. Lotmar, Helv. **32**, 1847 (1949).

Der Kanalteil der Zelle ist gänzlich ohne Flansche ausgebildet (Fig. 1), so dass die Grenzflächen zwischen Lösung und Puffer unmittelbar am Rand des Gesichtsfeldes gebildet werden. Durch Unterteilung einer solchen Zelle in zwei gegeneinander bewegliche Hälften erhält man daher eine für Diffusionsversuche geeignete Anordnung (Fig. 2). Bei der üblichen Konstruktion der *Tiselius*-Zellen mit Flanschen besteht dagegen diese Möglichkeit nicht, da gerade der zentrale Teil des Gesichtsfeldes ausfällt. Zur Überwindung dieser Schwierigkeit wurden verschiedene Wege beschritten, wobei sich relativ komplizierte Zellkonstruktionen ergaben¹⁾.

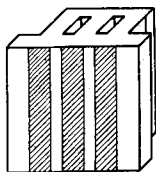


Fig. 1.
Elektrophoresezelle.

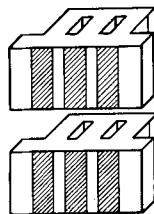


Fig. 2.
Diffusionszelle.

Die Kanalkanten lassen sich mit Facetten von ca. 0,1 mm Breite ausführen, so dass in der Mitte des Gesichtsfeldes nur ein Streifen von ca. 0,2 mm Breite optisch ausfällt. In Fig. 3 ist ein mit einer derartigen Zelle durchgeführter Diffusionsversuch wiedergegeben, wobei die angegebene Schärfe der Anfangsgrenzfläche tatsächlich erreicht ist.

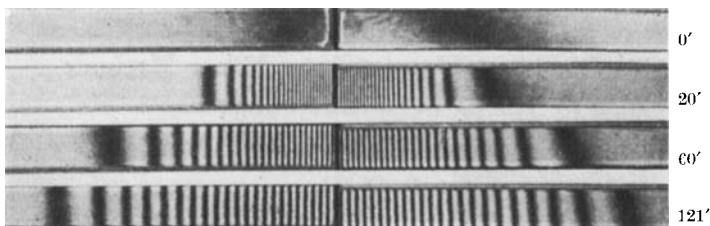


Fig. 3.
Diffusion von Kaliumchlorid.

Die folgenden Messungen wurden mit dem Mikro-Elektrophoreseapparat Modell LK 30 von Kern & Co. durchgeführt²⁾, dessen Diffusionszelle eine Gesamthöhe von 30 mm und einen Kanalquerschnitt von $1,5 \times 5$ mm aufweist. Für einen Versuch wird daher nur eine Lösungsmenge von ca. $0,2 \text{ cm}^3$ benötigt. In den beiden Kanälen dieser Zelle können gleichzeitig zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt werden. Es wurde mit Konzentrationsdifferenzen von 1—2% gearbeitet, was ca. 30—60 Interferenzstreifen entspricht. Der Apparat befand sich in einem Raum, dessen Temperaturschwankungen ca. 1° betrugen. Der Nullpunkt der Zeitskala liess sich mit einer Unsicherheit von rund 4 sec. festlegen, da das Überschieben der Zellenhälften ca. $\frac{1}{2}$ sec. benötigt und die Belichtungszeit 3 sec. beträgt.

¹⁾ D. L. Loughborough & A. J. Stamm, J. Phys. Coll. Chem. **40**, 1113 (1936); O. Lamm, Nov. Acta. Reg. Soc. Upsala IV 10 (6), (1937); H. Neurath, Science **93**, 431 (1941); St. Claesson, Nature **158**, 834 (1946); K. G. Stern, S. Singer & S. Davis, J. Biol. Chem. **167**, 321 (1947); D. S. Kahn & A. Polson, J. Phys. Coll. Chem. **51**, 816 (1947); H. Svensson, Acta chem. scand. **3**, 1170 (1949); L. G. Longworth, Rev. Sci. Instr. **21**, 524 (1950).

