

Gaschromatographische Bestimmung des Serumcholesterins

Von H.-CH. CURTIUS und W. BÜRGI
Technische Assistenz K. KELLER

*Aus dem Chemischen Laboratorium der Universitäts-Kinderklinik Zürich (Direktor: Prof. Dr. A. Prader)
und dem Zentrallaboratorium des Kantonsspitals Aarau, Schweiz*

(Eingegangen am 26. Juli 1965)

In der vorliegenden Arbeit wird eine leicht durchführbare Methode für die gaschromatographische Bestimmung von Serumcholesterin beschrieben. Sie kann als Referenzmethode für das gesamte und freie Cholesterin herangezogen werden. Außerdem ist sie für alle jene Fälle zu empfehlen, in denen die Esterquote bestimmt werden muß. Die gaschromatographische Analyse wurde mit zwei herkömmlichen photometrischen Methoden verglichen.

An easily operated method for the gas chromatographic determination of serum cholesterol is described. It can be quoted as a reference method for the total and free cholesterol. Furthermore, it can be recommended for all cases where the ester value must be measured. The gas chromatographic analysis was compared with two customary photometric methods.

Für die klinische Routinebestimmung des Serumcholesterins sind heute verschiedene Methoden in Gebrauch. Sie können in zwei Gruppen eingeteilt werden, nämlich Fällung des Cholesterins als Digitonid (1, 2) und direkte Bestimmung im Serum ohne Extraktion oder Enteiweißung (3). Bei der ersten Bestimmungsart werden durch Behandlung mit Digitonin sämtliche 3- β -Hydroxysterioide, von denen das Cholesterin den weitaus größten Teil ausmacht, gefällt. So werden neben Cholesterin vor allem Cholestanol, Koprostanol, Desmosterol (Dehydro-Cholesterin) und Lathosterol (Δ^7 -Cholestanol) von der Reaktion erfaßt. In der Regel wird mit Hilfe der *Liebermann-Burchard*'schen Reaktion das Cholesterin-Digitonid in einen grünen Farbkomplex übergeführt, der nach der Methode von *SCHOENHEIMER* und *SPERRY* und *SPERRY* und *WEBB* (1, 2) photometrisch gemessen wird. Diese Methode ist zeitraubend, außerordentlich heikel und deshalb als Routinebestimmung ungeeignet, obwohl sie bei Beachtung sämtlicher Vorichtsmaßnahmen reproduzierbare Werte liefert.

Bei der direkten photometrischen Bestimmung des Cholesterins wird die *Liebermann-Burchard*'sche Reaktion, d. h. die Sulfurierung des Steroidmoleküls, ohne vorherige Extraktion oder Fällung des Cholesterins am nicht enteiweißten Serum durchgeführt (3). Dabei werden sämtliche Steroidmoleküle und möglicherweise noch andere aromatische Verbindungen erfaßt. Die Methode eignet sich aber sehr gut für klinische Routinebestimmungen; sie liefert reproduzierbare Resultate und beansprucht im Vergleich zur erstgenannten Methode nur einen Bruchteil an Zeit. — Eine weitere Methode macht von der Bildung eines Farbkomplexes zwischen FeCl_3 und Cholesterin Gebrauch (4). Dabei reagieren alle phenolischen oder partiell phenolischen OH-Gruppen, u. a. das Cholesterin.

Allen diesen Methoden haftet jedoch der Nachteil einer gewissen Unspezifität an. Es kann aber unter bestimmten Verhältnissen notwendig werden, das Cholesterin *spezifisch* zu bestimmen. Dazu schien uns die Gaschromatographie, die in den letzten Jahren beträchtliche Fortschritte gemacht hat (5—10), die geeignetste Methode zu sein. Gaschromatographische Bestimmungen weisen

