

# A Kóssa-reakcióról. II.

Krutsay Miklós dr.

Magyar Imre Kórház, Patológiai Osztály, Ajka.

**Összefoglalás:** A szerző az oldhatósági szorzatok alapján elemzi a Kóssa-reakciónál végbemenő ioncserét. Oxálsavval kezelt metszetekből a vegyszeres redukció előtt az alapszövethez ionosan kötött ezüst híg ecetsavval eltávolítható, és az így kezelt metszetek hematoxilín-eozinnal vagy egyéb színezékekkel is megfesthetők.

## ON THE KÓSSA REACTION – II.

*The author analyzes ion exchanges occurring during the Kóssa reaction, based on solubility products. Using tissue sections treated with oxalic acid, the silver ionically bound to the ground tissue can be extracted with diluted acetic acid before reduction by chemicals. The sections thus obtained are suitable for counterstaining with hematoxylin-eosin, or with other dyes.*

A legtöbb szövettani festés és számos hisztokémiai eljárás heterogén rendszer fázishatárain végbemenő ioncserén alapul, amelynél a metszetben lévő, nehezen oldható, vagy a szerves vázhoz kötött, de elektrolitikusan disszociáló, szintelen vegyületek felületén rétegének ionjai helyet cserélnek a reagensoldat azonos töltésű ionjaival. A keletkezett új, szintén nehezen oldódó vegyületek vagy már eleve színesek vagy további reakcióval színessé tehetők, és ezáltal az eredeti vegyület lokalizációja mikroszkóppal megállapítható.

A kevésbé oldható sók telített oldatában, amelyben teljes disszociációt feltételezünk, dinamikus egyensúly áll fenn az oldatlan anyag és a belőle oldatba ment ionok között ( $A_mB_n$  összetételű sónál  $A_mB_n \leftrightarrow A_m + B_n$ ). Az oldódásnál, mint egyensúlyra vezető reakciónál a képződött anyagok és a kiindulási anyagok koncentrációi közötti összefüggést a tömeghatás törvénye írja le. E szerint az együtthatók hatványára emelt ionkoncentrációk szorzatának és az oldatlan só koncentrációjának hányadosa (egyensúlyi állandó,  $K=[A]^m \cdot [B]^n / [A_mB_n]$ ) állandó érték. Minthogy a kevésbé oldódó sók esetében a nevező, azaz a szilárd só koncentrációja állandónak (egységnyiinek) tekinthető, a  $K$ -val összevonható egy új konstanssá ( $K_{sp}$ ,  $K_s$ ,  $L$ , negatív logaritmus:  $pL$ ), tehát  $L=[A]^m \cdot [B]^n$ . Az  $[A]^m \cdot [B]^n$  ionszorzatot telített oldat esetében a só oldhatósági szorzatának nevezzük. Ez vezetőképességi mérésekkel határozható meg, és értéke függ a hőmérséklettől. Ha az oldószerbe vitt anyag mennyisége alapján

számított aktuális ionszorzat kisebb az oldhatósági szorzatnál, az oldat telítetlen, ha eléri annak értékét, akkor telített lesz, ha pedig azt meghaladja, a só egy része oldatlan marad. A táblázatokban megtalálható oldhatósági szorzat még nem ad egyértelmű felvilágosítást a különböző vegyületek oldhatóságáról, mert ehhez tekintetbe kell vennünk a molekulát alkotó ionok számát is. (Azonos  $L$ -érték esetében az a só oldódik jobban, amelynek képletében az ionok együtthatója nagyobb, tehát a molekula több ionra disszociál.)

Valamely elektrolit oldatában az ionkoncentrációk aránya egyenlő az együtthatók arányával ( $[A]/[B]=m/n$ ). A telített oldatban az egyes ionok koncentrációját kifejezhetjük az ion együtthatójának és a vegyület oldhatóságának ( $S$ ) szorzatával, azaz  $[A]=m \cdot S$  és  $[B]=n \cdot S$ . Ezeket behelyettesítve:

$$L=(mS)^m \cdot (nS)^n = S^{m+n} + m^m \cdot n^n$$

Az egyenlet átrendezésével kapott képletből kiszámítható a mol/l-ben kifejezett oldhatóság:

$$S = \sqrt[m+n]{L / m^m \cdot n^n} = A/m = B/n$$

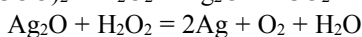
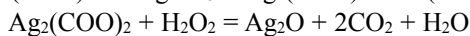
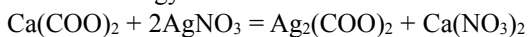
A vegyület oldhatóságát az ion-együtthatókkal rendre megszorozva megkapjuk az ionok moláris koncentrációját a telített oldatban. Az oldhatóság g/l-értékeihez jutunk, ha a mol/l-értékeket megszorozzuk a vegyület molekulatömegével illetve az egyes ionok tömegével. Azonos molaritás esetén a g/l-érték annál nagyobb, minél nagyobb a móltömeg illetve az iontömeg.