²⁾ F. Schaub & A. Alder, Schweiz. med. Wschr. **81**, 483 (1951); W. Lotmar, Rev. Sci. Instr. (im Druck).

2. Methode der Auswertung.

Der zu Versuchsbeginn scharf stufenförmige Konzentrationsprung verbreitert sich mit fortschreitender Zeit zu einem allmählichen Übergang (Fig. 4), dessen Gestalt durch Ausmessung des Interferenzbildes bestimmt werden kann. Von Streifen zu Streifen nimmt nämlich der Brechungsindex und damit in erster Näherung die Konzentration um einen konstanten Betrag zu. Aus der zeitlichen Änderung des Kurvenverlaufes lässt sich die Diffusionskonstante auf folgende Weise bestimmen:

Wir legen die Gültigkeit des *Fick'schen* Diffusionsgesetzes zu Grunde, welches lautet:

$$(1) \quad \frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

c = Konzentration,
 t = Zeit,
 x = Ortskoordinate,
 D = Diffusionskonstante.

Zur Zeit $t = 0$ springe die Konzentration am Orte $x = 0$ vom Wert Null auf den Wert c_0 . Die Konzentrationsverteilung zur Zeit t , durch Integration von (1) erhalten, lautet dann:

$$(2) \quad c = \frac{c_0}{2} \left(1 + \frac{1}{\sqrt{\pi D t}} \cdot \int_{\xi=0}^x e^{-\frac{\xi^2}{4 D t}} d\xi \right)$$

Die Ableitung dieser Gleichung nach x ist die Gradienten-Kurve (*Gauss-Kurve*), welche bei Verwendung der Schlierenmethode erhalten wird.

Definiert man als Halbwertsbreite h einer solchen Diffusionsschicht¹⁾ den Abstand der Orte, wo $c = \frac{1}{4} c_0$ und $\frac{3}{4} c_0$ ist (Fig. 5), so erhält man aus (2) die Ausdrücke:

$$(3) \quad h = 1,908 \sqrt{D t}; \quad (3a) \quad D = 0,2747 \cdot h^2/t.$$

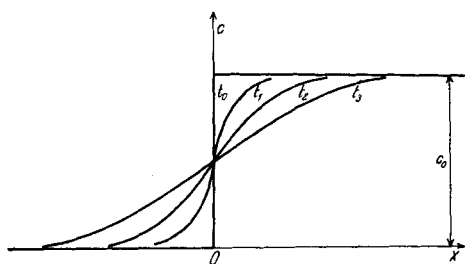


Fig. 4.

Zeitliche Änderung eines Konzentrationsgradienten.

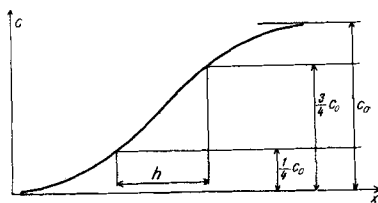


Fig. 5.

Bestimmung der Halbwertsbreite.

Die Halbwertsbreite h ist somit proportional zur Wurzel aus der Zeit, ganz wie die Halbwertsbreite der Gradienten-Kurve, von welcher sie sich nur um einen Faktor 0,573 unterscheidet. Trägt man daher in einem Koordinatensystem die Werte von h gegen die Wurzel aus der Zeit auf, so sollten die Messpunkte, wenn das *Fick'sche* Diffusionsgesetz erfüllt ist,

¹⁾ Diese Grösse ist bei *Labhart & Staub* l. c. mit $2 x_{\frac{1}{2}}$ bezeichnet.

auf einer Geraden durch den Nullpunkt liegen. Der tangens des Neigungswinkels α dieser Geraden ist

$$(4) \quad \operatorname{tg} \alpha = h/\sqrt{t} = 1,908 \sqrt{D}.$$

In einem solchen Diagramm lässt sich daher eine Teilung anbringen, auf welcher die Gerade direkt den Wert der absoluten Diffusionskonstante anzeigt (Fig. 6).

