

Електронен магнитен резонанс (ЕПР и ЕНДОР) в България. Минало, настояще и бъдеще

Н. Д. Йорданов

Лаборатория „Електронен парамагнитен резонанс“, Институт по катализ, Българска академия на науките, 1113 София
Факс: (02) 9712967, ел. поща: ndyepr@ic.bas.bg

Постъпила на 7.05.2007 г.

Експериментално спектроскопията на електронния парамагнитен резонанс (ЕПР) бе открита през 1944 г. [1], а една година по-късно – и тази на ядрения магнитен резонанс (ЯМР) [2]. Следващите 10–15 години се характеризират с бурно развитие и на двете области основно в методично отношение. В този период бе открит и методът на електронно-ядрения-двоен-резонанс (ЕНДОР) [3], представляващ комбинация от ЕПР и ЯМР. Изследванията с тях се провеждаха главно във областта на физиката и химията, а от 1956 г. и на биологията. По-нататък, от началото на 60-те години на 20 век методът на ЕПР спектроскопията се наложи в изследвания на веществото, благодарение на изключителната си селективност да регистрира само парамагнитни субстанции при това с висока чувствителност, достигаща до 10^{10} спина. В първите десетина години наличните ЕПР спектрометри бяха собствени разработки на изследователите, а около 1955–1957 г. се появиха и първите фирмени спектрометри на Varian (САЩ) и JEOL (Япония). Това бе началото на широкото приложение на ЕПР спектроскопията.

Началото

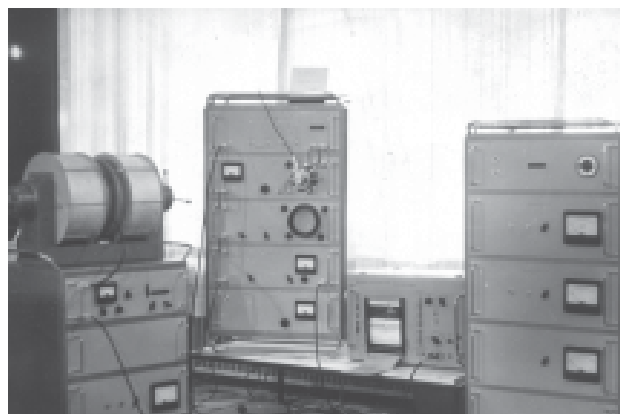
В България необходимостта от изследвания с ЕПР бе осъзната за първи път от страна на биолози през 1962 г. В онези години обаче бе невъзможно да се закупи спектрометър не само поради ограничени финанси, но и поради наложеното на България ембарго от страна на Западна Европа и САЩ за внос на електронни елементи или апарати, свързани с евентуално военно предназначение в съответствие с така наречената комисия КОКОМ (COCOM – CO-ordinated COmmittee for Multilateral export control). По тази причина биолозите избраха друг път – те се обърнаха към директора на Физическия институт (ФИ) на БАН (по това време акад. Г. На-

джаков) с молба да бъде конструиран в България такъв спектрометър. В резултат бе решено да се изработят два спектрометра, един за биологични и втори за физически изследвания. Като главен конструктор за реализиране на задачата бе определен инж. Александър Малиновски, който бе работил в хидрометеорологичната станция (ХМС, сега НИХМ) на БАН и имаше опит с микровълнова техника. Той започна работа по конструирането на спектрометрите с помощта на н.с. Груйчо Стайнов от ФИ БАН и физика Н. Йорданов (Централна биохимична лаборатория, ЦБХЛ БАН). Създадената група нямаше никаква информация на този етап както по отношение на апаратурата, така и на теорията на метода, т.е. започваше се от ниво „нула“. След две години, през 1964 г. в резултат на усилена работа първият български ЕПР спектрометър беше готов. Наличието на ЕПР спектрометър, с което се поставяше началото на изследвания с него у нас, бе забележителен момент в историята на българската научна общност и той бе отбелязан с кратка статия, публикувана във вестник „Вечерни новини“ (бр. 3884 от 29 февруари 1964 г.). Факсимиле на тази статия е дадено на фиг. 1. На фотографията, публикувана в статията, се виждат Ал. Малиновски и Н. Йорданов да работят със спектрометъра. На фиг. 2 е показан и самият новоконструиран спектрометър. Забележителен факт за онези времена бе, че изцяло конструираните с радиолампи спектрометри работеха при дължина на вълната 10 cm (3 GHz, S-диапазон), докато в световен мащаб мнозинството от останалите работеха при дължина на вълната 3 cm (9 GHz, X-диапазон). Отговор на въпроса „Защо тези спектрометри бяха конструирани да работят в S-диапазона“ от научна гледна точка беше, че те са предназначени за работа с биологични обекти, съдържащи значителни количества вода, а известно е, че водните проби абсорбират много по-малко микровълнова енергия в S-отколкото в X-



