

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 403–407

Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum

Von P. Röschlau, E. Bernt und W. Gruber

Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica Werk Tutzing

(Eingegangen am 10. April/13. Juni 1974)

Eine einfache enzymatische Methode zur Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum wird beschrieben. Die im Serum vorhandenen Cholesterinester werden mittels Cholesterinesterase quantitativ in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das freie Cholesterin wird in Gegenwart von Sauerstoff und Cholesterinoxidase in Δ^4 -Cholestenon umgewandelt. Das bei dieser Reaktion entstehende Wasserstoffperoxyd oxydiert bei Anwesenheit von Katalase Methanol zu Formaldehyd. Dieses reagiert mit Ammoniumionen und Acetylaceton unter Bildung von 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin, dessen Farbintensität bei 405 nm gemessen wird. Richtigkeit und Präzision der Methode sind sehr gut. Die Proportionalität ist bis 25,85 mmol Cholesterin/l Serum gegeben. Serumproteine, Bilirubin, Creatinin, Hämoglobin und Pharmaka stören nicht.

Enzymatic determination of total cholesterol in serum

A simple, enzymatic method for the determination of total cholesterol in serum is described. All cholesterol esters in the serum are split quantitatively into free cholesterol and fatty acids by cholesterol esterase. In the presence of oxygen, the free cholesterol is converted by cholesterol oxidase into Δ^4 -cholestenone. The hydrogen peroxide produced in this reaction oxidizes methanol to formaldehyde in the presence of catalase. The formaldehyde reacts with ammonium ions and acetylacetone to form 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine, which is determined colorimetrically at 405 nm. The accuracy and precision of this method are very good. Proportionality is achieved up to 25.86 mmol cholesterol/l serum. Serum proteins, bilirubin, creatinine, hemoglobin and drugs do not interfere.

Die Cholesterin-Bestimmung im Serum ist für die klinische Diagnostik von größter Bedeutung, gehört doch die Hypercholesterinämie zu den wesentlichen Risikofaktoren der Arteriosklerose und deren Folgeerscheinungen, jenen Zivilisationskrankheiten, die den ersten Platz unter den Ursachen für Tod und Invalidität einnehmen (1–3).

Cholesterin kommt im Blut in relativ hoher Konzentration vor. Es ist normalerweise zu etwa 75 % mit Fettsäuren verestert und aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit an Lipoproteine gebunden (4). Diagnostisch von Bedeutung ist vor allem die Bestimmung des Gesamt-Cholesterins, d. h., der Summe des freien und veresterten Cholesterins (5).

Die bisher gebräuchlichen Verfahren zur Bestimmung des Cholesterins sind chemische Methoden basierend auf den Arbeiten von Salkowski (6), Liebermann (7) und Burchard (8), in den Modifikationen nach Zlatkis (9) bzw. Watson (10). Alle diese Methoden sind nicht spezifisch, besitzen eine große Fehlerbreite und werden bereits durch geringe Feuchtigkeitsmengen empfindlich gestört (5). So täuschen z. B. 0,17 mmol/l Bilirubin eine Erhöhung der Cholesterin-Konzentration um etwa 0,78 mmol/l Serum vor. Der Hauptnachteil dürfte jedoch in der Verwendung von stark ätzenden Reagenzien, wie konzentrierter Schwefelsäure, Essigsäureanhydrid und Essigsäure, liegen.