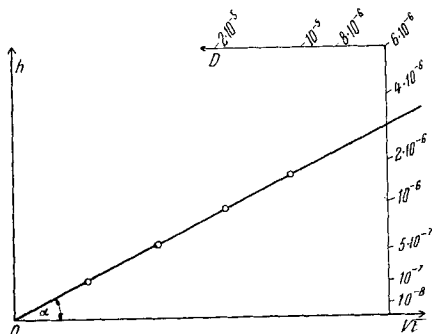


Fig. 6.

Graphische Bestimmung der Diffusionskonstanten.

Dieses Verfahren hat neben seiner Einfachheit den Vorteil, dass die zu verschiedenen Zeiten gewonnenen Messwerte graphisch gemittelt werden. Es lässt aber auch in übersichtlicher Weise eventuelle Abweichungen von der Linearität erkennen. Andererseits kann die Diffusionskonstante natürlich auch gemäss (3a) aus einer Einzelmessung berechnet werden.

Ein erster Näherungswert von h kann erhalten werden, indem man die Gesamtzahl der Streifen bestimmt und je $\frac{1}{4}$ derselben von beiden Enden her abzählt. Der Abstand der so ermittelten Orte in der Zelle ist näherungsweise gleich h . Diese Bestimmung ist nicht sehr genau, da einerseits die Streifenbilder der beiden Zellenhälften im allgemeinen nicht stetig aneinander schliessen und andererseits nur ganzzahlige (oder bei Verwendung sowohl der schwarzen wie der weissen Streifen halbzahlige) Streifenzahlen benützt werden.

Genauer ist folgendes Verfahren: Das Streifenbild wird entweder mit einem Komparator ausgemessen oder mit Hilfe eines verzeichnungsfreien Projektionsapparates in ca. 20facher Vergrösserung auf der Abszissenachse eines Koordinatensystems (Millimeterpapier) entworfen und auf dieser die Lage aller Streifen markiert (Fig. 9). Der Konzentrationsverlauf ergibt sich, indem man über den Marken Ordinaten errichtet, die, bei Null beginnend, von Streifen zu Streifen um einen konstanten Betrag zunehmen. An der Trennungsfuge der beiden Halbzellen ist dabei eine Extrapolation derart auszuführen, dass der erste Punkt der zweiten Zellenhälfte auf der Geraden anzunehmen ist, welche durch Verlängerung des letzten Kurvenstückes der ersten Zellenhälfte erhalten wird. Diese Extrapolation ist mit grosser Sicherheit durchführbar, da die Kurve in der Mitte ja nahezu eine Gerade darstellt. Nach Auftragen sämtlicher Punkte werden dieselben durch eine Kurve verbunden und es wird deren Gesamthöhe bestimmt, wobei auch Bruchteile von Streifenabständen an den Enden

der Kurve extrapoliert werden können. Hierauf werden zwei Parallelen zur Abszissenachse in den Abständen von $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ der Gesamthöhe eingezeichnet und die Abszissenwerte der Schnittpunkte dieser Geraden mit der Kurve bestimmt. Deren Differenz ist nunmehr der gesuchte Wert h (Fig. 5), wobei für die Berechnung in absolutem Mass natürlich der Vergrößerungsfaktor zu berücksichtigen ist.

Die Bestimmung der Diffusionskonstanten nach diesem Verfahren auf Grund von 4 Werten für h erfordert ungefähr eine Stunde.

3. Ergebnisse.

Zur Prüfung der Methode wurden Messungen an Kaliumchlorid und Saccharose durchgeführt, welche nach andern Methoden gut untersucht sind (Fig. 7). Es handelt sich um je 2 Versuche, welche gleichzeitig in den beiden Kanälen der Diffusionszelle liefen. Die Messpunkte liegen recht genau auf Geraden durch den Nullpunkt. Das bedeutet, dass der Diffusionskoeffizient höchstens von der Konzentration, nicht aber vom Konzentrationsgefälle abhängt. Eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit äussert sich in einer Abweichung der Konzentrationsverteilung von Gl. (2) in der Art, dass die Kurve nicht mehr genau zentrisch-symmetrisch in bezug auf ihren Mittelpunkt ist, wobei die Halbwertsbreite h nicht geändert wird¹⁾.