Фиг. 1. Факсимиле на статията публикувана във в. „Вечерни новини“ (бр. 3884/29.02.1964) информираща за построяването на първия ЕПР спектрометър в България.

диапазона. Следователно тези спектрометри са много по-удобни за работа с биологични проби. Наистина, при работа с плоски кювети с размери $10 \times 20 \times 2.5$ mm, обемът на пробата достигаше до 0.5 ml. Истинското обяснение обаче бе друго – поради действието на ембаргото (СОСОМ) спрямо България в тези години, ние бяхме в състояние да работим от една страна само с клистриони, произведени от фирмата Тунгсрам (Унгария), предназначени за работа в S-диапазона, а от друга – достъпните за нас микровълнови елементи бяха само диоди, които ни бяха доставени от бракувани американски радарни. По тази причина разработените от нас спектрометри бяха от „проходен, хомодинен“ тип, без атенюатор и изолатор. Ролята на атенюатор се изпълняваше от малка антена, вмъквана на различна дълбочина в резонатора, и по този начин „облъчваща“ пробата с необходимата, но неизвестна по величина енергия. От друга страна, връзката на резонатора с диода се реализираше с една намотка, вкарана в резонатора. С въртене на тази намотка в положение между успоредна и перпендикулярна ориентация спрямо магнитната компонента на микровълновото лъчение се осигуряваше необходимата мощност, падаща на диода, за работа в линейната част на волтамперната му характеристика.

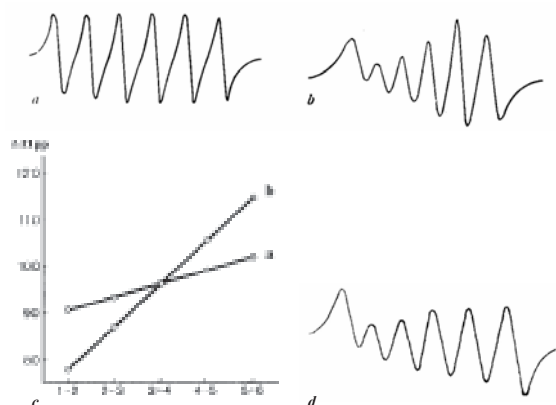


Фиг. 2. Външен вид на първия български ЕПР спектрометър.

И така, само двадесет години след откриването на метода, може да се приеме, че 1964 г. е стартовата година на ЕПР изследванията в България, с което могат да се похвалят малко страни в света.