Telített oldatban bármelyik ion koncentrációjának

külső forrásból való növelése a tömeghatás törvénye értelmében csökkenti a másik ion koncentrációját („közös ion hatás”). Ez csak úgy következhet be, hogy a só oldhatósága csökken, és egy része kicsapódik az oldatból. (Az oldhatósági szorzat nem változik). Ezért alkalmazzák az analitikai kémiában a kémszereket feleslegben egyes ionok tökéletesebb leválasztására. Az oldhatósági szorzat segítségével megtudhatjuk, hogy az  $A_mB_n$  só milyen töménységben oldódhat olyan oldatban, amely  $c_A$  mol/l A-iont tartalmaz.  $L = ([A] + c_A)^m \cdot [B]^n$ . Ha  $c_A \gg [A]$ ,  $L \approx c_A^m [B]^n$ ,  $[B]^n \approx L / c_A^m$  és  $S \approx [B] / n \approx \sqrt[n]{L / c_A^m n^n}$ .

Ha azonos anionnal vagy kationnal rendelkező, két, nehezen oldódó só ( $A_mB_n$  és  $C_pB_r$ ) kerül egy oldatba, a nem közös ionok egyensúlyi koncentrációját az oldhatósági szorzatokból számíthatjuk ki:  $[A] = \sqrt[m]{L_1 / \sqrt{L_1 + L_2}}$  és  $[C] = \sqrt[p]{L_2 / \sqrt{L_1 + L_2}}$ ,  $[A]^m / [C]^p = L_1 / L_2$ . ( $m$  illetve  $p=1$  esetén  $\sqrt{L} = L$ ). A közös ion  $[B] = \sqrt[n]{L_1 / A^m} = \sqrt[r]{L_2 / C^p} = n[A] / m + r[C] / p$  koncentrációját döntően a jobban oldható só oldhatósági szorzata határozza meg [6].

A Kóssa-reakciót és a kobaltszulfid-reakciót ioncserével (heterogén cserebomlással) magyaráztuk [3, 4]. Ennek során a nehezen oldódó kalciumvegyület felszíni kationjai kicserélődnek a reagens kationjaival, olyan vegyületet képezve, amely oldhatatlanabb az eredeti kalciumvegyületnél. *Lillie* és *Fullmer* [5] szerint a kalcium-oxalát azért nem reagál az „egyszerű” (napfényel történő redukálást alkalmazó) Kóssa-reakciónál, mert az ezüst-oxalát jobban oldható nála. *Pizzolato* [7] kalcium-oxalátot ezüst-nitráttal és tömény hidrogén-peroxiddal kezelve, erős fénybehatásra pozitív reakciót kapott, feltehetően az alábbi egyenletek szerint:

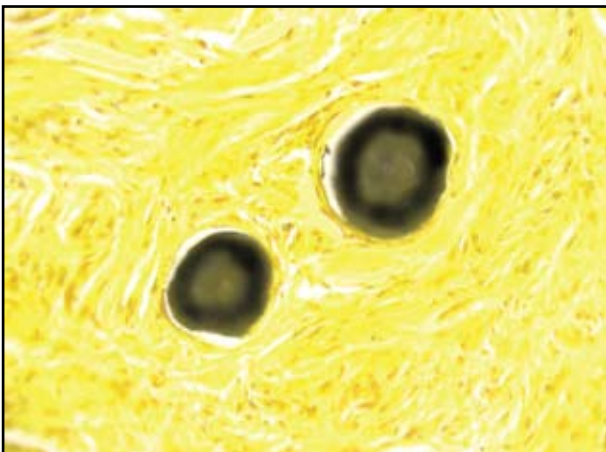


Az oldhatósági szorzatokból az oldhatóságot kiszámítva megállapítható, hogy egyes ezüstvegyületek (például

