Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 581—585, November 1969

Die Jaffé-Reaktion mit Kreatinin Reaktionsprodukt und allgemeine Reaktionsbedingungen

Von H. P. SEELIG

Aus dem Med.-Diagnostischen Institut der Städt. Krankenanstalten Karlsruhe (Chefarzt: Dr. H. Wüst)

(Eingegangen am 9. Juni 1969)

Spektroskopische und chromatographische Untersuchungen der Jaffé-Reaktion mit Kreatinin ergeben, daß das rote Reaktionsprodukt nicht mit der häufig dafür angegebenen Pikraminsäure identisch ist. Es scheint vielmehr ein Additionskomplex aus einem Molekül Kreatinin und einem Molekül Pikrinsäure zu sein, der nur in alkalischer Lösung stabil ist.

Hohe Alkalität unterdrückt die Bildung des roten Farbstoffs aus Kreatinin, jedoch wird roter Farbstoff durch NaOH selbst gebildet, der spektroskopisch und visuell nicht von dem aus Kreatinin gebildeten zu unterscheiden ist. Eine geringere Farbausbeute wurde auch mit hoher Konzentration von Kreatinin gefunden. Das kann durch Bildung einer Verbindung aus zwei Molekülen Kreatinin und einem Molekül Pikrinsäure bedingt sein.

Für klinische Zwecke müssen zu hohe NaOH-Konzentration und NaOH-Konzentrationsdifferenzen in Standard, Leerwert und Probe vermieden werden. Die photometrische Messung sollte bei $\lambda > 490$ nm ausgeführt werden, um eine bessere Linearität zwischen Kreatininkonzentration und Extinktion zu erhalten.

The Jaffé reaction with creatinine. The reaction product and general reaction conditions

Spectroscopic and chromatographic studies of the Jaffé-reaction with creatinine revealed that the red product of the reaction has no identity with the frequently suggested picramic acid. It is thought to be an addition complex of one molecule of creatinine and one molecule of picric acid, which may only be stable in alkaline solution.

High alkalinity suppresses formation of the red colour from creatinine, but a red colour is produced by the NaOH itself, which is spectroscopically and visually indistinguishable from that produced by creatinine. Loss of colour was also found with high concentrations of creatinine. This may be due to the formation of a di-creatinine picric acid compound.

For clinical purpose, high NaOH concentrations and variations of the NaOH level within standard, blank, and test solution should be avoided. The photometric measurement should be performed at wavelengths greater than 490 nm, which give an improved linearity between creatinine concentration and extinction.

Zwei Drittel der zahlreichen zur Kreatininbestimmung entwickelten Methoden beruhen auf der Jaffé-Reaktion (1): Alkalische Pikrinsäurelösung zeigt kurze Zeit nach Kreatininzugabe eine Rotfärbung, deren Absorptionsintensität sich in gewissen Grenzen proportional zu der Kreatininkonzentration verhält. Der Nachteil dieses einfachen Verfahrens liegt in seiner geringen Spezifität, da zahlreiche dem Kreatinin strukturell verwandte Körper, Ketone und Zucker ebenfalls zu einer Rotfärbung alkalischer Pikrinsäure führen können. Die methodologischen Probleme der Kreatininbestimmung nach JAFFÉ betrafen bisher vor allem die Entfernung oder quantitative Erfassung dieser interferierenden chromogenen Substanzen (vgl. 2), während die chemischen Vorgänge der Reaktion nur wenig bearbeitet wurden. Daher liegen weder über die Konstitution des Reaktionsproduktes noch über die Reaktionsgleichgewichte und deren Auswirkungen auf die Farbintensität bei Konzentrationsänderungen einzelner Partner eindeutige Ergebnisse vor. Von dem qualitativen Phänomen einer visuell beobachteten Farbblöschung bei hohen Kreatinin- und NaOH-Konzentrationen ausgehend, soll deshalb versucht werden, mit spektroskopischen und chromatographischen Methoden eine vorläufige Deutung der Reaktionsabläufe herbeizuführen.

Methodik

Spektroskopische Untersuchungen

Die spektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Spektralphotometer PMQ II (Zeiss) in Quarzküvetten von 0,5 und 2,0 cm Schichtdicke bei Wellenlängen zwischen 200 und 550 nm ausgeführt.