Първи стъпки

Съгласно решението, взето при договарянето между директорите на ИФ и ЦБХЛ за конструирането на ЕПР спектрометрите, през 1964 г. в България се оформиха два изследователски центъра – първият в Института по физика БАН и вторият в ЦБХЛ БАН. Двата центъра започнаха независими изследвания – главният конструктор Ал. Малиновски и Д. Кафалиева (ЦЛБФ БАН) започнаха проучвания върху биофизични (основно нативни и фотостимулирани ЕПР сигнали в растения), а вторият (Н. Йорданов и Н. Бакърджиева, ИФР БАН) – биофизични (предимно ролята на метални йони като растителни регулатори) и методични проблеми. Методичните проблеми се пораждаха от факта, че в тези времена, както бе отбелязано, търговските ЕПР спектрометри работеха предимно в X- и много рядко в Q-диапазона (35 GHz), а спектрометри, работещи в S-диапазона, бяха неизвестни. Това е важно да се отбележи, тъй като синглетните сигнали бяха еднакви по вид както в X-, така и в S-диапазона, докато по-сложните спектри се различаваха по вид. Например, на фиг. 3 са показани ЕПР спектрите на аквакомплекс на Mn^{2+} регистриран в X (фиг. 3a) и в S- (фиг. 3b) диапазона. Разликата е очевидна и следователно възниква въпросът защо тези два спектъра имат различен вид. Обяснение на този феномен бе намерено в по-силно изразените нелинейни ефекти и по-голямата ширина на отделните свърхфини линии (фиг. 3c) в спектрите регистрирани в S-диапазона в сравнение с тези в X-диапазона. За да се демонстрира коректността на това предположение, за първи път [4] бе проведена симулация на спектрите, регистрирани в S-диапазона (фиг. 3d). Друг пример от това време е из-



Фиг. 3. Регистрирани ЕПР спектри на $Mn(H_2O)_6^{2+}$: *a* - X-диапазон; *b* - S-диапазон; *c* - нееквидистантност на линиите между X- и S-диапазоните; *d* - симулиран ЕПР спектър в S-диапазона [4].

следването на ЕПР спектъра на $MnCl_2$, разтворен във водно-алкохолна смес. Експерименталните ЕПР спектри са показани в лявата страна на фиг. 4 [5], а симулираните са в дясната ѝ част. Както се вижда, съвпадението е повече от добро като се има предвид, че в тези времена всички изчисления се правеха точка по точка и на ръка. Получените резултати по-нататък бяха използвани при изучаване окислението на аскорбинова киселина, фотоиндуцирани промени в количеството на Mn^{2+} в растителни тъкани и изолирани хлоропласти, както и при взаимодействието на мангана с гиберелиновата киселина и с хлорохинхлорид [6].

По-нататъшно развитие на ЕПР спектроскопията в България

Историята на ЕПР в България може и трябва да се маркира с описаното по-долу развитие.

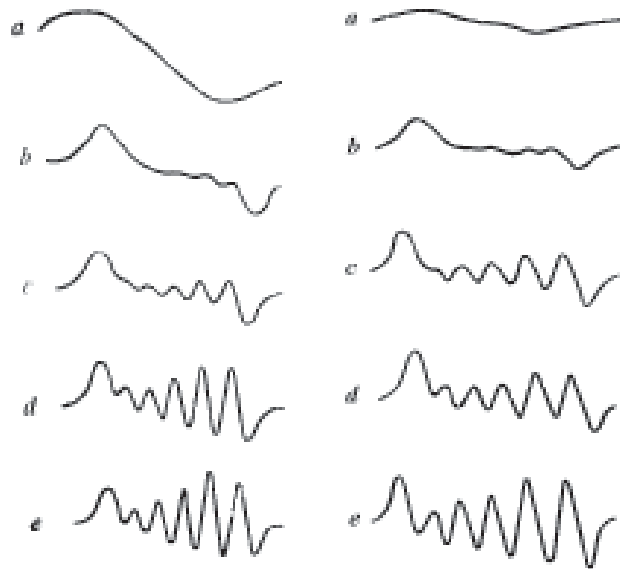
1966 г.

Химическият факултет на Софийския университет закупи един ЕПР спектрометър – РЭ1301 (произведен в бившия Съветски Съюз). За съжаление този апарат не беше експлоатиран успешно поради слаба операторска квалификация.

Д-р Симеон Ангелов от Института по обща и неорганична химия при БАН успя да построи ЕПР спектрометър, използвайки фабрично готови блокове и произведения у нас елементи.

1967 г.