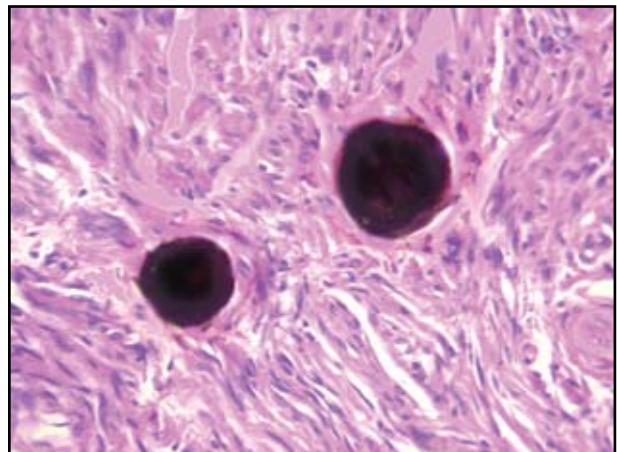
az ezüst-foszfát és az ezüst-karbonát) oldhatóbbak a megfelelő kalciumvegyületeknél (*I.* és *II. táblázat*). (A kalcium-oxalát és az ezüst-oxalát oldhatósága között nincs lényeges különbség.) A vegyszeres redukció eredménye azt bizonyítja, hogy ennek ellenére is képződik ezüstsó, és a Kóssa-reakció csupán azért negatív, mert a vegyület nem fényérzékeny. (Az eredeti módszerrel csak a kalcium-foszfát feketedik meg, de ez is csak metszetben, bizonyos szerves anyagok jelenlétében.) Az ezüstsó keletkezése a kalciumsó feletti oldat ionösszetételének változásából is levezethető.

A Kóssa-eljárásnál az ezüstnitrát-reagensben lévő ezüst-kationok nehezen oldódó sót ( $A_mB_n$ ) képeznek a szintén nehezen oldható  $Ca_pB_r$  kalciumsóból keletkezett  $B$  anionokkal. Eközben a kalciumsó oldódik, és belőle további kalcium-ionok kerülnek az oldatba, a nitrát-ionok mellé. Minthogy az ezüst-ionok koncentrációja a kalcium-ionokéhoz viszonyítva igen nagy, ezért az ezüstsó  $L_2 = [Ag]^m \cdot [B]^n$  oldhatósági szorzatának megfelelően a kalciumsó anionja eredeti koncentrációjának jelentősen csökkenie kell. A koncentráció azáltal csökken, hogy  $A_mB_n$  összetételű ezüstvegyületből álló csapadék válik ki. Ekkor a kalciumsó  $L_1 = [Ca]^p \cdot [B]^r$  oldhatósági szorzatából következően a kalcium-ionok koncentrációjának növekednie kell az oldatban, ami csak úgy történhet, hogy az eredeti kalciumvegyületből bizonyos mennyiség még oldódik. Ennek során az elektroneutralitásnak megfelelően  $B$  anionok is oldatba mennek, de ezeket az ezüst-ionok a kalciumsó felszínén azonnal leválasztják. Így magyarázhatjuk, hogy akkor is végbemegy a csapadékképződés, ha az ezüstsó oldhatósága nagyobb, mint az eredeti kalciumsóé.

A Kóssa reakciónál a kalcium-foszfáton kívül a többi szövetelem, így metszet szerves alapszövege – akár fénynek kitéve – hónapok múlva is színtelen marad, és tetszés szerinti kontrasztfestéssel megfesthető. (A fényérzékeny ezüstsók maradékának eltávolítása céljából az ezüstözési eljárások után szokványosan alkalmazott nátriumtioszulfát-kezelés tehát ez esetben feleslegesnek tűnik.)



1. ábra. Mészrögök meningiómában. Mészreakció.



2. ábra. Mészrögök meningiómában. Oxálsav – ecetsav – mészreakció – HE-festés.