entscheidende Vorteile auf, nämlich hohe Spezifität, große Präzision und hohe Empfindlichkeit. In der vorliegenden Arbeit wird eine spezifische gaschromatographische Methode für die Serumcholesterinbestimmung beschrieben und anhand von fünfzig Seren mit der photometrischen Bestimmung des Cholesterins als Digitonid nach *SCHOENHEIMER* und *SPERRY* und *SPERRY* und *WEBB* verglichen (1, 2). Zur Abklärung der hierbei auftretenden Differenzen wurde anschließend der Digitonidniederschlag gaschromatographisch untersucht. — Die gaschromatographische Methode kann als Referenzmethode für die konventionellen kolorimetrischen Bestimmungen herangezogen werden. Die quantitative Erfassung der Esterquote, welche bisher nur durch die Digitonidfällung möglich war, wird ebenfalls stark vereinfacht. Die Methode stellt aber *keinen* Ersatz für die routinemäßig schneller durchführbare, direkte photometrische Bestimmung (3) des Gesamtcholesterins dar.

Methodik

Geräte

Für die photometrische Cholesterinbestimmung

Spektralphotometer Eppendorf; Laborzentrifuge; Thermostatisiertes Wasserbad für eine Arbeitstemperatur zwischen 25—60°; Wärmeschrank für eine Arbeitstemperatur von 110°; Konstriktionspipetten, z. B. *Kalsberg*-Pipetten; Zentrifugengläser, unten spitz auslaufend; Glycerinbad für eine Arbeitstemperatur von 110°.

Für die gaschromatographische Cholesterinbestimmung

Thermostatisiertes Bad für eine Arbeitstemperatur von 60°; Exsikkator mit P_2O_5 als Trocknungsmittel; Laborzentrifuge; „F 20“ Fraktometer der Firma Perkin-Elmer mit Flammenionisationsdetektor; „SE 30“ Chromatographiesäule von 1 m Länge und 2 mm I. D.; Hamilton Mikrospritzen 10 μl , auf 0,1 μl graduert.

Chemikalien

Aceton, z. B. Fluka, Art. Nr. A 50045
Äthanol, z. B. Fluka, Art. Nr. A 50231 puriss.
Äther, z. B. Fluka, Art. Nr. A 52689 puriss.
Chloroform, z. B. Merck, Art. Nr. 2445 p. a.
Cholesterin, z. B. Merck, Art. Nr. 3670
Cholestan, z. B. Aldrich, Art. Nr. C 7420 puriss.
Digitonin, z. B. Fluka, Art. Nr. A 53189
Eisessig, z. B. Merck, Art. Nr. 9058 p. a.
Essigsäureanhydrid, z. B. Merck, Art. Nr. 42 p. a.

Hexamethyldisilazan, z. B. Fluka, Art. Nr. 54429
 Methanol, z. B. Merck, Art. Nr. 6009 p. a.
 Natriumhydroxyd, z. B. Merck, Art. Nr. 6496
 Phenolphthalein Indikator, z. B. Fluka, Art. Nr. 56597
 Schwefelsäure konz., z. B. Merck, Art. Nr. 731 p. a.
 Trimethylchlorsilan, z. B. Fluka, Art. Nr. A 57998.

Reagenzien

Standardlösungen: Je 50, 100, 125, 150, 200, 250, 300 mg Cholesterin in Äthanol ad 100 ml.

Digitoninlösung: 5 g Digitonin in Äthanol ad 500 ml, mit H₂O dest. ad 1000 ml.

Methanolische Natronlauge: 8 ml Methanol + 0,5 ml 30-proz. NaOH; täglich frisch herstellen.

Liebermann-Burchard-Reagenz: 9,5 ml Essigsäureanhydrid (eiskühlt) + 0,5 ml Schwefelsäure konz. (Zimmertemperatur). Dieses Reagenz ist sehr wasserempfindlich. Vor jedem Gebrauch frisch zubereiten.

Lösung zur Bestimmung des Umrechnungsfaktors:

für Makromethode: 50 mg Cholestan + 50 mg Cholesterin in Chloroform ad 100 ml.

für Mikromethode: 10 mg Cholestan + 10 mg Cholesterin in Chloroform ad 100 ml.

Innerer Standard:

für Makromethode: 50 mg Cholestan in Chloroform ad 100 ml.
 für Mikromethode: 10 mg Cholestan in Chloroform ad 100 ml.
 5-proz. äthanolische Phenolphthaleinlösung; Extraktionslösung: Aceton-Äthanol 1 : 1; Waschlösung: Aceton-Äther 1 : 2; Essigsäure 10%; Testpackung Cholesterin Schweizerhall (Chemische Fabrik Schweizerhall).