Институтът по органична химия (ИОХ) при БАН достави един ЕПР спектрометър (JES-3BS-X) от фирмата JEOL (Япония). Той беше второ поколение ЕПР спектрометри на фирмата, работещ в X-диапазона, конструиран по хибридна схема - с радиолампи и транзи-



Фиг. 4. Набор от ЕПР спектри на $MnCl_2$, разтворен в смес от етанол и вода при различни съотношения, регистрирани в S-диапазона. Лявата колона представя експериментално регистрирани спектри. Първият спектър е на разтвор в 100% етанол, а най-долният – 100% вода. Дясната колона представя съответните симулирани ЕПР спектри [5].

стори, което беше световното ниво за времето си. Н. Йорданов бе поканен да организира лабораторията по ЕПР. С това работата с единия от конструираните ЕПР спектрометри, работещи в S-диапазона бе прекратена.

В Химическия факултет на Софийския университет започна преподаване по „Теория и приложение на ЕПР спектроскопията в химията“, първоначално в рамките на курса „Физични методи в органичната химия“, а след няколко години и като отделен курс.

1970 г.

В рамките на създадения Единен център по химия, включващ химическите институти на БАН и Химическия факултет на Софийския университет (ХФ СУ) беше създадена „Национална методична лаборатория по ЕПР спектроскопия“, включваща както личния състав, така и техниката на ХФ СУ и ИОХ БАН. Задачите на тази лаборатория бяха посредством интегриране да спомогне за развитието на метода и със сервизна и консултантска дейност да се популяризират изследванията в страната. Предвид отредената специфична роля на Националната методична лаборатория достиженията ѝ ще бъдат разгледани обстойно по-долу.

1972 г.

Централната лаборатория по биофизика БАН закупи един спектрометър, работещ в X-диапазона, произведен в Института по научна апаратура на бившата Германска демократична република. Спектрометърът бе използван

първоначално от Д. Кафалиева, а впоследствие и от М. Величкова и М. Бушева за решаване на специфични биофизични и биохимични проблеми.

1973 г.

Същият спектрометър беше закупен и за нуждите на Института по физика на БАН. С този спектрометър започна работа Ал. Малиновски. С това ерата на разработените в страната ни спектрометри, работещи в S-диапазона, завърши, но натрупаният опит в конструктивно и методично направление, както и създаденият кадрови потенциал, бе на значително високо ниво.

1975 г.

Институтът по химическа промишленост (ИХП) закупи един спектрометър от фирмата „Bruker“, модел ER420, за работа по свои тематики. С този спектрометър работеха Г. Гочев и Е. Ганева. В последствие Н. Йорданов бе привлечен като консултант към тази група.

1980 г.

Институтът по обща и неорганична химия на БАН закупи един ЕПР спектрометър от ГДР, работещ в X- и Q-диапазоните. С този спектрометър първоначално работеше С. Ангелов, а впоследствие към него се присъедини и Р. Стоянова. Спектрометърът беше използван за решаване на задачите на института.

1982 г.

Наличният JEOL инструмент в Националната методична лаборатория по ЕПР спектроскопия при ЕЦ по химия беше заменен със спектрометър на фирмата „Bruker“ (модел ER200 D SRC). В закупения комплект освен наличието на два микровълнови моста, работещи в X- и Q-диапазоните, бе включена и приставка за ЕНДОР (EN250) изследвания. Трябва да се отбележи, че по това време в кръг с радиус от около 1000 km и център София друга такава апаратура и специално ЕНДОР спектрометър нямаше, а в Западна Европа те бяха не повече от 5–8 на брой. Това състояние, специално в Източна Европа, се запази до около 1995 г.

1983 г.

От ИОХ БАН се отдели една част, която образува Институт по катализ (ИК) и лабораторията по ЕПР на ИОХ също беше включена в състава му.

1987 г.

ЕЦ по химия беше закрит. Този факт, обаче, не попречи на установените в рамките на Националната лабора-

тория по ЕПР спектроскопия връзки, контакти, взаимодействие и обслужване да съществуват и до настоящия момент (2007 г.).

ЕПР спектрометърът ER420 на ИХП беше подарен на Химическия факултет на Софийския университет. С него смениха работните си места и Г. Гочев и Е. Ганева. След една успешна серия от изследвания върху комплексите на хром(V) (проведени съвместно с П. Р. Бончев и М. Митева от ХФ на СУ), Ал. Малиновски промени интересите си и премина на работа в Института по електроника на БАН. Със спектрометъра продължи да работи К. Кабасанов от Централната лаборатория по слънчева енергия. Скоро след това, обаче, работата бе преустановена.