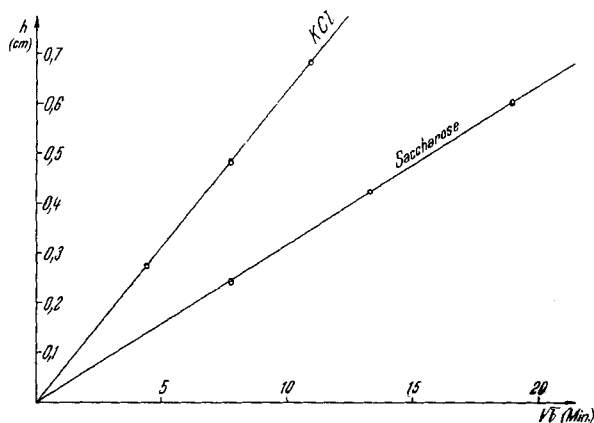


Fig. 7.

Diffusion von Kaliumchlorid und Saccharose.

In Tabelle 1 oben sind die nach Gl. (3a) aus den verschiedenen Messpunkten berechneten Werte der Diffusionskonstanten für Kaliumchlorid zusammengestellt. Als Mittelwert und mittlere Abweichung ergibt sich daraus (alle folgenden Angaben in cgs-Einheiten):

$$D_{22,6} = (1,75 \pm 0,02) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}.$$

¹⁾ G. Kegeles & L. J. Gosting, Am. Soc. 69, 2516 (1947).

Tabelle 1.
Interferometrische Diffusionsmessungen.

	t (Min.)	20	60	121	
Kaliumchlorid gegen Wasser. c = 2%, T = 22,6°	D × 10 ⁵ cm ² sec ⁻¹ 1. Kanal	1,73 ₇	1,76 ₈	1,76 ₃	
	2. Kanal	1,72 ₀	1,78 ₇	1,75 ₈	
	t (Min.)	60	180	360	
Saccharose gegen Wasser. c = 2,15%, T = 21,8°	D × 10 ⁶ cm ² sec ⁻¹ 1. Kanal	4,37	4,53	4,62	
	2. Kanal	4,53	4,53	4,60	
	t (Min.)	120	480	1440	2880
Ochsen-Serumalbumin in Michaelis-Puffer. c = 1,27%, T = 17,8°	D × 10 ⁷ cm ² sec ⁻¹ 1. Kanal	5,05	5,14	5,15	5,36
	2. Kanal	5,31	5,41	5,42	5,08

Die graphische Auswertung (Fig. 7), bei welcher naturgemäss die grossen Werte von h relativ mehr Gewicht erhalten, ergab:

$$D_{22,6} = 1,76 \cdot 10^{-5}.$$

Von *Harned & Nuttall*¹⁾ wurde nach der konduktometrischen Methode, deren Genauigkeit von *Gosting*²⁾ mit der *Gouy*-Methode bestätigt werden konnte, gefunden:

$$D_{25} = 1,840 \cdot 10^{-5} \text{ für } c = 2\%.$$

Mit Hilfe der von *Harned & Nuttall* angegebenen Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit berechnet sich daraus:

$$D_{22,6} = 1,732 \cdot 10^{-5}.$$

Für Saccharose sind die entsprechenden Werte in Tab. 1, Mitte, wiedergegeben. Der Mittelwert $D_{21,8} = (4,53 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$ sowie der graphisch gefundene von $D_{21,8} = 4,58 \cdot 10^{-6}$ ist mit dem von *Gosting & Morris*³⁾ angegebenen Wert $D_{25} = 5,226 (1 - 0,0148c) \cdot 10^{-6}$ zu vergleichen, welcher von *Svensson*⁴⁾ bestätigt wurde. Aus diesem berechnet sich mit Hilfe der Formel von *Stokes-Einstein* für die verwendete Konzentration von 2,15%:

$$D_{21,8} = 4,65 \cdot 10^{-6}.$$

Wenn den graphisch ermittelten Werten, wie wahrscheinlich, mehr Gewicht beizulegen ist, so stimmen diese für beide Substanzen auf 1,5% mit den gut gesicherten Literaturwerten überein.