Untersucht wurden:

a) die Spektren von 12 mm bis 9,15 μ m Pikrinsäure in Tetrachlorkohlenstoff, 10 und 5N HCl, in H₂O und in 0,005 bis 6,4N NaOH. Der Kreatiningehalt dieser Lösungen lag zwischen Null und 5 mg/100 ml;

b) die Spektren zwischen 350 und 550 nm von Pikrinsäure-Lösungen (9,15 μ m bis 12 mm), denen bei konstanter NaOH-Konzentration (je 0,1—0,5N) steigende Mengen von Kreatinin (88 μ m bis 0,6M) zugefügt wurden.

Untersuchungen zur Charakterisierung des Reaktionsproduktes

Darstellung der roten Kreatinin-Pikrinsäure-Verbindung (nach l. c. (3))

Einer heiß gesättigten Pikrinsäure-Lösung wurden mehrere Spatelspitzen Kreatinin zugegeben. Das ausgefallene Kreatininpikrat wurde mit NaOH in Lösung gebracht, bis ein tieferer Farbton auftrat. Nach dem Erkalten wurde der in Eiswasser gekühlten Lösung schnell ein kleines Volumen 8N HCl zugefügt. Das ausgefällte rote Produkt wurde abzentrifugiert und zur Entfernung überschüssiger Pikrinsäure mehrmals mit Äther extrahiert. Nach vollständiger Trocknung erfolgte die spektroskopische Untersuchung in 0,005 bis 2,0N NaOH.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Dünnschichtchromatographisch wurden untersucht: Pikrinsäure, Pikraminsäure, das rote Produkt und die Lösungen der Jaffé-Reaktion mit Kreatinin und Glucose. Die glucosehaltigen Lösungen waren bis zum Eintritt der Rotfärbung erhitzt worden. Die Chromatogramme wurden auf Kieselgelplatten (Kieselgel nach STAHL, Merck) von 0,25 mm Schichtdicke ausgeführt. Die Platten waren mit 0,1M Glykokoll auf pH 12,7 gepuffert und luftgetrocknet. Vorversuche ergaben als geeignete Fließmittel: n-Butanol für die erste Fraktionierung und Äthanol/H₂O (60:40 v/v) für die weitere Auftrennung der noch am Startpunkt verbliebenen Fraktionen. Die R_F -Werte der ein- und zweidimensional entwickelten Chromatogramme wurden aus den Ergebnissen von je fünf Chromatogrammen berechnet. Alle Fraktionen wurden in je 2,0 ml 0,1N NaOH gelöst und spektroskopisch untersucht.

Ergebnisse*Einfluß der OH⁻-Ionenkonzentration auf das Spektrum der Pikrinsäure*

Das Spektrum der Pikrinsäure zeigt in apolaren Lösungsmitteln (Tetrachlorkohlenstoff) eine schmale Bande bei 335 nm (Abb. 1). Beim Übergang zu stark sauren polaren Lösungsmitteln entwickelt sich eine Schulter im langwelligen Teil der 335 nm-Bande. Mit zunehmender Möglichkeit zur Dissoziation der Pikrinsäure findet eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 357 nm statt. Eine zweite bathochrome Verschiebung erfolgt beim Übergang von wäßrigen zu alkalischen Pikrinsäure-Lösungen. Das Absorptionsmaximum liegt jetzt bei 388 nm. Diese alkalitätsbedingte Bathochromie wird von einer der OH⁻-Ionenkonzentration proportionalen Steigerung der Absorptionsintensitäten begleitet.

Besondere Beachtung verdienen die alkalitätsbedingten Änderungen der Absorptionsintensitäten im langwelligen Bereich zwischen 450 und 550 nm, in dem die Farbintensitäten der Jaffé-Lösung bei der Kreatininbestimmung gemessen werden. Während Pikrinsäure in wäßrigen Lösungen zwischen 450 und 550 nm nur sehr geringe Absorption zeigt, steigen sie in alkalischen Lösungen proportional zur OH⁻-Ionenkonzentration an. Unabhängig von der Pikrinsäure-Konzentration er-