Es ist daher nicht verwunderlich, daß auf dem III. Internationalen Symposium über Arteriosklerose 1973 in Berlin, nachdrücklich eine verbesserte Cholesterin-Analytik gefordert wurde. Aufgrund der Erfahrungen bei Glucose und Harnsäure im Rahmen der klinischen Diagnostik, bei denen mit Erfolg unspezifische, störanfällige, chemische Nachweismethoden durch spezifische, enzymatische abgelöst wurden, haben wir versucht, eine enzymatische Cholesterin-Bestimmung zu entwickeln, die möglichst alle Wünsche hinsichtlich Zuverlässigkeit und Handhabung erfüllen sollte. Die halb-enzymatische Cholesterin-Bestimmung, d. h., alkalische Verseifung der Cholesterinester mit anschließender Bestimmung des freien Cholesterins mittels Cholesterinoxidase, wurde erstmals von Richmond (11, 12), Flegg und Whitehead (13, 14) und Röschlau et al. (15) beschrieben. Der Nachteil dieser Methode liegt in der arbeitsaufwendigen und störanfälligen Verseifung (16) sowie bei manchen Methoden in der notwendigen, aber umständlichen Entfernung der bei der alkalischen Hydrolyse entstehenden reduzierenden Substanzen (12).

Wir haben uns daher um die Entwicklung einer Methode zur vollenzymatischen Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum bemüht. Die Cholesterinester sollten enzymatisch auf schonende und einfache Weise in freies Cholesterin überführt werden.

Material und Methoden

Cholesterin-oxydase aus *Nocardia erythropolis*, Cholesterin-esterase aus Mikroorganismen, Katalase (EC 1.11.1.6), Preciset², Cholesterin, Precilip³) sowie die Biochemica Test Combination Cholesterin (chemische Methode), Best.-Nr.: 15949, wurden von Boehringer Mannheim GmbH, die einzelnen Cholesterinester sowie andere Steroid-Derivate von Ega Chemie (Steinheim), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (St. Louis/USA), Roth (Karlsruhe) und Schering AG (Berlin), Hydroxypolyäthoxydodecan bei Klinke (Hamburg), Cholesterin vom National Bureau of Standards (Washington/USA) bezogen.

Bestimmung der Cholesterin-oxydase-Aktivität bei 25° C

Zu 3,0 ml 0,5 mol/l Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5 (Sauerstoff-gesättigt), mit 0,4 % Hydroxypolyäthoxydodecan, werden 0,1 ml Cholesterin-Standard aus Preciset Cholesterin mit 10,34 mmol/l und 0,02 ml Cholesterin-oxydase (etwa 0,5 U/ml) gegeben, sofort gemischt, und die Bildung von Δ^4 -Cholestenon bei 240 nm ($\epsilon = 15,5 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) (15) als Extinktionszunahme/min gemessen. Enzymkonzentration = $10,06 \cdot \Delta E/\text{min}$ [U/ml Probe-Lösung].

Bestimmung der Cholesterin-esterase-Aktivität bei 25° C

Zu 3,0 ml 0,5 mol/l Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5 mit 0,4 % Hydroxypolyäthoxydodecan, werden 0,05 ml Precilip und 0,02 ml Cholesterin-oxydase (etwa 50 U/ml) gegeben. Nachdem die Oxydation des freien Cholesterin abgelaufen ist, wird mit 0,02 ml Cholesterin-esterase-Lösung gestartet, und die Extinktionszunahme/min bei 240 nm gemessen.

Enzymkonzentration = $9,97 \cdot \Delta E/\text{Min}$. [U/ml Probe-Lösung]

Zur Überprüfung der *relativen Reaktionsgeschwindigkeiten* der verschiedenen Cholesterinester mit Cholesterin-esterase wurden jeweils 0,02 ml mit 0,03 μmol des jeweiligen Cholesterinesters zu 5,0 ml 0,5 mol/l Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0, der 0,1 % Hydroxypolyäthoxydodecan und 0,1 U Cholesterin-oxydase/ Test enthielt, gegeben. Die Reaktion wurde mit 0,2 U Cholesterin-esterase gestartet. Die Reaktionszeit bei 37° C betrug 6 min; gemessen wurde das gebildete Δ^4 -Cholestenon bei 240 nm (15). In dieser Zeit wurde Myristat als bestes Substrat vollständig gespalten.

Vorinkubation von Serum mit Cholesterin-esterase

0,2 ml Humanserum wurden zu 2,0 ml 0,5 mol/l Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5, mit 0,4 % Hydroxypolyäthoxydodecan, gegeben, mit 0,5–10,0 U Cholesterin-esterase versetzt und 20 h bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Halbenzymatische Cholesterin-Bestimmung: siehe l.c. (15).