## I. táblázat

## Egyes fémvegyületek oldhatósága

Vegyület	Oldhatósági szorzat* (L)	Oldhatóság		Vegyület	Oldhatósági szorzat* (L)	Oldhatóság	
		mol/l	g/l			mol/l	g/l
Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 350,57	1,4·10 <sup>-37</sup>	1,7·10 <sup>-8</sup>	6,0·10 <sup>-6</sup>	CuS 85,60	6,0·10 <sup>-37</sup>	7,7·10 <sup>-19</sup>	7,4·10 <sup>-17</sup>
FePO <sub>4</sub> 150,82	9,9·10 <sup>-16</sup>	3,1·10 <sup>-8</sup>	4,7·10 <sup>-6</sup>	FeS 87,91	6,0·10 <sup>-19</sup>	7,7·10 <sup>-10</sup>	6,8·10 <sup>-8</sup>
Pb <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 811,49	1,5·10 <sup>-32</sup>	1,7·10 <sup>-7</sup>	1,4·10 <sup>-4</sup>	PbS 239,24	3,4·10 <sup>-28</sup>	1,8·10 <sup>-14</sup>	4,3·10 <sup>-12</sup>
Ni <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 366,08	4,7·10 <sup>-32</sup>	2,1·10 <sup>-7</sup>	7,7·10 <sup>-5</sup>	NiS 90,77	1,4·10 <sup>-24</sup>	1,2·10 <sup>-12</sup>	1,1·10 <sup>-10</sup>
Co <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 366,08	2,1·10 <sup>-35</sup>	4,5·10 <sup>-8</sup>	1,6·10 <sup>-5</sup>	CoS 90,96	4,0·10 <sup>-21</sup>	6,3·10 <sup>-11</sup>	5,7·10 <sup>-9</sup>
Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 418,58	1,4·10 <sup>-18</sup> – 8,9·10 <sup>-17</sup>	1,5·10 <sup>-5</sup> – 4,3·10 <sup>-5</sup>	6,7·10 <sup>-3</sup> – 1,2·10 <sup>-2</sup>	Ag <sub>2</sub> S 247,8	6,0·10 <sup>-51</sup>	1,1·10 <sup>-17</sup>	2,8·10 <sup>-15</sup>
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 310,18	2,1·10 <sup>-33</sup> – 1,0·10 <sup>-26</sup>	1,1·10 <sup>-7</sup> – 2,5·10 <sup>-6</sup>	3,4·10 <sup>-5</sup> – 7,7·10 <sup>-4</sup>	CuCO <sub>3</sub> 113,6	1,4·10 <sup>-10</sup>	1,2·10 <sup>-5</sup>	1,3·10 <sup>-3</sup>
Cu(COO) <sub>2</sub> 141,6	4,4·10 <sup>-10</sup>	2,1·10 <sup>-5</sup>	3,0·10 <sup>-3</sup>	PbCO <sub>3</sub> 267,19	1,6·10 <sup>-13</sup>	4,0·10 <sup>-7</sup>	1,1·10 <sup>-4</sup>
Co(COO) <sub>2</sub> 146,92	2,7·10 <sup>-9</sup>	5,2·10 <sup>-5</sup>	7,6·10 <sup>-3</sup>	NiCO <sub>3</sub> 118,70	1,4·10 <sup>-7</sup>	3,8·10 <sup>-4</sup>	4,5·10 <sup>-2</sup>
Ag <sub>2</sub> (COO) <sub>2</sub> 303,76	5,4·10 <sup>-12</sup> – 3,6·10 <sup>-11</sup>	1,1·10 <sup>-4</sup> – 2,1·10 <sup>-4</sup>	3,4·10 <sup>-2</sup> – 6,3·10 <sup>-2</sup>	CoCO <sub>3</sub> 118,91	1,0·10 <sup>-10</sup>	1,0·10 <sup>-5</sup>	1,2·10 <sup>-3</sup>
Ca(COO) <sub>2</sub> 128,09	2,4·10 <sup>-9</sup> – 2,0·10 <sup>-8</sup>	4,9·10 <sup>-5</sup> – 1,4·10 <sup>-4</sup>	6,3·10 <sup>-3</sup> – 1,8·10 <sup>-2</sup>	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 275,75	6,2·10 <sup>-12</sup> – 8,1·10 <sup>-12</sup>	1,2·10 <sup>-4</sup> – 1,3·10 <sup>-4</sup>	3,3·10 <sup>-2</sup> – 3,6·10 <sup>-2</sup>
AgC <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub> 391,05	2,8·10 <sup>-12</sup>	1,7·10 <sup>-6</sup>	6,5·10 <sup>-4</sup>	CaCO <sub>3</sub> 100,09	2,8·10 <sup>-9</sup> – 8,7·10 <sup>-9</sup>	5,3·10 <sup>-5</sup> – 9,3·10 <sup>-5</sup>	5,3·10 <sup>-3</sup> – 9,3·10 <sup>-3</sup>
Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> OH 301,22	1,8·10 <sup>-58</sup>	1,1·10 <sup>-7</sup>	3,3·10 <sup>-5</sup>	Ca <sub>4</sub> H(PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> 446,24	1,3·10 <sup>-47</sup>	4,6·10 <sup>-7</sup>	2,0·10 <sup>-4</sup>
Ca(C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> 606,45	3,6·10 <sup>-15</sup>	9,7·10 <sup>-6</sup>	5,9·10 <sup>-3</sup>	Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 254,108	3,0·10 <sup>-18</sup>	9,1·10 <sup>-7</sup>	2,3·10 <sup>-4</sup>