Arbeitsvorschrift

Photometrische Cholesterinbestimmung

Digitonidfällung nach SCHOENHEIMER und SPERRY und SPERRY und WEBB (1, 2)

Extraktion: 5,0 ml Aceton-Alkohol und 0,3 ml Serum (Konstriktionspipetten) im Doppel in Zentrifugengläsern mit spitzem Boden ansetzen, gut schütteln oder mit Glasstab rühren, 6 Min. im Wasserbad bei 60° halten, auf Zimmertemperatur abkühlen lassen und 10 Min. bei geringer Tourenzahl zentrifugieren. Der Überstand wird für freies und für Gesamtcholesterin verwendet.

Digitonidfällung des freien Cholesterins: Zu 4 ml Überstand werden nacheinander 3 ml Digitoninlösung und 1 Tropfen Phenolphthaleinlösung in ein Zentrifugenglas pipettiert. Bei Zimmertemperatur läßt man über Nacht stehen. Nach 20 Min. Zentrifugieren bei höchster Umdrehungszahl wird der Überstand sorgfältig abgegossen und das Zentrifugenglas mit der Öffnung nach unten auf ein Filterpapier gestellt.

Verseifung und Digitonidfällung des Gesamtcholesterins: In ein spitzes Zentrifugenröhrchen 2 ml des bei der Extraktion erhaltenen Überstandes und 0,3 ml methanolische Natronlauge geben, schütteln oder rühren, 45 Min. offen in ein Wasserbad von 45° stellen, abkühlen und mit einem Tropfen Phenolphthaleinlösung versetzen und mit 10-proz. Essigsäure bis zum Verschwinden der violetten Färbung (etwa 4 Tropfen) neutrali-

sieren. Die innere Wandung des Röhrchens ist mit 3 ml Aceton-Alkohol nachzuwaschen. Nun gibt man 3 ml Digitoninlösung hinzu, schüttelt gut und läßt über Nacht stehen. Anschließend wird wie beim freien Cholesterin 20 Min. bei höchster Tourenzahl zentrifugiert, der Überstand sorgfältig abgegossen und das Zentrifugenglas mit der Öffnung nach unten auf ein Filterpapier gestellt.

Auswaschen des Digitonidniederschlags: Das Präzipitat wird mit 3 ml Aceton-Äther gewaschen und wieder maximal zentrifugiert, der Überstand mit der Saugpumpe bis auf etwa 1/2 ml abgesaugt und das Zentrifugat mit 3 ml Äther überschichtet, wobei vermieden werden muß, daß der Digitonid-Niederschlag aufgewirbelt wird. Der überstehende Äther wird sorgfältig abgesaugt.
Liebermann-Burchard'sche Reaktion: Die Präzipitate vom gesamten und freien Cholesterin werden anschließend zwei bis drei Stunden im Wärmeschrank bei 110° getrocknet. Zum Rückstand gibt man 3 ml Eisessig. Nun wird das Gemisch in ein Glycerinbad von 110° gestellt, nach 3 Min. herausgenommen und abgekühlt. Nach Zugabe von 3 ml *Liebermann-Burchard*-Reagenz wird das Reaktionsgemisch mit einem schwarzen Tuch zugedeckt und 30 Min. in ein Wasserbad von 25° gestellt. Es ist wichtig, daß das *Liebermann-Burchard*-Reagenz eiskalt zugegeben und das Zentrifugenglas sofort nach Durchmischung ins Wasserbad gestellt wird. — Photometriert wird bei 610 m μ gegen Wasser als Leerwert.

Eichkurve: Zu 5 ml Aceton-Alkohol 0,3 ml Testlösung geben und gut schütteln. 2 ml der Mischung zu 3 ml Aceton-Alkohol pipettieren und 3 ml Digitoninlösung dazugeben. Das Gemisch gut schütteln, über Nacht stehen lassen, anschließend 20 Min. bei höchster Umdrehungszahl zentrifugieren, den Überstand sorgfältig abgießen und das Zentrifugenglas mit der Öffnung nach unten auf ein Filterpapier stellen. Das Auswaschen des Niederschlags und die *Liebermann-Burchard*'sche Reaktion erfolgen wie beim freien und Gesamtcholesterin.