Die *Cholesterin-Bestimmung* nach Liebermann-Burchard und die *Triglycerid-Bestimmung* wurden mit den Biochemica Test Combinationen von Boehringer Mannheim GmbH durchgeführt.

Cholesterin-Bestimmung nach Abell: siehe l.c. (4).

Vollenzymatische Cholesterin-Bestimmung

Die für den vollenzymatischen Cholesterin-Farbttest notwendigen Reagenzien¹⁾ werden in 4 verschiedenen Lösungen zusammengefaßt, deren Haltbarkeit bei + 4° C mindestens 9 Monate beträgt.

- Lösung 1: 0,6 mol/l Ammoniumphosphat-Puffer, pH = 7;
1,7 mol/l Methanol; ≥ 700 U/ml Katalase
Lösung 2: 0,42 mol/l Acetylaceton; 2,5 mol/l Methanol;
2,1 % Hydroxypolyäthoxydodecan
Lösung 3: ≥ 5 U/ml Cholesterin-esterase
Lösung 4: $\geq 2,5$ U/ml Cholesterin-oxydase

Aus 5 Teilen Lösung 1, 0,25 Teilen Lösung 2 und 0,02 Teilen Lösung 3 wird ein Cholesterin-Reagenz (Lösung 5) hergestellt, das bei + 4° C einen Monat, bei + 25° C eine Woche haltbar ist.

¹⁾ Biochemica Test Combination Cholesterin, enzymatischer Farbttest Boehringer Mannheim GmbH

Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 405–415 nm, z. B. Hg 405 nm in Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm; die Inkubationstemperatur ist 37° C.

Untersuchungsmaterial: Serum oder Plasma.

Pipettierschema:

Auf den Boden von Reagenzgläsern pipettieren:

	Proben-Leerwert	Probe
Probe	0,02 ml	–
Lösung 5 (Cholesterin-Reagenz)	5,00 ml	–

Inhalt der Reagenzgläser gut mischen

Lösung 4 (Cholesterin-oxydase)	–	0,02 ml
aus dem Reagenzglas des	–	2,50 ml
Proben-Leerwertes abpipettieren		

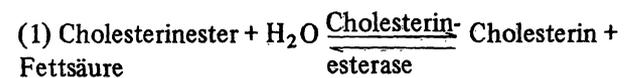
gut mischen, Proben-Leerwert und Probe mindestens 60 min bei 37° C inkubieren. Extinktion der Probe gegen Proben-Leerwert messen: E_{Probe}

Die Berechnung der Cholesterin-Konzentration erfolgt über einen mitgeführten Standard (Precimat Cholesterin) mit 5,17 mmol/l.

Ergebnisse und Diskussion

Cholesterin-esterase

Etwa 75 % des im Serum vorkommenden Cholesterins sind mit Fettsäuren verestert (4). *Beaucamp* et al. gelang es, aus Mikroorganismen eine Cholesterin-esterase zu isolieren (17), die alle im Serum vorkommenden Cholesterinester gemäß Gleichung (1) spaltet (s. Tab. 1).



Tab. 1. Relative Reaktionsgeschwindigkeiten der im Serum vorkommenden Cholesterinester mit Cholesterin-esterase

Cholesterinester	Vorkommen im Serum [% der Summe]	Relative Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf Linolat = 100
Myristat	1	100
Linolat	43	100
Stearat	3	100
Palmitoléat	6	100
Oleat	24	99
Linolenat	4	98
Palmitat	10	93
Arachidat	1	25
Arachidonat	6	7

Die Affinität des Enzyms zu den einzelnen Cholesterinestern ist zwar unterschiedlich, doch werden alle bei geeigneter Wahl der Versuchsbedingungen innerhalb von 15 min gespalten.