\*Egyes L-értékekre vonatkozóan némileg eltérő adatokat találunk az irodalomban

## II. táblázat

## Ionkoncentrációk telített oldatban (mol/l)

Vegyület	Anion	Kation
CoS	6,3·10 <sup>-11</sup>	6,3·10 <sup>-11</sup>
CaCO <sub>3</sub>	7,3·10 <sup>-5</sup>	7,3·10 <sup>-5</sup>
CoCO <sub>3</sub>	1,0·10 <sup>-5</sup>	1,0·10 <sup>-5</sup>
CuCO <sub>3</sub>	1,2·10 <sup>-5</sup>	1,2·10 <sup>-5</sup>
Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,3·10 <sup>-4</sup>	2,6·10 <sup>-4</sup>
Ca(COO) <sub>2</sub>	8,3·10 <sup>-4</sup>	8,3·10 <sup>-4</sup>
Co(COO) <sub>2</sub>	5,2·10 <sup>-5</sup>	5,2·10 <sup>-5</sup>
Cu(COO) <sub>2</sub>	2,1·10 <sup>-5</sup>	2,1·10 <sup>-5</sup>
Ag <sub>2</sub> (COO) <sub>2</sub>	1,6·10 <sup>-4</sup>	3,2·10 <sup>-4</sup>
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2,6·10 <sup>-6</sup>	3,9·10 <sup>-6</sup>
Co <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	9,0·10 <sup>-8</sup>	1,4·10 <sup>-7</sup>
Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	3,4·10 <sup>-8</sup>	5,1·10 <sup>-8</sup>
Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2,9·10 <sup>-5</sup>	8,7·10 <sup>-5</sup>

Mint hogy *in vitro* a kalciumfoszfát sem reagál, annak lehetőségét is felvetettük, hogy metszetben a Kóssa-pozitivitást szerves gyökökhöz kötött kalcium is okozza, és ezek a gyökök mésztelenítés után újra kalciumot köthetnének meg [3]. Mésztelenített csontszövet-blokkok kalciumsó-oldattal való kezelés után, illetve a nélkül is erősen megfestődtek alizarinvörös S-sel, de a belőlük készült metszetekben ugyanezen reagenssel nem tudtuk a kalcium jelenlétét hisztokémiailag igazolni.

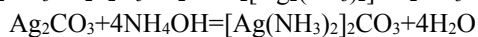
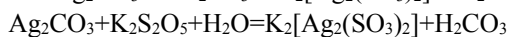
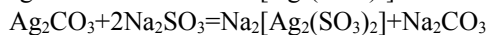
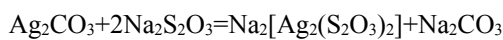
Az ezüstnitrát-kezelés után vegyszeres redukálást használva a kalciumfoszfáton kívül a kalcium-oxalát, a kalcium-pirofoszfát és a kalcium-karbonát, oxálsav előkezeléssel pedig a kalcium-sztearát is pozitív eredményt ad. (Az oxálsav elbontja a zsírsavas kalciumsókat, miközben zsírsav és kalcium-oxalát keletkezik. Ez utóbbi ezüst-nitráttal azonnal reagál, ezüst-oxalátot képezve.) A sejtmagok ekkor halványbarnára festődnek, az alapszövet pedig sárga lesz, mert a bázikus színezékekhez hasonlóan hozzá kötődött kevés ezüst-ion az erélyesebb

redukáló-hatásra szintén fémezüstté alakul (1. ábra). Ez az aspecifikus festődés előnyösnek mondható, mert kontrasztfestés nélkül is lehetővé teszi a mészlerakódások lokalizálását. Nátriumtioszulfát-utókezelés ez esetben még kevésbé szükséges, mert a redukálószer az összes redukálható ezüstöt átalakítja.

