Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 334—337

Automatische Bestimmung von Enzymaktivitäten in tierischen Seren mit dem Reaction Rate Analyzer 8600

2. Mitteilung: Vergleiche der automatisierten mit der manuellen Methode an Glutamat-Dehydrogenase, Sorbit-Dehydrogenase, Leucin-Aminopeptidase und alkalischer Phosphatase¹⁾

Von H. GRÖTSCH und P. HAJDÚ

Farbwerke Hoechst AG vormals Meister Lucius & Brüning

(Eingegangen am 7. Dezember 1971)

Herrn Prof. Dr. Heinrich Ruschig zum 65. Geburtstag

Es wurden die Enzymaktivitäten von Glutamat-Dehydrogenase, Sorbit-Dehydrogenase, Leucin-Aminopeptidase und alkalische Phosphatase in tierischen Seren (Ratten, Kaninchen, Schafen, Hähnchen und Puten) vergleichend am Reaction Rate Analyzer 8600 und Eppendorf-Photometer bestimmt. Bei den untersuchten Tierarten wurde für alkalische Phosphatase eine Speziesabhängigkeit gefunden (Ratten 30—130, Kaninchen 30—106, Schafe 40—115, Hähnchen 420—1300, Puten 800—1300 BESSEY-LOWRY-Einheiten/l). Die Enzymaktivitäten für Glutamat-Dehydrogenase und Sorbit-Dehydrogenase lagen, wie beim Menschen, niedrig; für Ratten, Kaninchen und Schafe im Bereich von 0—10 U/l; für Leucin-Aminopeptidase im Bereich von 7—95 U/l.

Die Korrelation erhöhter Glutamat-Dehydrogenase- und Sorbit-Dehydrogenase-Werte gelang im Verlauf eines Pferde-Versuches mit guten Ergebnissen, so daß die Umstellung der Aktivitätsbestimmungen dieser Enzyme auf Automaten-Betrieb möglich ist.

The automatic determination of enzyme activities in animal sera with the Reaction Rate Analyzer 8600

2. Comparison of the automatic with the manual method for glutamate dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase, leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase

The activities of glutamate dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase, leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase were measured in animal sera (rat, rabbit, sheep, chicken, turkey) with the Reaction Rate Analyzer 8600 and with the Eppendorf photometer and the results from the two methods were compared. The activity of the alkaline phosphatase showed a species dependency (rat 30—130, rabbit 30—106, sheep 40—115, chicken 420—1300, turkey 800—1300 BESSEY-LOWRY-units/l). The activities of glutamate dehydrogenase and sorbitol dehydrogenase were low, as in human sera: in rat, rabbit and sheep, the range of activity was 0—10 U/l. Leucine aminopeptidase activities were in the range 7—95 U/l.

Using a sample of horse serum, the two methods showed a good correlation in the measurement of the high values for glutamate dehydrogenase and sorbitol dehydrogenase. It is therefore possible to use the automatic method for the determination of this enzyme activities.

In Erweiterung unserer Arbeiten über die Umstellung manueller Methoden auf automatisierte Bestimmungen haben wir vergleichende Untersuchungen mit den Enzymen Glutamat-Dehydrogenase, Sorbit-Dehydrogenase, Leucin-Aminopeptidase und alkalische Phosphatase durchgeführt.

Bekanntlich liegen die Aktivitätsbereiche für Glutamat-Dehydrogenase und Sorbit-Dehydrogenase nicht nur beim Menschen, sondern auch in tierischen Seren niedrig. Wir haben durch Zusatz von ADP zu dem Glutamat-Dehydrogenase-Reaktionsgemisch eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Damit verlagert sich die obere Normgrenze z. B. im Humanbereich von 1 U/l auf 3 U/l (vgl. hierzu auch l. c. (2)). Mit dieser Verbesserung der Aktivitätsbestimmung verringert sich auch das Risiko erhöhter Fehler, die in niederen Aktivitätsbereichen unvermeidlich sind (3).