Für die quantitative Spaltung der Cholesterinester im Serum sind 0,1 U Cholesterin-esterase pro Bestimmung ausreichend. Eine Erhöhung der Cholesterin-esterase-Menge bis 1 U/Test oder eine Vorinkubation des Serums

mit diesem Enzym über 20 Stunden ergaben keine höheren Gesamt-Cholesterinwerte im Serum (s. Tab. 2). Vergleichsuntersuchungen, bei denen die Cholesterinester schonend mit äthanolischer KOH verseift wurden (15, 18), ergaben zur enzymatischen Verseifung übereinstimmende Werte (s. Tab. 2).

Tab. 2. Einfluß der Cholesterinesterase menge und Vorinkubationsdauer auf die enzymatische Cholesterinbestimmung in verschiedenen Seren. Vergleich zum halbenzymatischen Cholesterintest (Verseifung mit äthanolischer KOH).

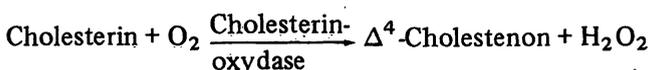
Serum	Gesamt-Cholesterin [mmol/l Serum]					Vorinkubationszeit [h]	
	halbenzymatisch	vollenzymatisch [U Cholesterinesterase/Test]					
		0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	
1	4,03	3,98	4,01	4,01	4,09	4,03	0
		4,11	4,09	4,11	4,16	4,09	20
2	6,78	6,72	6,72	6,85	6,88	6,80	0
		6,85	6,80	6,85	6,88	6,72	20
3	8,82	8,92	8,90	8,90	8,77	8,82	0
		8,84	8,77	8,72	8,92	8,92	20

Cholesterinoxydase

Zur Bestimmung des freien Cholesterins isolierten Holz et al. (19) aus Erdbakterien Cholesterinoxydasen, die 1970, als die Arbeiten begannen, in reiner Form noch nicht bekannt waren. Eines dieser Enzyme ist mittlerweile mit einer spezifischen Aktivität von 20 U/mg im Handel²⁾. Da neben Cholesterin in vergleichbaren Konzentrationen keine anderen Steroide im Serum vorkommen (20), ist diese Cholesterinoxydase zur enzymatischen Cholesterin-Bestimmung geeignet. Pro Bestimmung sind 0,1 U/Test dieses Enzyms ausreichend (siehe Richtigkeit).

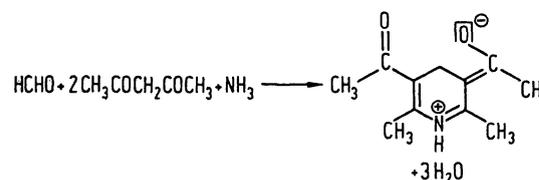
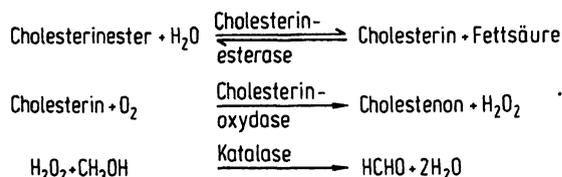
Testprinzip

Cholesterinoxydase oxydiert Cholesterin unter Sauerstoffverbrauch zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid:



Zur Ermittlung des freien Cholesterins empfehlen sich die Messung

- der Sauerstoffabnahme,
- des gebildeten Δ^4 -Cholestenons,
- des gebildeten Wasserstoffperoxids chemisch, enzymatisch über Peroxydase oder Katalase. Wir haben uns für die Bestimmung des Wasserstoffperoxids mittels Katalase nach folgendem Schema entschieden:



Die Farbintensität des gebildeten 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidins kann bei 405–415 nm gemessen werden.

Dieses Indikatorsystem ist für die enzymatische Bestimmung der Harnsäure verwendet worden (21) und hat sich bei Urica-quant³⁾ bewährt. Es zeichnet sich vor allem dadurch aus, daß

- es spezifisch ist;
- die Probe nicht entweißt werden braucht;
- Pharmaka nicht stören (22).