¹⁾ *H. S. Harned & R. L. Nuttall*, Am. Soc. **69**, 736 (1947); **71**, 1460 (1949).

²⁾ *L. J. Gosting*, Am. Soc. **72**, 4418 (1950).

³⁾ *L. J. Gosting & M. S. Morris*, Am. Soc. **71**, 1998 (1949).

⁴⁾ *H. Svensson*, Acta Chem. Scand. **5**, 72 (1951).

Schliesslich ist in Fig. 8 und Tab. 1 unten eine Messung an reinem Ochsen-Serumalbumin¹⁾ wiedergegeben.

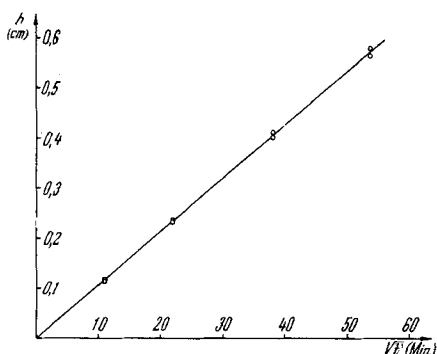


Fig. 8.

Diffusion von Ochsen-Serumalbumin.

Das Präparat wurde in *Michaelis-Puffer*²⁾ (Veronal-Natrium/Natriumacetat/NaCl/HCl; pH = 5,7 und $\mu = 0,1$) gelöst und vor der Messung 24 Std. dialysiert. Auch hier liegen die Messpunkte auf einer Geraden. Bemerkenswert ist, dass bereits die 120'-Werte ein mit den übrigen Werten sehr gut übereinstimmendes Resultat ergeben. Bei der Ausmessung dieser Diagramme wurde eine Vergrösserung von $50 \times$ angewendet. Fig. 9 zeigt die entsprechende Auswertekurve für einen der Kanäle.

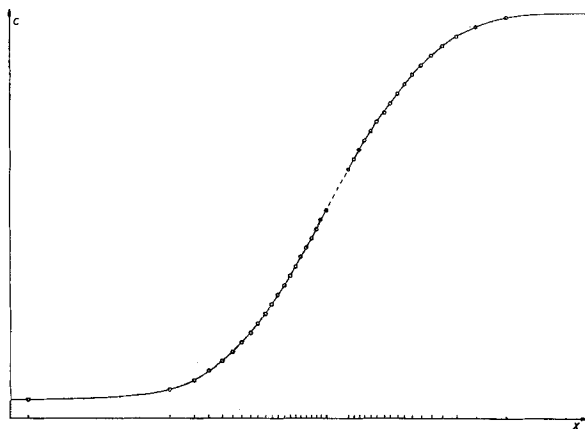


Fig. 9.

Diffusion von Ochsen-Serumalbumin. Auswertekurve eines 120'-Diagramms.

Aus dem gefundenen Mittelwert $D_{17,8} = (5,24 \pm 0,14) \cdot 10^{-7}$ (graphisch ermittelt $5,25 \cdot 10^{-7}$) berechnet sich

$$D_{20} = (5,59 \pm 0,15) \cdot 10^{-7}.$$

¹⁾ Präparat der *Armour Laboratories*, London. Wir möchten auch hier für die Überlassung des Präparates bestens danken.

²⁾ *L. Michaelis*, *Bioch. Z.* **234**, 139 (1931); *E. Wiedemann*, *Schweiz. med. Wschr.* **76**, 241 (1946).