Für Sorbit-Dehydrogenase und Leucin-Aminopeptidase wurden Versuchsbedingungen der Literatur (4, 5) auf den Automaten übertragen. Für alkalische Phosphatase wurde das von RICK (6) eingeführte Reaktionssystem in Diäthanolamin-Puffer verwendet, wobei in niederen Aktivitätsbereichen eine Erhöhung der Genauigkeit bei der Erstellung von Resultaten gegeben ist. Das bisher umständliche Verfahren der Messung von Blind- und Analysenwerten für je 1 Probe kann entfallen. Wir haben die erhaltenen höheren Werte auf die üblichen BESSEY-LOWRY-Einheiten umgerechnet (Faktor 0,305).

Material und Methoden

Tiermaterial

Eine Differenzierung nach Geschlecht wurde auch diesmal nicht vorgenommen; Ratten, Kaninchen und Schafe (vgl. l. c. (1)) standen z. Z. der Blutentnahme nicht im akuten Versuch. Bei Hähnchen vom Typ „Nicolas“ (etwa 10 Wochen alt, unbehandelt, normales Hähnchen-Mastfutter) und Puten (etwa 3 kg Gewicht, Nicolas bb06, Putenmast-Alleinfutter) wurde die Blutentnahme durch Herzpunktion vorgenommen.

¹⁾ Enzyme: Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3); Sorbit-Dehydrogenase (EC 1.1.1.14); Leucin-Aminopeptidase (EC 3.4.1.1); alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1).

Abb. 1

Aktivitäten von Glutamat-Dehydrogenase (■, □) und Sorbit-Dehydrogenase (●, ○) nach einmaliger oraler Gabe eines Versuchspräparates beim Pferd (s. auch Text). Die Korrelation der mit dem Eppendorf-Photometer (■, ●) und mit dem Reaction Rate Analyzer LKB 8600 (□, ○) erhaltenen Werte ($n = 10$) ergab für Glutamat-Dehydrogenase $r = 0,991$; $y = 1,065 x - 0,8 \pm 2,5$ U/l und für Sorbit-Dehydrogenase $r = 0,995$; $y = 1,032 x + 0,4 \pm 0,6$ U/l

Für die in Abbildung 1 beschriebenen Untersuchungen wurde einem Fjord-Pferd (525 kg, normales Futter) Blut aus der Halsvene entnommen.

Die Blutproben wurden vor dem Zentrifugieren 60 Min. bei $+4^\circ$ aufbewahrt, anschließend durchschnittlich 2 Min. in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert; das abgenommene Serum ließen wir 2 Min. nachzentrifugieren.

Enzymbestimmungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzymaktivitäten für Glutamat-Dehydrogenase und Sorbit-Dehydrogenase nach der in l. c. (1) beschriebenen Methodik (Messung der Konzentrationsänderung von NADH bei 340 nm) bestimmt, bei Leucin-Aminopeptidase und alkalischer Phosphatase wurde der kinetische Verlauf der Reaktion bei 410 nm verfolgt, wobei freigesetztes *p*-Nitranilin bzw. *p*-Nitrophenol bestimmt wurde.

Die Versuche wurden am Reaction Rate Analyzer 8600 und Photometer Eppendorf (vgl. l. c. (1)) ausgeführt. Wir haben nunmehr die Meßdaten des Automaten mit einem Bo-Philip (Stockholm) Multilog 801 B digitalisiert, und mit dem Printer Driver 832 und Electronic Timer 825 derselben Firma auf einer Addo X ausgedruckt (7). Um die Linearität der Reaktion zu prüfen, wurden im allgemeinen 5 Werte während einer Meßperiode erfaßt²⁾.

Reaktionsansätze

Die im folgenden aufgeführten Ansätze gelten für den Reaction Rate Analyzer 8600. Für die Untersuchungen am Photometer Eppendorf wurden jeweils die doppelten Volumina eingesetzt (ausgenommen die Messung der alkalischen Phosphatase, s. u.)

Glutamat-Dehydrogenase

Ansatz: 1,00 ml Reaktionsgemisch (8), enthaltend
50 mMol/l Triäthanolaminpuffer pH 7,6
5 mMol/l EDTA
40 mMol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,22 mMol/l NADH
0,80 mMol/l ADP
+ 0,20 ml Serum

Startreagenz: 0,05 ml 2-Oxoglutarat, 250 mMol/l

²⁾ Beim Ausdrucken muß naturgemäß die Zeitkonstante des Timers mit in den Faktor einbezogen werden.