Berechnung: Die Cholesterinwerte können aus den Extinktionen an der Eichkurve abgelesen werden. Beim freien Cholesterin muß man die erhaltenen Werte halbieren, da 4 ml Überstand eingesetzt wurden.

Direkte photometrische Bestimmung des Cholesterins

Die direkte photometrische Bestimmung des Cholesterins wurde nach der Methode von RICHTERICH und LAUBER durchgeführt (3) (Testpackung Schweizerhall).

Gaschromatographische Cholesterinbestimmung

Extraktion: Zu 5 ml Aceton-Alkohol 0,3 ml Serum zugeben, 6 Min. im Wasserbad von 60° unter periodischem Rühren oder Schütteln extrahieren und anschließend zentrifugieren. Vom Überstand werden je 2 ml für das freie, bzw. das Gesamtcholesterin, herauspipettiert.

Vorbereitung zur Gaschromatographie des freien Cholesterins: Die 2 ml Überstand werden im Luftstrom bei 50° abgedampft und im Exsikkator über P₂O₅ während 15 Min. getrocknet. Der getrocknete Rückstand wird in 0,2 ml einer 50 mg-proz. Lösung von Cholestan in Chloroform aufgenommen. Diese Lösung wird anschließend gaschromatographiert.

Vorbereitung zur Gaschromatographie des Gesamtcholesterins: Die 2 ml Überstand werden nach Zugabe von 0,3 ml methanolischer Natronlauge 45 Min. im Wasserbad von 45° verseift. Nachdem 2 ml aqua dest. zugegeben worden sind, schüttelt man mit 10 ml Äther aus. 5 ml dieses Ätherextraktes werden am Luftstrom abgedampft, im Exsikkator 15 Min. über P₂O₅ getrocknet und so weiterbehandelt, wie es oben für das freie Cholesterin beschrieben wurde.

Trennsäulenbedingungen: Der Einspritzblock wurde auf einer Temperatur von 275° und die Säulentemperatur auf 240° isotherm gehalten. Wenn nicht speziell vermerkt, wurde der Trägergasdurchfluß mit N₂ auf 35 ml/Min. eingestellt.

Berechnung: Bei substanzfremdem internen Standard errechnet sich die Konzentration der gesuchten Substanz nach folgender Formel:

$$\text{mg \% Chol.} = \frac{\text{mg \% St} \cdot \text{Hx}}{\text{HSt}} \cdot \text{F}$$

mg % St = Konzentration des internen Standards (Cholestan)
 Hx = Peakhöhe des Cholesterins
 HSt = Peakhöhe des internen Standards (Cholestan)
 F = Umrechnungsfaktor (= Cholestan/Cholesterin)

Eine 50 mg-proz. Lösung von Cholestan und Cholesterin wird in den Gaschromatographen injiziert und der Faktor aus dem Quotienten der Peakhöhen Cholestan/Cholesterin errechnet. — Unter Berücksichtigung der Verdünnung und Konzentrationen lautet in unserem Fall die Formel für das *Gesamtcholesterin*

$$\text{mg \% Chol.} = \frac{\text{mg \% St} \cdot \text{Hx} \cdot \text{F}}{\text{HSt}} \cdot \frac{5,3}{2} \cdot \frac{0,2}{0,3} \cdot 2$$

und für das *freie Cholesterin*

$$\text{mg \% Chol.} = \frac{\text{mg \% St} \cdot \text{Hx} \cdot \text{F}}{\text{HSt}} \cdot \frac{5,3}{2} \cdot \frac{0,2}{0,3}$$

Mikrolitermethode: Unter Herabsetzung sämtlicher Volumina auf ein Zehntel kann die Methode auch im Mikromaßstab durchgeführt werden.