Dem gegenüber ergibt sich für Pferdeserumalbumin als Mittelwert verschiedener Messungen¹⁾

$$D_{20} = 6,2 \cdot 10^{-7}.$$

Die Diskrepanz scheint ausserhalb der Messfehler zu liegen. Es handelt sich zwar um verschiedene Serumalbumine, deren Molekulargewichte jedoch als gleich angegeben werden. Andererseits hat die Zusammensetzung des Lösungsmittels Einfluss auf die gefundene Diffusionskonstante, wie bekannt ist¹⁾ und von uns bestätigt werden konnte. Vermutlich ist der Unterschied hierdurch begründet.

Genauigkeit. Als Fehlerquellen bei der beschriebenen Methode sind in Betracht zu ziehen die mangelnde Temperaturkonstanz, die optischen Restfehler von Diffusionszelle und Interferometerplatte, die Extrapolationen in der Mitte und an den Enden der Kurve sowie eine eventuelle Nichtproportionalität zwischen Konzentration und Brechungsindex der untersuchten Lösungen. Eine quantitative Abschätzung aller dieser Einflüsse ist nicht einfach, doch glauben wir sagen zu können, dass sich Diffusionskonstanten nach dieser Methode bei einer Konzentration von ca. 2% und h-Werten von ca. 0,5 cm für niedermolekulare Substanzen auf etwa 2%, für hochmolekulare auf 3–4% genau bestimmen lassen.

4. Vergleich mit anderen Methoden.

Wohl die älteste interferometrische Diffusionsmessung stammt von *Waitz*²⁾, welcher die zeitliche Änderung des Brechungsindex von Gasen in einer bestimmten Höhe eines Diffusionsgefässes mass. Das *Rayleigh*-Interferometer wurde, zum Teil in modifizierter Form, von verschiedenen Autoren³⁾ zu Diffusionsmessungen herangezogen. Die Verwendung eines astigmatischen Abbildungssystems erlaubt dabei eine hohe Genauigkeit zu erreichen. Die Dimensionen der Apparatur sind allerdings diejenigen der normalen Elektrophoresapparatur nach *Philpot-Svensson*. Falls ausserdem mit einer Zelle vom „*flowing-junction*“-Typ gearbeitet wird, so handelt es sich nicht um eine Mikro-Methode. Dasselbe ist zu sagen von der interferometrischen Methode nach *Gouy*⁴⁾. Hier wird die Diffusionskonstante aus dem Interferenzbild gewonnen, welches bei Abbildung eines Spaltes durch die Diffusionsschicht hindurch entsteht. Diese Methode arbeitet sehr rasch und genau, wobei jedoch hohe Anforderungen an die Schärfe der Anfangsgrenzschicht gestellt werden. Der Auswertung wird a priori eine im Bereich der Messung von der Konzentration unabhängige Diffusionskonstante zugrunde gelegt.

*Sitte & Zuber*⁵⁾ haben den Verlauf des Brechungsindex aus dem Grenzwinkel der Totalreflexion in einer geeignet gestalteten Zelle bestimmt. Da diese Apparatur jedoch

¹⁾ Siehe *E. J. Cohn & J. T. Edsall*, *Proteins, Amino Acids and Peptides*, New York 1943.

²⁾ *K. Waitz*, *Wied. Ann.* **17**, 201, 351 (1882).

³⁾ *H. Svensson*, *Acta chem. scand.* **3**, 1170 (1949); *L. G. Longsworth*, *Rev. Sci. Instr.* **21**, 524 (1950); *H. Svensson*, *Acta Chem. scand.* **5**, 72 (1951); *E. Calvet & R. Chevalerias*, *J. Chim. Phys.* **43**, 37, 84 (1946); *Revue d'Optique* **29**, 35 (1950); *H. Rögner*, *Koll. Z.* **118**, 10 (1950); *J. St. L. Philpot & G. H. Cook*, *Research* **1**, 234 (1948).