Sorbit-Dehydrogenase

Ansatz: 1,00 ml Reaktionsgemisch, enthaltend
150 mMol/l Triäthanolaminpuffer
0,19 mMol/l NADH
+ 0,20 ml Serum

Startreagenz: 0,10 ml Fructose 1,65 Mol/l

Leucin-Aminopeptidase

Ansatz: 1,00 ml Pufferlösung, enthaltend
230 mMol/l Trispuffer, pH 8,25
835 $\mu\text{Mol/l}$ MgCl_2
+ 0,10 ml Serum
+ 0,10 ml L-Leucin-Nitrilanilid 25 mMol/l

Das Substrat wurde nicht als Startreagenz eingespritzt, sondern dem Ansatz zugegeben, Registrierdauer 3 Min.

Alkalische Phosphatase

Für den Reaction Rate Analyzer 8600 wurde das Puffergemisch nach RICK (6) hergestellt.

Ansatz: 0,95 ml Pufferlösung (Diäthanolamin-HCl, pH 9,8)
+ 0,01 ml Serum

Startreagenz: 0,05 ml *p*-Nitrophenylphosphat 296 mMol/l

Für Vergleichsmessungen der Aktivität von alkalischer Phosphatase am Photometer Eppendorf wurde die Methode nach BESSEY-LOWRY (Boehringer, Farbstoff Nr. 15987) verwendet. Die Inkubation dauerte hier 30 Min. bei 37° .

Berechnung der Enzym-Aktivitäten

Für die Berechnung der am Photometer Eppendorf gemessenen Aktivitäten wurden die bekannten Größen eingesetzt, die sich aus V = Gesamtvolumen, v = eingesetztes Probevolumen, d = Schichtdicke (= 1), $\Delta E/\text{Min.}$ und dem Extinktionskoeffizienten ϵ für NADH, *p*-Nitroanilin bzw. *p*-Nitrophenol bei der Meßwellenlänge zusammensetzen.

$$U/l = \frac{\Delta E/\text{Min.} \cdot V \cdot 1000}{\epsilon \cdot d \cdot v} \quad (1)$$

Für die Umrechnung der Extinktionsänderungen des Automaten in internationale Einheiten haben wir unter Ausschaltung empirischer Faktoren — d. h. vergleichende Untersuchungen an Parallel-Reihen von Seren — Eichwerte von käuflichen reinen Enzymen³⁾ ermittelt, die in der Tabelle 1 wiedergegeben sind.

Ergebnisse und Diskussion

Bekannterweise liegen die Normalbereiche für Glutamat-Dehydrogenase und Sorbit-Dehydrogenase beim Menschen sehr niedrig (etwa 1 U/l); wir konnten feststellen, daß die Aktivitäten der von uns bisher untersuchten Seren von unbehandelten Tieren im Bereich dieser Werte liegen.

Bei der Prüfung eines Resorcyssäurederivates an einem Pferd zeigte sich eine vorübergehende Aktivitätserhöhung verschiedener Serum-Enzyme, darunter Glutamat-Dehydrogenase und Sorbit-Dehydrogenase. Die vergleichende Enzymaktivitätsbestimmung mit dem Reaction Rate Analyzer 8600 und Photometer Eppendorf zeigt Abbildung 1.

Für Leucin-Aminopeptidase fanden wir bei dem uns bisher zur Verfügung stehenden Tiermaterial (wie

³⁾ Glutamat-Dehydrogenase (15 140), Sorbit-Dehydrogenase (15 316), Leucin-Aminopeptidase (15 006), Fa. Boehringer, Mannheim, alkalische Phosphatase (32 480), Fa. Serva, Heidelberg.

Tab. 1
Vergleich der Steigung der Eichgeraden von Verdünnungen reiner Enzyme

Enzym	Steigung der Eichgeraden Reaction Rate Analyzer 8600 (Photometer Eppendorf = 1,0)	Berechnungsfaktor für Photometer Eppendorf*)	Berechnungsfaktor für Reaction Rate Analyzer 8600
Glutamat-Dehydrogenase	0,376 (340 nm, 35°)	1894 (366 nm, 25°)	712 · $\Delta E/\text{Min.} = \text{U/l}$
Sorbit-Dehydrogenase	0,321 (340 nm, 35°)	1970 (366 nm, 25°)	632 · $\Delta E/\text{Min.} = \text{U/l}$
Leucin-Aminopeptidase	0,769 (410 nm, 35°)	1212 (405 nm, 25°)	932 · $\Delta E/\text{Min.} = \text{U/l}$
Alkalische Phosphatase	0,305 (410 nm, 35°)	BESSEY-LOWRY-Einheiten = 0,305 · Einh.**)	

*) Errechnet nach Formel (1).