Gaschromatographische Trennung des Diginitonidniederschlags

Spaltung des Diginitonin-Cholesterin-Komplexes: Um den Diginitonin-Cholesterin-Komplex zu spalten, löst man die gewaschenen und getrockneten Diginitonidniederschläge in 2 ml Pyridin abs. auf und läßt die Lösung bei 70° über Nacht stehen. Das Diginitonin wird mit Äther ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird eingedampft und im Exsikkator während 2 Stdn. über P₂O₅ vollständig getrocknet.

Herstellung der Silyläther: 3 ml Hexamethyldisilazan werden mit 0,1 ml Trimethylchlorosilan gemischt. Die getrocknete Probe löst man in 0,5 ml Silylierungsgemisch auf und stellt sie in einem geschlossenenen Schliffglas während einer Stunde in einen Wärmeschrank von 60°. Anschließend wird das Silylierungsgemisch mit absolut getrocknetem Stickstoff abgedampft und der Rückstand in 0,1 ml Hexan aufgenommen. Diese Lösung wird in den Gaschromatographen injiziert.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt eine Testreihe von 50, 100 und 125 mg% Cholesterin. Aus der Abbildung geht hervor, daß eine lineare Beziehung zwischen Peakhöhe und Konzentration besteht. Der getestete Bereich erstreckt sich von 50—600 mg% Cholesterin. Aus dem Serumextrakt mit dem Cholesterin und dem zugefügten inneren Standard wurde ein Chromatogramm erhalten, wie es in Abbildung 2 zu sehen ist. In der Tabelle 1 sind die Werte von 20 mit der photometrischen (nach SCHOENHEIMER/SPERRY und SPERRY/WEBB (1, 2)) und der gaschromatographischen Methode untersuchten Seren dargestellt. Es wurden 30 weitere Vergleichsbestimmungen ausgeführt, die die Resultate der angeführten Tabelle bestätigen.

Werden die photometrisch erhaltenen Werte als 100% angenommen, liegt das gaschromatographisch ermittelte Gesamtcholesterin in allen Seren mit ziemlicher Regelmäßigkeit — 5% tiefer. Das arithmetische Mittel der Differenzen wurde auf — 5,0% errechnet. Für das freie Cholesterin wurden durchschnittlich 6% höhere Werte erhalten. Tabelle 2 zeigt einen Vergleich zwischen der direkten photometrischen Bestimmung von Cholesterin (3), der Diginitoninmethode (1, 2) und der gaschromatographischen Methode. Aus den Resultaten geht hervor, daß die direkte photometrische Methode im Durchschnitt nochmals 8% höhere Werte liefert.

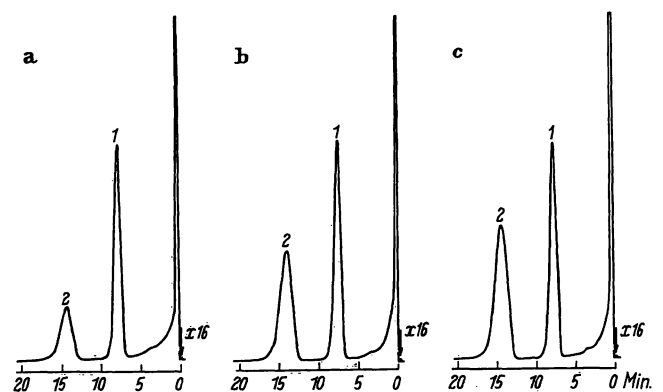


Abb. 1

Eichchromatogramme für Cholesterin

Gerät: Fraktometer F-20 (Perkin-Elmer) 2 m Glassäule (i. D. 2,7 mm) mit 3% SE-30 auf Gaschrom P.

Trägergas: Stickstoff 40 ml/Min.

Temperatur: Ofen 240°; Verdampfer 275°.