⁴⁾ *L. G. Longsworth*, *Am. Soc.* **69**, 2510 (1947); *G. Kegeles & L. J. Gosting*, *Am. Soc.* **69**, 2516 (1947); *C. A. Coulson, J. T. Cox, A. G. Ogston & J. St. L. Philpot*, *Proc. Roy. Soc. (A)* **192**, 382 (1948).

⁵⁾ *K. Sitte & R. Zuber*, *Zs. f. Phys.* **79**, 280, 306, 320 (1932); **91**, 617, 622, 642, 651 (1934).

keine photographische Registrierung erlaubt, konnte mit ihr nur die zeitliche Wanderung einer bestimmten Konzentration verfolgt werden, während nach unserer Methode der ganze Konzentrationsverlauf zu jeder beliebigen Zeit aufgenommen werden kann.

Für Diffusionsmessungen eignen sich natürlich auch die andern für die Elektrophorese verwendeten optischen Anordnungen, nämlich die Schlieren- und die Skalenmethode¹⁾. Während die erstere wegen ihrer geringeren Empfindlichkeit grössere Mengen von Untersuchungslösung erfordert, ist die letztere für Serienuntersuchungen zu umständlich.

*Harned & Nuttall*²⁾ haben das konduktometrische Verfahren zu hoher Genauigkeit entwickelt, welches jedoch naturgemäss auf Elektrolyte beschränkt bleibt.

Wir glauben, mit der hier beschriebenen Methode einen günstigen Kompromiss zwischen apparativem Aufwand, Substanzbedarf, Versuchsdauer, Genauigkeit und Übersichtlichkeit verwirklicht zu haben.

Zusammenfassung.

Es werden Diffusionsmessungen mit einem interferometrischen Mikro-Elektrophoreseapparat der Firma *Kern & Co.* beschrieben. Die Ergebnisse an zwei Testsubstanzen (Kaliumchlorid und Saccharose) stimmen auf 1,5% mit den Literaturwerten überein. Eine einfache Auswertemethode der erhaltenen Diagramme wird angegeben, sowie ein Vergleich mit andern Messmethoden gezogen.

Kilchberg-Zürich und Aarau,
Laboratorium der *Kern & Co. AG.*

300. De l'obtention de podophyllotoxine cristallisée à partir de podophyllines du commerce³⁾

par **R. Brun.**

(31 X 51)

La podophylline employée depuis longtemps comme laxatif, a trouvé en dermatologie dès 1941, un nouveau champ d'action d'une certaine importance pratique. *Kaplan*⁴⁾ a montré que cette drogue pouvait guérir les condylomata acuminata par application locale. Cette constatation est d'un intérêt général au point de vue biologique et pourrait acquérir éventuellement une certaine importance en ce qui concerne l'étude et même la thérapeutique des tumeurs malignes. Le fait que la podophylline a un pouvoir stathmocinétique (blocage des mitoses) parle en faveur de cette conception. La podophylline provoque les mêmes altérations nucléaires⁵⁾ que celles que *Dustin*⁶⁾ a obtenu avec la colchicine, le paradigme des substances stathmocinétiques.

¹⁾ *G. Meyerhoff*, Makromol. Ch. **6**, 197 (1951).

²⁾ *H. S. Harned & R. L. Nuttall*, Am. Soc. **69**, 736 (1947); **71**, 1460 (1949).

³⁾ Ce travail a bénéficié d'un subside de la *Fondation Fritz Hoffmann-La Roche*.

⁴⁾ *I. W. Kaplan*, New Orleans med. J. **94**, 338 (1942).

⁵⁾ Voir par exemple: *L. S. King & M. Sullivan*, Arch. Path. (am.) **43**, 374 (1947); *H. Isler*, J. suisse de Méd., 80e année, **17**, 439 (1950).

⁶⁾ *A. P. Dustin*, Volume jubilaire en l'honneur du Prof. J. Demoor, Liège (1937).