**) Verschiedene Methoden; der angegebene Faktor bedeutet, daß die mit den üblichen Umrechnungen für mit dem Reaction Rate Analyzer 8600 gemessene Werte ermittelten Aktivitäten mit 0,305 zu multiplizieren sind, um BESSEY-LOWRY-Einheiten zu erhalten.

Tab. 2
Vergleichende Aktivitätsbestimmungen mit dem LKB Reaction Rate Analyzer 8600 und Eppendorf Photometer

Tierart	n	Bereich	Korrelations- koeffizient	Regressions- gerade	Streuung	Streuung relativ*)
Leucin-Aminopeptidase (U/l)						
Hund	16	5—10	0,672**)	0,762x**)+ 2,11	± 0,96	13,7 %
Kaninchen	14	17—30	0,856	0,612x + 7,65	± 1,50	6,3 %
Ratte	27	9—24	0,874	0,902x + 2,81	± 1,45	10,4 %
Schaf	16	6—12	0,794	0,860x + 1,82	± 0,84	9,4 %
Pute	11	70—95	0,943	0,978x + 1,26	± 2,49	3,0 %
Alkalische Phosphatase (BESSEY-LOWRY-Einheiten).						
Kaninchen	32	30—106	0,909	0,862x + 10,45	± 7,17	11,6 %
Ratte	50	30—130	0,929	1,064x — 4,80	± 8,51	11,2 %
Schaf	20	40—115	0,970	0,952x + 4,12	± 3,95	6,4 %
Hähnchen	15	420—1300	0,982	0,804x + 3,31	± 31,08	5,7 %
Pute	11	850—1450	0,978	0,989x + 6,26	± 35,88	3,3 %

*) Bezogen auf die Mittelwerte der untersuchten Aktivitäten.

**) Die Differenz zwischen den errechneten und hypothetischen (= 1) Koeffizienten ist mit der Prüfgröße t jeweils geprüft worden (9) und ergab keinen signifikanten Unterschied.

Kaninchen, Hund, Ratte, Schaf) Werte, die denen beim Menschen sehr nahe liegen (Tab. 2). In diesem Falle hat sich die Sofort-Inkubation mit Substrat als günstig erwiesen, da die Reaktion unter den angegebenen Bedingungen relativ langsam verläuft, so daß auch die Erwärmung der einzelnen Reaktionsproben auf 35° bis zum Erreichen der Meßposition im Automaten wenig Einfluß hat. Man mißt dann die einzelnen Proben zur besseren Auswertung über 3 Minuten.

Seren von Geflügel (Pute und Hähnchen*) weisen eine hohe Aktivität auf, so daß hierbei die für Transaminasen übliche Arbeitsweise geeignet ist: Die mit dem Puffer (s. Versuchsteil) verdünnten Serumproben werden in das Gerät eingegeben. Nach Erreichen der Meßposition wird die Reaktion durch Zugabe von 100 μl L-Leucin-nitrilid ausgelöst. Die Registrierungszeit ist bei diesen Seren mit 1 Minute ausreichend. Die Umrechnungsfaktoren für beide Analysenarten sind die gleichen.

Für alkalische Phosphatase hat sich die Methode von RICK (6) unter Verwendung von Diäthanolamin-HCl-Puffer im Automatenbetrieb sehr gut bewährt. Dieses Enzym hat eine sehr große Spezies-bezogene Abhängigkeit, die sich bei unserem bisher untersuchten Tiermaterial auf einen Aktivitätsbereich von 10 bis

Abb. 2
Richtigkeitskontrolle für alkalische Phosphatase ($\bar{x} \pm 1s$) Kontrollserum: Seronorm. Wiedergefunden: $100 \pm 6,5\%$ des Sollwertes
Mittlerer Fehler der Bestimmungen: $\pm 3,1$ Einheiten/l

*) Ausreißer, Charge erneuert.

*) Bei Hähnchen wurden die Aktivitätsbestimmungen nur mit dem Automaten durchgeführt; die Aktivitäten liegen im Bereich von 80—190 U/l.