Probe: Lösung in 2,4 µl Chloroform, 1 = Cholestan als Standard, 2 = Cholesterin a) 50 mg%; b) 100 mg%; c) 125 mg% Cholesterin

Tab. 1
Vergleichswerte der Gaschromatographie mit der Cholesterinmethode von SCHOENHEIMER/SPERRY und SPERRY/WEBB

Serum Nr.	Gesamtcholesterin			Freies Cholesterin		
	Digitoninmethode	Gaschromat.	Diff. %	Digitoninmethode	Gaschromat.	Diff. %
1	314	284	- 9	105	106	+ 1
2	222	209	- 5	61	63	+ 3
3	84	74	- 12	24	24	0
4	113	99	- 12	41	40	- 2
5	150	137	- 8	45	43	- 4
6	180	170	- 6	45	49	+ 9
7	200	195	- 3	49	56	+ 14
8	90	85	- 6	50	54	+ 8
9	177	175	- 1	56	64	+ 14
10	120	112	- 7	38	41	+ 8
11	140	135	- 4	35	37	+ 6
12	153	150	- 1	45	47	+ 4
13	156	146	- 6	40	40	0
14	207	191	- 8	48	51	+ 6
15	232	213	- 8	53	59	+ 11
16	109	98	- 10	35	36	+ 3
17	150	144	- 4	45	46	+ 2
18	133	126	- 5	60	61	+ 2
19	59	56	- 5	30	29	- 3
20	156	146	- 6	40	40	0

Wert von Digitonin-Methode = 100%. Die Bestimmungen mit der Digitonin-Methode wurden im Doppel ausgeführt; tolerierte Abweichung 5 mg%.

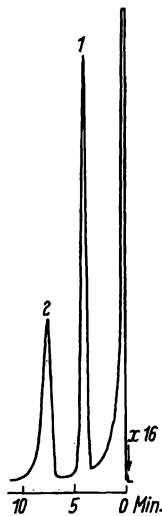


Abb. 2

Analyse von Cholesterin im Serum

Gerät: Fraktometer F-20 (Perkin-Elmer) 1 m Glassäule, (i. D. 2,0 mm) mit 3% SE-30 auf Gaschrom P.

Trägergas: Stickstoff 35 ml/Min.

Temperatur: Ofen 240°; Verdampfer 275°.

Probe: Lösung in 2,0 µl Chloroform 1 = Cholestan als Standard, 2 = Cholesterin

Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen wurden zwei photometrische und eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung des Serumcholesterins miteinander verglichen. — Die Methode von SCHOENHEIMER und SPERRY und SPERRY und WEBB (1, 2) wurde bisher als Referenzmethode verwendet. Bei der Digitonid-fällung werden sämtliche 3-β-Hydroxysterioide erfaßt,

Tab. 2
Vergleichswerte der Gaschromatographie mit der Cholesterinmethode von SCHOENHEIMER/SPERRY und SPERRY/WEBB und der direkten Methode nach RICHTERICH/LAUBER

Serum Nr.	Direkte Methode mg %	Diff. %	Digitonin-Methode mg %	Gaschromatographie mg %	Diff. %
1	114	+ 5	109	98	- 10
2	122	+ 9	112	104	- 8
3	69	+ 17	59	56	- 5
4	154	+ 3	150	144	- 4
5	394	+ 3	382	377	- 1
6	242	+ 4	232	213	- 8
7	165	+ 8	157	145	- 8
8	147	+ 11	133	126	- 5
9	134	+ 16	116	110	- 5
10	272	+ 5	260	258	- 1

Wert von Digitonin-Methode = 100%; die Bestimmungen mit der Digitonin-Methode wurden im Doppel ausgeführt. Tolerierte Abweichung 5 mg%.

von denen im menschlichen Serum das Cholesterin den weitaus größten Teil ausmacht. Bei der direkten photometrischen Methode (3) hingegen werden sämtliche Steroidmoleküle sulfuriert und tragen zur Liebermann-Burchard'schen Farbreaktion bei. Hierdurch erklären sich die höheren Resultate. Wie zu erwarten war, liegen die effektiven Werte bei einer spezifischen Methode wie der Gaschromatographie niedriger. Tatsächlich beträgt die Differenz zwischen den Resultaten der Gaschromatographie und denjenigen der Digitonidfällung beim Gesamtcholesterin 5%. Beim freien Cholesterin sind