Abb. 1

Spektren der Pikrinsäure in CCl₄ (A), in H₂O (9,15 µM, B), in 2N NaOH (C) und in 4N NaOH (D). E zeigt das Spektrum einer alkalischen Kreatinin-Pikrinsäure-Lösung. (88 µM Kreatinin, 0,5N NaOH). In der kleinen Abbildung werden die Verschiebungen des relativen Maximums bei Änderungen der NaOH-Konzentration dargestellt (3,6 mm Pikrinsäure)

reichen sie bei 3,5N NaOH die größten Werte, fallen aber bei weiterer Zunahme der Alkalität wieder auf die Ausgangswerte ab (Abb. 1). Den visuellen Ausdruck dieses Geschehens stellt die zu¹ und abnehmende Rotfärbung einer steigend alkalisierten Pikrinsäure-Lösung dar, deren *relatives* Absorptionsmaximum, gemessen gegen einen Leerwert wäßriger Pikrinsäure, bei 470—490 nm liegt. Mit zunehmender OH⁻-Ionenkonzentration tritt eine langwellige Verschiebung des *relativen* Maximums mit Senkung der Absorptionsintensitäten ein.

Einfluß der OH⁻-Ionenkonzentration auf das Spektrum der Pikrinsäure-Kreatininlösungen bei geringem Kreatiningehalt (< 10 mg/100 ml)

Nach Ablauf der Jaffé-Reaktion mit Kreatinin bleiben die beschriebenen Grundformen der Pikrinsäure-Spektren bestehen. Die Absorptionsmaxima liegen hier bei NaOH-Konzentrationen unter 0,05N bei 357 nm, bei höheren Konzentrationen findet sich eine der früheren 388 nm-Bande entsprechende bei 400 nm. Ungeachtet der kräftigen Rotfärbung der Lösung erscheint die Form des Spektrums nur geringfügig verändert. Neben der Senkung der Absorptionsintensität kommt es zu einer kleinen bathochromen Verschiebung des Maximums. Im langwelligen Teil des Spektrums (zwischen 450 und 550 nm) treten dagegen schon bei geringen Alkalikonzentrationen (< 0,1N) starke Erhöhungen der Absorptionsintensitäten auf, die gemessen gegen einen Leerwert gleich stark alkalischer Pikrinsäure ohne Kreatinin zwischen 470 und 490 nm wieder ein *relatives* Maximum ergeben. Eine Erhöhung der Alkalität führt zu einer vorübergehenden Löschung der kreatinin-induzierten Absorption (Abb. 2), der dann der eingangs beschriebene alkalibedingte Absorptionsanstieg folgt. Mit Pikrinsäure und hohen NaOH-Konzentrationen sowie mit Pikrinsäure, Kreatinin und geringen NaOH-Konzentrationen kann eine visuell und spektroskopisch nicht unterscheidbare Rotfärbung der Lösung erhalten werden.

Abb. 2

Abhängigkeit der Farbintensität von der NaOH-Konzentration bei Wellenlängen von 550—490 nm. 1,3 mm Pikrinsäure, 36 mm Kreatinin, d = 2 cm

Einfluß der Kreatininkonzentration auf das Pikrinsäure-Spektrum bei konstanten NaOH-Konzentrationen (0,1—0,5N)

Eine Proportionalität von Kreatininkonzentration und Absorptionsintensität im relativen Maximum (490 nm) besteht nur bis zu 10 mg/100 ml Kreatinin. Das Maximum der Farbentwicklung wird aber ungeachtet der Linearität der Eichkurve erst dann erreicht, wenn die Kreatininkonzentration die Pikrinsäure-Konzentration überschreitet. Bei noch höheren Kreatininkonzentrationen kommt es nach anfänglicher Rotfärbung der Lösung innerhalb weniger Minuten zu einer Farblöschung. Das Spektrum einer solchen Lösung besitzt bei 388 nm ein Absorptionsmaximum und gleicht dem einer stark alkalischen Pikrinsäure-Lösung. Zugabe von Pikrinsäure läßt die Rotfärbung wieder eintreten. Gleiches kann, wenn auch in minderem Maße, durch Zugabe von Mineralsäuren erreicht werden. Eine Senkung der NaOH-Konzentration dieser „kreatininübersättigten“ Lösungen verhindert oder verzögert die Farblöschung.