Es sind für den enzymatischen Cholesterin-Farbttest – analog dem enzymatischen Harnsäure-Farbttest – pro Bestimmung nur 4 Pipettierungen notwendig. Die Inkubationsdauer beträgt bei 37°C eine Stunde.

Die Berechnung kann über einen wäßrigen Cholesterin-Standard erfolgen. Ein Standard mit in Eisessig gelöstem Cholesterin ist ungeeignet, da innerhalb kurzer Zeit Cholesterinacetat gebildet wird (18, 23). Dies ist jedoch ein schlechtes Substrat der Cholesterinesterase.

Da es sich bei dem entstehenden Dihydrolutidin-Derivat um eine definierte Substanz handelt (24), ist es – auch nach den Erfahrungen bei Urica-quant – möglich, die Berechnung über einen Faktor durchzuführen.

Richtigkeit

Verschiedenen Seren zugesetztes, in Äthanol gelöstes Cholesterin wurde mit dem enzymatischen Cholesterin-Farbttest quantitativ wiedergefunden (s. Tab. 3). Die Richtigkeit der enzymatischen Cholesterin-Bestimmung

Tab. 3. Wiederfindung von Cholesterin in Humansen mit dem vollenzymatischen Cholesterin-Farbttest

Humanserum Cholesteringehalt [mmol/l]	Zugesetztes Cholesterin [mmol/l]	Gefundenes Gesamt-Cholesterin [mmol/l]	Wiederfindung [%]
0,88	12,93	13,85	100,3
0,88	25,86	25,58	99,4
5,79	12,93	18,65	99,5
5,79	25,86	31,68	100,1
11,47	12,93	24,30	99,2
11,47	25,86	36,31	96,1

²⁾ Boehringer Mannheim GmbH

³⁾ Boehringer Mannheim GmbH

Tab. 4. Einfluß der Triglyceridkonzentration auf den vollenzymatischen Cholesterin-Farbttest

Triglyceride [mmol/l]	Human-serum Cholesterin [mmol/l]	zugesezte Menge Cholesterin [mmol/l]	gefundene Menge Gesamt-Cholesterin [mmol/l]	Wiederfindung [%]
1,44	3,36	5,17	8,56	100,6
1,44	3,36	16,81	20,12	99,7
3,95	3,41	3,88	7,24	98,7
3,95	3,41	18,10	21,49	99,9
7,91	4,27	3,88	8,20	101,3
7,91	4,27	12,93	16,94	98,0

wird auch durch einen erhöhten Triglycerid-Gehalt des Serums, wie er bei den verschiedenen Typen der Hyperlipoproteinämien vorliegen kann, nicht beeinflusst (s. Tab. 4). Bilirubin (bis zu 0,34 mmol/l Serum), Creatinin (bis zu 4,42 mmol/l Serum), Hämoglobin (bis zu 75 μ mol/l Serum), sowie Antikoagulantien in den üblichen Konzentrationen stören nicht. Ferner konnte keine Störung des enzymatischen Cholesterin-Farbttestes durch Pharmaka bei in vitro- und in vivo-Versuchen festgestellt werden (Stähler & Munz, Publikation in Vorbereitung).

Für die Cholesterinester-Spaltung mit Cholesterinesterase haben wir gezeigt (s. Tab. 1), daß alle im Serum vorkommenden Cholesterinester Substrate dieses Enzyms sind und bei Einsatz von 0,1 U Cholesterinesterase pro Bestimmung quantitativ gespalten werden.

Der Vergleich des vollenzymatischen Cholesterin-Tests mit der bisher üblichen Referenzmethode nach *Abell* (4), bei der die Störungen der üblichen chemischen Methoden vermieden werden, ergab die in Abbildung 1 dargestellte Korrelation. Danach werden mit beiden Methoden gut übereinstimmende Werte gefunden.