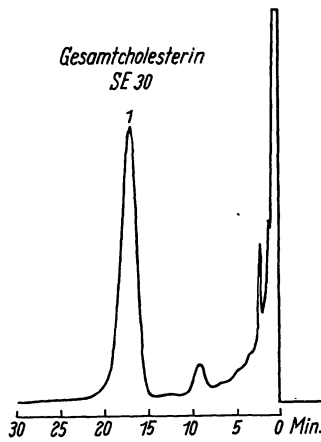


Abb. 3

Gerät: Fraktometer F-20 (Perkin-Elmer) 1 m Glassäule (i. D. 2,0 mm) mit 3% SE-30 auf Gaschrom P.
 Trägergas: Stickstoff 40 ml/Min.
 Temperatur: Ofen 215°; Verdampfer 265°.
 Probe: 0,7 μ l x = 4, 1 = Cholesterin

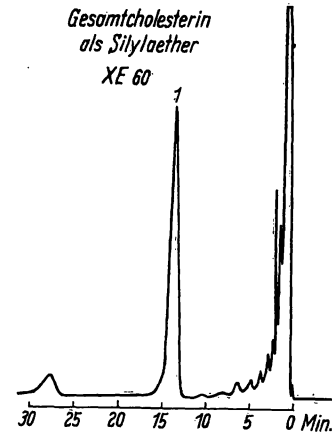


Abb. 4

Gerät: Fraktometer F-20 (Perkin-Elmer) 2 m Glassäule (i. D. 2,7 mm) mit 4% XE-60 (Nitrilsilikonöl) auf Gaschrom P.
 Trägergas: Stickstoff 40 ml/Min.
 Temperatur: Ofen 230°; Verdampfer 280°.
 Probe: 1 μ l x = 4, 1 = Cholesterin

die Werte bei der Gaschromatographie durchschnittlich 6% höher als diejenigen der photometrischen Methode (1, 2).

Um die Zusammensetzung des Digitonidniederschlages gaschromatographisch zu erfassen, wurde der Cholesterin-Digitonid-Komplex mit Pyridin gespalten und nach Ausfällung des Digitonins mit Äther unter Standardbedingungen erneut gaschromatographiert. Aus dem Gaschromatogramm der Abbildung 3 ist ersichtlich, daß neben dem Cholesterin noch andere, bis jetzt

nicht identifizierte, Substanzen von der Digitonid-fällung erfaßt werden. Unter besonderen Bedingungen (2 m lange Trennsäule, 2,7 mm I. D., mit 4% „XE-60“, bei einer Ofentemperatur von 230°, als Silyläther) kann eine bessere Trennung der vom Digitonid gefällten Steroide erreicht werden. Wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist, treten mehrere Nebenkomponenten auf, von denen eine besonders hervorsteht, und die zusammen für den 5-proz. Unterschied verantwortlich sind.

Literatur

- SCHÖNHEIMER, R. und W. M. SPERRY, *J. biol. Chemistry* 106, 745 (1934).
- SPERRY, W. M. und M. WEBB, *J. biol. Chemistry* 187, 97 (1950).
- RICHTERICH, R. und K. LAUBER, *Klin. Wschr.* 40, 1252 (1962).
- ZAK, B., R. C. DICKENMAN, E. G. WHITE, H. BURNETT und P. J. CHERNEY, *Amer. J. clin. Path.* 24, 1307 (1954).
- WOTIZ, H. H. und H. F. MARTIN, *J. biol. Chemistry* 236, 1312 (1961).
- VANDENHEUVEL, W. J. A., C. C. SWEELEY und E. C. HORNING, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 3481 (1960).
- VANDENHEUVEL, W. J. A., B. G. CREECH und E. C. HORNING, *Analyt. Biochem. (New York)* 4, 191 (1962).
- LIPSKY, S. R. und R. A. LANDOWNE, *Analytic. Chem.* 33, 818 (1961).
- KANAI, M., *J. Biochemistry (Tokoyo)* 56, 266 (1964).
- CAPELLA, P. und VANDENHEUVEL, W. J. A., *Analytic. Biochem. (New York)* 10, 377 (1965).

Dr. H.-Ch. Curtius
 8032 Zürich (Schweiz)
 Steinwiesstr. 75