*Ein neues Lehrbuch
für Mediziner!*

Willi Spielmann/Siegfried Seidel

Einführung in die Immunhämatologie und Transfusionskunde

Dieses Buch vermittelt in erster Linie Medizinstudenten eine Einführung in das Gebiet der Immunhämatologie und Transfusionskunde. Darüber hinaus spricht es jeden Arzt, Chemiker und Biologen an, der sich über bestimmte Gebiete dieses neuen Fachgebietes kurz informieren will.

Dem Charakter einer Einführung entsprechend, haben sich die Verfasser bemüht, besonders die für die Praxis wesentlichen Gesichtspunkte herauszustellen. Alle gebräuchlichen Methoden sind im Anhang behandelt, der darüber hinaus noch einige Spezialverfahren enthält.

Bei der Konzeption des Buches sind die Autoren von der Überlegung ausgegangen, daß die für die Bluttransfusion erforderlichen theoretischen und praktischen Kenntnisse von jedem angehenden Mediziner verlangt werden müssen. Darüber hinaus sollte er mit den Grundzügen der modernen Immunhämatologie bekanntgemacht werden, soweit sie sich auf den Morbus haemolyticus neonatorum, die Autoaggressionskrankheiten, die Transplantationsimmunologie und die Blutgruppengenetik beziehen.

Bisher sind auf diesem Gebiet nur umfassende Monographien erschienen. Im Gegensatz dazu haben Spielmann/Seidl versucht, den gesamten Wissensstoff, soweit er für die Praxis von Bedeutung ist, in gedrängter Form darzustellen.

Das Buch wird nicht nur dem Studenten, sondern auch dem approbierten Arzt von Nutzen sein, wenn er sich rasch über bestimmte Einzelheiten informieren will.

1972. XVI, 190 Seiten mit 33 Abbildungen und 22 Tabellen. Format 17 × 24 cm. Broschiert DM 28,—.
Wir übersenden Ihnen gern unseren Sonderprospekt.

VERLAG CHEMIE GMBH
694 WEINHEIM/BERGSTR.

Ultraschallhomogenisator Braun-Sonic 300S

Der Braun-Sonic 300S hat eine moderne elektronische Schaltung und funktionelle Schwingsonden für optimale Leistung auf allen Gebieten der Forschung.

Zur Aufschließung verschiedener Komponenten ist der Braun-Sonic 300S unter anderem einsetzbar in den Erd- und verwandten Wissenschaften der Pharmakologie, Pharmazie, Chromatographie etc.

Die hervorragende Ausstattung dieses Ultraschallhomogenisators beinhaltet folgende technische Merkmale:

300 Watt
Schall-
energie

Automatische
Abstimmung

Schwing-
sonden
aus Titan
mit farbiger
Kenn-
zeich-
nung

Leistungs-
bereiche
umschaltbar

Selbst-
regulierung,
Überhitzungs-
schutz

Verbes-
serte Elek-
tronik er-
möglicht
vielseitigen
Einsatz

Große
Auswahl an
Zubehörteilen

Ein ausführlicher
Prospekt liegt
für Sie bereit.
Schreiben Sie
uns, wir infor-
mieren Sie
kostenlos und
unverbindlich.

B. Braun Melsungen
Aktiengesellschaft
Werk Apparatebau

3508 Melsungen, Postfach 110 und 120

7th International Congress of Clinical Chemistry

Geneva (Switzerland) / Evian (France), September 1969

Editor: *M. Roth* (Geneva)

ISBN 3-8055-1173-6 (complete set)

The Proceedings of the 7th International Congress of Clinical Chemistry contain the full text of a number of plenary lectures, and a selection of papers presented at the congress. Two round-table discussions are included. Topics covered by the proceedings are methodology (photometry, electro-analysis, automation, data processing, fluorimetry, separation methods, etc.), quality control, proteins, enzymes, hormones, lipids, intestinal absorption, function tests, inborn errors of metabolism, etc. The proceedings give an excellent account of recent advances in the many fields of clinical chemistry.