1991 г.

С. Ангелов от ИОНХ БАН, който работеше върху неорганични обекти, промени интересите си и премина на друга работа. Изследванията бяха успешно продължени и значително разширени от Р. Стоянова основно в две направления – изучаване структурата на твърдото тяло посредством „спинови сонди“ (Ni^{3+} , Co^{2+}) и „дефектни“ парамагнитни центрове, получени в резултат на обработка на материалите; изследване на интимните структурни особености на нови структурни разновидности на литий съдържащи материали, намиращи приложение като електроди за литиеви батерии.

Лабораторията по ЕПР спектроскопия при ИК БАН закупи със собствени средства един портативен ЕПР спектрометър (ADANI PS100-X) специално за извършване на рутинни изследвания, както и за обучение на студенти, дипломанти и докторанти.

По инициатива на същата лабораторията беше основано „Българско ЕПР дружество“.

1993 г.

ЕПР лабораторията при Института по биофизика на БАН бе закрыта и колежките работещи със спектрометъра се преориентираха към други изследвания.

Национална методична лаборатория по ЕПР спектроскопия

Националната методична лаборатория по ЕПР спектроскопия беше основната движеща сила в ЕПР изследванията в страната ни през изминалите години. В съответствие с нейния правилник тя трябваше да:

– извършва сервизни изследвания за нуждите на всички колеги от страната. В тази насока лабораторията изпълняваше по 3000–4000 анализа годишно;

– консултира всички желаещи колеги от страната по отношение на получени резултати или публикувани данни. Това се извършваше и се извършва и понастоящем без никаква облага за консултиращия;

ран“ ЕПР дозиметър [22]. При определянията с този вид дозиметри е възможно да се използват портативни ЕПР спектрометри, които работят с постоянен магнит, притежават силно опростен микровълнов източник и са евтини. Проектът беше финансиран от МААЕ. С тези дозиметри на два пъти беше проведен международен експеримент с участието на различен брой ЕПР лаборатории от чужбина и беше показано, че определенията могат да се правят с грешка до 3%. Впоследствие този подход беше значително разширен с използването на други съединения като радиационно чувствителни материали – захариди (Е. Георгиева, В. Ганчева), заместен и деутериран аланин, амониев тартарат и др. В последно време изследванията бяха разширени с използването и на УВ спектрометрия (Й. Каракирова).

1996 г. – Приложение на ЕПР спектрометрията за решаване на проблеми от околната среда

Изследванията са фокусирани върху анализа на пиролитни продукти (сажди и полициклични ароматни въглеводороди) във въздушни аерозоли; количествено определяне на нитрати и нитрити в зеленчуци, меса и месни продукти, млека и млечни продукти; изучаване на термично генерирани свободни радикали в храни (Р. Младенова) и др.

Българско ЕПР дружество

Българското ЕПР дружество беше учредено в края на 1991 г. непосредствено след Първата европейска ЕПР конференция (Падуа, Италия), където бе решено да се създаде Европейска федерация на ЕПР дружествата. То бе прието сред първите членове на Европейската федерация на ЕПР дружествата. През следващата година дружеството беше регистрирано в съда. Основната цел на Българското ЕПР дружество е да обедини всички колеги (учени, студенти, дипломанти, докторанти) от страната ни, ангажирани с ЕПР изследвания, да подпомогне развитието на ЕПР спектроскопията, да организира национални и международни научни срещи и др. Във връзка с това бе извършена следната дейност:

- беше създадена специализирана библиотека с книги по електронен магнитен резонанс;
- осигурено бе разпространение на информация между членовете на дружеството за предстоящи научни форуми по ЕПР, провеждани в чужбина, както и за научни форуми, състояли се в чужбина с български участници;
- проведена бе значителна организационна дейност.

1989 г.