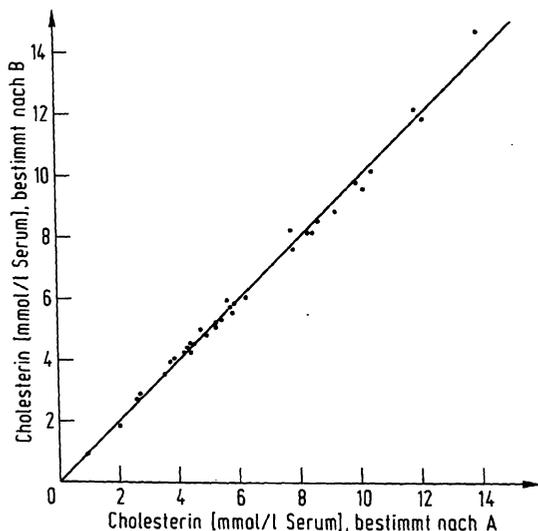


Abb. 1. Korrelation zwischen der Cholesterin-Bestimmung nach *Abell* (A) und dem enzymatischen Cholesterin Farbttest (B). Regression: $y = 0,999 x - 0,01$; $r = 0,996$; $s_{y \cdot x} = 0,26$; $N = 34$.

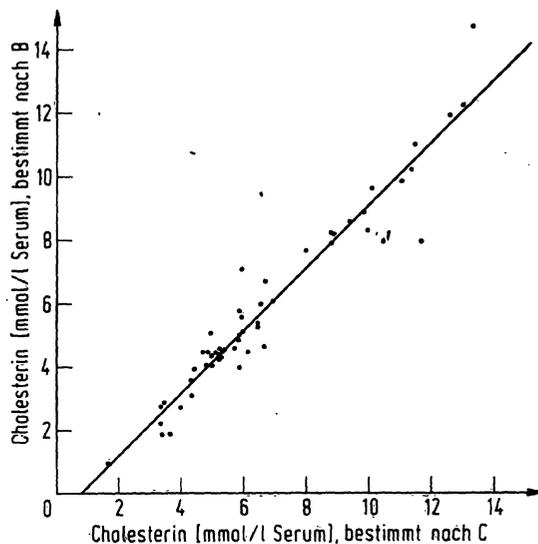


Abb. 2. Korrelation zwischen der Cholesterin-Bestimmung nach *Liebermann-Burchard* (C) und dem enzymatischen Cholesterin Farbttest (B). Regression: $y = 0,983 x - 0,77$; $r = 0,965$; $s_{y \cdot x} = 0,75$; $N = 54$.

Außerdem verglichen wir die chemische Methode nach *Liebermann-Burchard* (7, 8) mit dem enzymatischen Test. Die Regressionsanalyse ergab – wie aus Abbildung 2 zu ersehen ist – ein additives Glied von etwa 0,77 mmol/l Cholesterin. Diese Differenz ist u. a. bei der chemischen Methode auf die unspezifische Reaktion von Serum-Bestandteilen, wie z. B. Bilirubin und Serumproteinen, zurückzuführen. Mit dem vollenzymatischen Cholesterin-Farbttest müssen deshalb neue Normalwerte für Cholesterin ermittelt werden.

Präzision

Der Variationskoeffizient in der Serie liegt bei 2 % ($N = 20$; 5,17 – 12,93 mmol/l Cholesterin), der Variationskoeffizient von Tag zu Tag beträgt etwa 3 % ($N = 20$).

Eichkurve

Unter den Testbedingungen besteht direkte Proportionalität zwischen Farbintensität und Cholesterin-Konzentration im Meßbereich 0–25,86 mmol/l Serum. (s. Abb. 3).

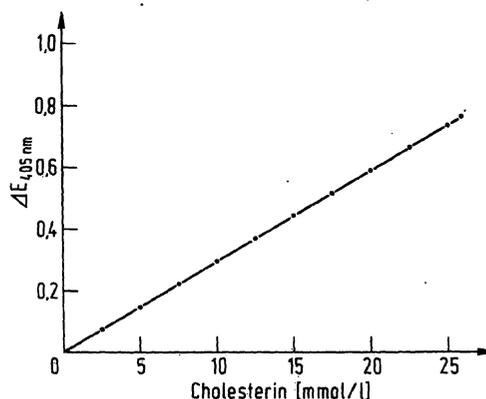


Abb. 3. Eichkurve für den enzymatischen Cholesterin Farbttest.