Hosszabb idő alatt, magasabb hőmérsékleten a rézionok is képesek a zsírsavakkal só (rézszappant) képezni, a kalciumszappanokat pedig rézszappanná alakítják. (ezüst- illetve kobalt-sókkal nem tapasztaltunk ioncserét.) A kékeszöld zsírsavas rézsók apoláros oldószerekben oldhatók, és alkalmasak a zsírsavak spektrofotometriás mennyiségi meghatározására. A réz-acéttal kapott reakciót Benda a zsírnekroszisok makroszkópos demonstrálására illetve a zsírsavak hisztokémiai kimutatására ajánlotta [1]. A kalciumszappanok gyengébben színeződnek a zsírsavakkal. Fischler [2] fagyasztott metszeteken rézacetát-pácolás után hematoxilin-festést, majd lúgos káliumferricianid-oldattal való differenciálást alkalmazott. Ekkor a festődést nem a zsírsavas réz saját színe, hanem a belőle képződött, kékesfekete rézhematoxilin adta.

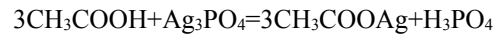
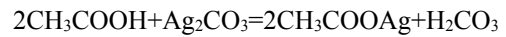
Amennyiben vegyszeres redukció esetén a sejtmagokat vagy az alapszövetet más színben (például trikróm-festéssel) kívánjuk feltüntetni, vagy – kevés anyag esetében – ugyanazon a metszeten kell hematoxilin-eozin-festést is végeznünk, a reakció során az alapszövethez kötődött ezüstöt még a redukálás előtt el kell távolítanunk, anélkül, hogy a kalciumvegyületek felszínén képződött ezüstvegyületeket kioldanánk. Erre a célra az ezüst-ionokkal komplexet képező vegyületek, nehézfém-sók illetve savak alkalmazása jöhet szóba. Kísérleteinknél nátrium-tioszulfátot, nátrium-szulfítot, kálium-piroszulfítot, ammónia-oldatot, réz-acetátot, ólom-acetátot és ecetsavat használtunk.

Nátrium-tioszulfát-, nátrium-szulfít- illetve kálium-piroszulfít-kezelés után az alapszövet színtelen maradt, ammónia-oldat után sárga lett. A kalciumvegyületek nem festődtek, mert az ezüstsók komplexek alakjában kioldódtak, és helyükön az eredeti kalciumvegyület maradt vissza.



Réz-acetát illetve ólom-acetát hatására a sejtmagok festődése elmaradt, viszont a meszes területek fekete reakcióterméke mellett az alapszövet továbbra is halványosárga lett.

Az ecetsav színtelenné tette az alapszövetet. Az ezüst-karbonátot és az ezüst-foszfátot feloldotta, míg az ezüst-oxalátot változatlanul hagyta.



Oxálsavas mészreakció esetében a különböző kalciumsók átalakulnak kalcium-oxaláttá, amely ezüstionok hatására ezüst-oxaláttá változik. Minthogy a kalcium-oxalát és az ezüst-oxalát ecetsavban oldhatatlan, az ezüstnitrát-kezelést követő híg (2 ml/dl-es) ecetsavval történő néhány perces kezelés az ezüst-ionokat csupán az alapszövetből vonja ki. A kalciumvegyületek helyén kialakult ezüst-oxalát a metszetben marad, és a redukciónál megfeketedik. Elvileg más, gyenge sav is használható, amely az ezüst-oxalátot nem oldja. (Oxálsavat alkalmazva azonban a meszes területek festődése gyengült.) Tehát az oxálsavas mészreakciót az ezüst-nitrát utáni ecetsav-kezeléssel kiegészítve a metszetet alkalmassá tehetjük hematoxilin-eozinnal vagy egyéb színezékekkel történő megfestésre (2. ábra).

## IRODALOM

1. Benda, C.: Eine makro- und mikrochemische Reaction der Fettgewebs-Nekrose. Virch. Arch. 1900. 161. 194-198.
2. Fischler, F. J.: Über die Untersuchung von Neutralfetten, Fettsäuren und Seifen in Gewebe. Cbl. allg. Path. path. Anat. 1904. 15. 913-917.
3. Krutsay M.: A Kóssa-reakcióról. Osteol. Közl. 2004. 12. 215-217.
4. Krutsay M.: A kobaltszulfid-reakcióról. Osteol. Közl. 2011. 19. 196-197.
5. Lillie, R. D., Fullmer, H. M.: Histopathologic technic and practical histochemistry. 4th ed. McGraw-Hill Co. New York, 1976. p. 451.
6. Michelin Lausarot, P., Vaglio, G. A.: Calcoli stechiometrici. 2a ed. Piccin. Padova, 1993.
7. Pizzolato, P. J.: Histochemical recognition of calcium oxalate. J. Histochem. Cytochem. 12 1964. 12. 333-336.