В рамките на 26-тия „Колоквиум спектроскопикум интернационале“ като „пост-конференентен“ беше организиран международният симпозиум „Електронен магнитен резонанс на неподредени системи“ (EMARDIS). С това за първи път бе въведено наименованието *елек-*

тронен магнитен резонанс като събирателно на разнообразните методики, основани на резонансната абсорбция на енергия от парамагнитни вещества (ЕПР, ЕНДОР, ЕСЕ). По-нататък, този симпозиум е основната международна изява на Българското ЕПР дружество. Неговото десето (юбилейно) издание бе проведено през 2007 г.

1991 г.

В рамките на втория симпозиум EMARDIS беше организирана първата дискусия около кръглата маса „Стандарти в ЕПР спектрометрията“, с което се поставиха основите на международния семинар „Приложен ЕПР“. По-нататък тези две научни срещи бяха провеждани непосредствено една след друга на всеки две години.

1995 г.

Беше организиран Първият национален семинар „ЕПР и ЕНДОР спектроскопия“. За съжаление тази инициатива не намери поддръжници в следващите години по редица причини.

2001 г.

Беше решено организираният симпозиум EMARDIS да има две основни секции – „Фундаментална“ и „Приложна“, които да обхващат всички дискутирани до този момент проблеми.

Настояще и бъдеще на ЕПР спектроскопията у нас

В момента състоянието на ЕПР изследванията в България е критично, основна причина за което е остарялата апаратура. След 1993 г. останаха да функционират само три лаборатории. Две от тях – в ИОНХ БАН (ст.н.с. д-р Р. Стоянова) и в ХФ СУ „Св. Кл. Охридски“ (д-р Г. Гочев) – са с едночленен персонал и работят само по специфични проблеми.

Основният ЕПР център в страната ни остана лабораторията в Института по катализ на БАН, която бе и гръбнакът на Националната методична лаборатория по ЕПР спектроскопия в периода 1972–1982 г. За времето си, а и понастоящем, тази лаборатория разполагаше с най-добрата техника и добре подготвен екип и по тази причина и сега цялата активност остана фокусирана в нея. Апаратурата на тази лаборатория беше закупена през 1982 г. и през изминалите 25 години бе експлоатирана интензивно така, че понастоящем тя вече е не само морално, но и физически остаряла. Непрекъснатите ремонти, липсата на резервни части и финанси силно ограничават работата и ако в първите 15 години ежегодно се регистрираха по около 4000 спектъра на около 3000 проби, то в последните години тази бройка е спаднала до около 500–600 спектъра на около 300 проби.

Много от подготвяните в лабораторията специалисти и докторанти сега работят в Австрия, Белгия, Германия, САЩ, Швеция и др. страни.

Все пак има лъч на надежда, че започнатите преди около 45 години изследвания и натрупаният опит ще се запазят ако не напълно, то поне частично. Основание за това са следните факти. През настоящата година Тракийският университет закупи един ЕПР спектрометър (Bruker, модел EMXmicro). Лабораторията с ръководител дн В. Гаджева заедно с д-р А. Желева ще започне работа в началото на 2008 година като основните задачи ще бъдат свързани с биохимични и биомедицински проблеми. Предстои пускане в действие на един мобилен (Bruker, модел *e-scan*) спектрометър в Института по радиобиология и радиационна защита на Министерството на здравеопазването. С този спектрометър ще се извършват анализи по идентифициране на облъчени храни. Понастоящем се правят опити да се закупи един спектрометър и за лабораторията по ЕПР при ИК БАН. Ако този проект бъде финансиран, то може да се очаква, че в голяма степен спадът в изследванията в национален мащаб в последните 12–15 години ще се преодолее.