Vol. 1 Methods in Clinical Chemistry

Editor: *M. Roth* (Geneva)

XIV + 321 p., 142 fig., 49 tab., 1970. SFr. 91.— / £ 10.05 / DM 91,—

ISBN 3-8055-1167-1

Vol. 2 Clinical Enzymology

Editors: *J. Frei* and *M. Jemelin* (Lausanne)

XIV + 204 p., 66 fig., 49 tab., 1970. SFr. 59.— / £ 6.50 / DM 59,—

ISBN 3-8055-1169-8

Vol. 3 Hormones, Lipids and Miscellaneous

Editors: *J. P. Felber* and *J. Scheidegger* (Geneva)

XIV + 475 p., 227 fig., 72 tab., 1970. SFr. 132.— / £ 14.55 / DM 132,—

ISBN 3-8055-1170-1

Vol. 4 Digestion and Intestinal Absorption

Editors: *P. Hore* and *G. Semenza* (Zürich)

XVIII + 134 p., 49 fig., 25 tab., 1970. SFr. 41.— / £ 4.55 / DM 41,—

ISBN 3-8055-1172-8

Distributed exclusively in the United States of America and Canada by University Park Press, Baltimore, London, Tokyo

(separate ISBN)

S. Karger

Basel · München · Paris · London · New York · Sydney

Schweiz: S. Karger AG, Arnold-Böcklin-Strasse 25, CH-4000 Basel 11

Bundesrepublik Deutschland: S. Karger GmbH, Postfach 2, D-8034 Germering/München

West-Berlin: Walter Schulze, Schöneberger Ufer 59, D-1000 Berlin 30

France: S. Karger S. A., 42bis, Boulevard de La Tour-Maubourg, F-75 Paris 7e

Great Britain: John Wiley and Sons Ltd., Baffins Lane, Chichester, Sussex

USA: Albert J. Phiebig, Inc., US Representative of S. Karger,

P. O. Box 352, White Plains/New York 10602

Australia: Australasian Drug Information Services Pty. Ltd.,

Australian Representative of S. Karger, P. O. Box 194, Balgowlah/Sydney, N.S.W. 2093

New Zealand: Australasian Drug Information Services Pty. Ltd., P. O. Box 33-274, Takapuna/Auckland 9

1300 BESSEY-LOWRY-Einheiten (Mensch normal 18—48 BESSEY-LOWRY-Einheiten) erstreckt. Die in Tabelle 2 wiedergegebenen Korrelationswerte zwischen zwei Methoden (RICK und BESSEY-LOWRY) umgerechnet in BESSEY-LOWRY-Einheiten können als sehr gut bezeichnet werden, wobei ergänzend darauf hingewiesen sei, daß — bedingt durch die hohe Aktivität — eine 10-fache Serumverdünnung bei Hähnchen für die Untersuchungen im Photometer Eppendorf vorgenommen wurde.

Für den Routinebetrieb stellt sich bei den hier besprochenen Enzymen das Problem der Qualitäts-

kontrolle. Wir haben lediglich für alkalische Phosphatase Seronorm als Richtigkeitskontrollserum verwenden können (vgl. Abb. 2). Für die anderen Enzyme konnten lediglich Poolseren vom Vortag eingesetzt werden, da die Herstellung eines Primärstandards mit Hilfe reiner Enzyme (wegen ungenauer Aktivitätsangaben) uns nicht zweckmäßig erschien.

Es sei abschließend nochmals betont, daß es sich bei den in der Tabelle 2 befindlichen Aktivitätsangaben der einzelnen Tierseren um keine Normalwerte handelt.

Literatur

1. GRÖTSCH, H. und P. HAJDÚ, diese Z. 9, 123 (1971). — 2. DELBRÜCK, A., Krankenhausarzt, 9, 403 (1971). — 3. SZASZ, G., Krankenhausarzt, 9, 449 (1971). — 4. GERLACH, U., Klin. Wschr. 35, 1144 (1957). — 5. NAGEL, W. und F. H. SCHMIDT, Klin. Wschr. 42, 447 (1964). — 6. HAUSAMEN, T. U., W. RICK, W. GROSS und R. HELGER, Clin. chim. Acta, Amsterdam 15, 241 (1967). — 7. HAJDÚ, P. und H. GRÖTSCH, Z. Anal. Chem. 256, 36 (1971). — 8. Hoppe-Seyler-Thierfelder, 10. Aufl. Bd. VI/A, Teil A, 304 (1964). — 9. SACHS, L., Statistische Auswertungsmethoden, S. 426, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1969).

Dr. P. Hajdú
Farbwerke Hoechst
6230 Frankfurt 80
Postfach 800320