Farbstabilität

Die Farbentwicklung ist nach 60 min bei 37° C abgeschlossen. Danach ist die Färbung für weitere 45 min stabil.

Empfindlichkeit

Bei Einsatz von 0,02 ml Probe/Test entspricht eine Extinktionsdifferenz von 0,153 bei 405 nm einer Cholesterin-Konzentration von 5,17 mmol/l Serum. Die Methode ist damit ausreichend empfindlich.

Automaten-Adaptierbarkeit

Ähnlich wie bei Urica-quant kann dieser enzymatische Cholesterin-Farbstest auf alle diskontinuierlich arbeitenden Automaten-Systeme übertragen werden (*Ziegenhorn*, Publikation in Vorbereitung).

Bestimmung des freien und/oder veresterten Cholesterins

Führt man die enzymatische Cholesterin-Bestimmung in Abwesenheit der Cholesterinesterase durch, so wird mit Cholesterinoxidase nur das freie Cholesterin erfaßt. Das veresterte Cholesterin ergibt sich dann aus der Differenz von Gesamt- und freiem Cholesterin. Durch getrennte Zugabe von Cholesterinoxidase und Cholesterinesterase ist es natürlich auch möglich, freies und verestertes Cholesterin nacheinander in einem Testansatz zu bestimmen.

Danksagung

Wir danken Herrn R. Herz für seine gewissenhafte Mitarbeit.

Literatur

1. Lynen, F. (1972), *Naturwiss. Rundsch.* 25, 382–387.
2. Irsigler, K. (1973), *Wien. Klin. Wochenschr.* 85, 195.
3. Schwandt, P. (1973), *Internist* 14, 325–329.
4. Henry, R. J. (1964), *Clinical Chemistry*, 2. Aufl., S. 843–864, Verlag Harper & Row, New York.
5. Richterich, R. & Lauber, K. (1962), *Klin. Wochenschr.* 40, 1252–1256.
6. Salkowski, E. (1872), *Pfluegers Arch.* 6, 207–212.
7. Liebermann, C. (1885), *Ber.* 18, 1803–1809.
8. Burchard, H. (1889), Dissertation, Rostock.
9. Zlatkis, A., Zak, B. & Boyle, A. J. (1953), *J. Lab. Clin. Med.* 41, 486–492.
10. Watson, D. (1960), *Clin. Chim. Acta* 5, 637–643.
11. Richmond, W. (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, Suppl. 126.
12. Richmond, W. (1973), *Clin. Chem.* 19, 1350–1356.
13. Flegg, H. M. (1973), *Ann. Clin. Biochem.* 10, 79–84.
14. Whitehead, T. P., persönliche Mitteilung.
15. Röschlau, P., Bernt E. & Gruber, W. (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, 1938–1941, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
16. Okey, R. (1930), *J. Biol. Chem.* 88, 367–369.
17. Beaucamp, K., Lang, G. & Möllering, H., unveröffentlicht.
18. Röschlau, P., unveröffentlicht.
19. Holz, G., Beaucamp, K. & Lang, G., unveröffentlicht.
20. Zöllner, N. & Eberhagen, D. (1965), *Untersuchung und Bestimmung der Lipase im Blut*, Springer-Verlag, Berlin.
21. Kageyama, N. (1971), *Clin. Chim. Acta* 31, 421–426.
22. Mathies, H., Stähler, F., Wittner, H. & Vollmar, H. (1974), *Med. Klin.* 69, 607–612.
23. Klein, B. & Leinman, N. B. (1974), *Clin. Chem.* 20, 90–91.
24. Nash, T. (1953), *Biochem. J.* 55, 416–421.

Dr. P. Röschlau
Apoth. E. Bernt
Dr. W. Gruber
Boehringer Mannheim GmbH
Biochemica Werk Tutzing
8132 Tutzing/Obb.