Литература

1. E. K. Zavoiskii, J. Phys. USSR 9 (1945) 211; 245.
2. F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, Phys. Rev. 69 (1946) 127; E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *ibid.* 69 (1946) 37.
3. G. Feher, Phys. Rev. 103 (1956) 834.
4. N. D. Yordanov, C. R. Acad. Bulg. Sci. 21 (1968) 111.
5. N. D. Yordanov, C. R. Acad. Bulg. Sci. 22 (1969) 61.
6. N. Bakurdjieva, N. Jordanov, C. R. Acad. Bulg. Sci. 20 (1967) 591; N. Bakurdjieva, N. Jordanov, *ibid.* 20 (1967) 719; N. Jordanov, N. Bakurdjieva, I. Ivanova, *ibid.* 20 (1967) 1325; N. Bakurdjieva, N. D. Yordanov, Commun. Inst. Physiol. Plants 26 (1970) 223.
7. Z. D. Raikov, E. T. Raikova, A. M., Zheleva, V. G. Gadzheva, "Spin-labeled Antitumour Compounds", JTS Design, Sofia, 2000.
8. N. D. Yordanov, V. Alexiev, Proc. 20 Int. Conf. Coord. Chem., Toulouse, France, 1980, p. 193; N. D. Yordanov, V. Alexiev, J. Macicek, T. Glowiak, D. R. Russell, Transit. Metal Chem. 8 (1983) 257; N. D. Yordanov, V. Alexiev, Ch. Malakova, A. Shishkov, Transit. Metal Chem. 8 (1983) 210.
9. N. D. Yordanov, V. Terziev, B. G. Zhelyazkova, Inorg. Chim. Acta 58 (1982) 213; N. D. Yordanov, V. Iliev, D. Shopov, A. Jezierski, B. Jezowska-Trzebiatowska, *ibid.* 60 (1982) 9; N. D. Yordanov, V. Iliev, D. Shopov, *ibid.* 60 (1982) 17.
10. N. D. Yordanov, M. Zdravkova, Proc. 22 Congress Ampere, Zurich, 1984, p. 612; N. D. Yordanov, M. Zdravkova, Chem. Phys. Lett. 124 (1986) 191.
11. B. M. Hoffman, J. Martinsen, R. A. Ventres, J. Magn. Resonance 59 (1984) 110; *ibid.* 62 (1985) 537; B. M. Hoffman, R. J. Gurbiel, J. Magn. Resonance 82 (1989) 309.
12. G. C. Hurst, T. A. Henderson, R. W. Kreilich, J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 7294.
13. N. D. Yordanov, Chem. Phys. Lett. 107 (1984) 457.
14. N. D. Yordanov, M. Zdravkova, C. R. Acad. Bulg. Sci. 43 (1990) 53; N. D. Yordanov, M. Zdravkova, J. Mol. Liq. 53 (1992) 103; N. D. Yordanov, M. Zdravkova, Polyhedron 12 (1993) 635.
15. N. D. Yordanov, L. M. Antov, Appl. Magn. Resonance 14 (1998) 323; N. D. Yordanov, L. M. Antov, Bull. Polish Acad. Sci. 48 (2000) 355.
16. N. D. Yordanov, M. Mihaylov, P. O'Brien, Polyhedron 17 (1998) 3501.
17. N. D. Yordanov, A. Dimitrova, D. Roussanova, Spectrochim. Acta Pt. A-Mol. Biomol. Spe. 58 (2002) 1155.
18. N. D. Yordanov, A. Dimitrova, Inorg. Chem. Commun. 8 (2005) 113; N. D. Yordanov, A. Dimitrova, Z. anorg. allg. Chem. 631 (2005) 956.
19. N. D. Yordanov, Appl. Magn. Resonance 6 (1994) 241.
20. N. D. Yordanov, M. Ivanova, Appl. Magn. Resonance 6 (1994) 333.
21. N. D. Yordanov, V. Gancheva, Appl. Radiat. Isot. 52 (2000) 195.
22. N. D. Yordanov, V. Gancheva, J. Radioanal. Nucl. Chem. 240 (1999) 215; N. D. Yordanov, V. Gancheva, J. Radioanal. Nucl. Chem. 245 (2000) 323.
23. N. D. Yordanov, S. Lubenova, S. Sokolova, Atmos. Environ. 35 (2001) 827; N. D. Yordanov, E. Novakova, S. Lubenova, Anal. Chim. Acta 437 (2001) 131.