Spektroskopisches Verhalten der isolierten roten Substanz in neutralen und alkalischen Lösungen

Die isolierte rote Substanz löst sich schlecht in Wasser, gut dagegen in alkalischen Lösungsmitteln. Ihr Spektrum entspricht dem einer wäßrigen Pikrinsäure-Lösung mit Absorptionsmaximum bei 357 nm. Ganz anders verhält sich das Spektrum dieser Substanz in leicht alkalischen Lösungen (0,05—0,1N NaOH). Im langwelligen Bereich zeigen sich die der Jaffé-Lösung entsprechenden hohen Extinktionen (Abb. 3). Es bildet sich sogar ein zweites, wenn auch nur schwach angedeutetes

Abb. 3

Spektren der isolierten Kreatinin-Pikrinsäure-Verbindung in 0,05N NaOH (A), in 2N NaOH (B) und der chromatographisch getrennten Farbfraktion der Jaffé-Lösung in 0,5N NaOH (C). D zeigt das Spektrum der Fraktionen CII₂ bzw. BII₂ in 0,5N NaOH

absolutes Maximum zwischen 470 und 490 nm aus. Das erste Maximum liegt abweichend von der Jaffé-Lösung (395—400 nm) bei 410 nm. Eine Erhöhung der NaOH-Konzentration führt wieder zu einer Depression der Extinktionen im langwelligen Bereich und zu einer Verschiebung des Maximums nach 388 nm.

Dünnschichtchromatographische Ergebnisse (vgl. Abb. 4 und Tab. 1)

Die chromatographische Fraktionierung und spektroskopische Untersuchung ergaben eine völlige Identität zwischen Jaffé-Lösung mit Kreatinin und der isolierten roten Verbindung. Die immer wieder als Reaktionsprodukt angegebene Pikraminsäure zeigte bei der Fraktionierung mit Butanol ein von der Jaffé-Lösung abweichendes Verhalten (R_F 0,26, vgl. Tab. 1), während bei der Jaffé-Reaktion mit Glucose unter anderem offensichtlich Pikraminsäure entsteht (Fraktion AI 2 mit R_F 0,26). Die erste Fraktionierung der Jaffé-Lösung mit Kreatinin und der roten Verbindung mit Butanol ergab lediglich eine Abtrennung der Pikrinsäure (R_F 0,85; 0,86). Die am Startpunkt verbliebenen Flecken zeigten mit Äthanol-H₂O ein völlig konkordantes Verhalten. Die schnellste Fraktion bestand noch einmal aus Pikrinsäure (BII1/ R_F 0,82; CII1/ R_F 0,81).

Die zweite Fraktion (BII2 und CII2, R_F 0,75) erwies sich spektroskopisch als eigentliche farbgebende Kom-

Abb. 4

Eindimensionales Chromatogramm mit n-Butanol und Äthanol/H₂O entwickelt. Bezeichnung und R_F -Werte vgl. Text

Tab. 1

	Pikrinsäure	Pikraminsäure	Jaffé-Lösung mit Kreatinin	R_F -Werte		Jaffé-Lösung mit Glucose nach Erhitzen			
	DI	EI	BI	Rest am Startpunkt	Rest am Startpunkt	AI₁	AI₂	AI₃	Rest am Startpunkt
Erste Fraktionierung mit n-Butanol	0,86	0,26	0,85	0,0	0,86	0,0	0,87	0,26	0,13
Zweite Fraktionierung der am Startpunkt verbliebenen Flecken mit Äthanol/H ₂ O (60:40 v/v) (60—40)	Kontrolle 0,81	Kontrolle 0,8	BII₁ 0,82 BII₁ 0,75 BII₁ 0,22	CII₁ 0,81 CII₁ 0,75 CII₁ 0,23					

ponente (Abb. 3). Bei BII3 handelt es sich um eine gelblich gefärbte Substanz, die spektroskopisch eine schmale Bande mit Maximum bei 410 nm zeigte (Abb. 3). Ob es sich hierbei um einen Artefakt oder um eine bei der Reaktion entstehende Verbindung handelt, kann noch nicht entschieden werden.

Diskussion

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse können wir als Ursache der Rotfärbung einer alkalischen Pikrinsäure-Lösung durch Kreatinin die Entstehung einer roten Verbindung aus Kreatinin und Pikrinsäure annehmen. Diese Verbindung aus je einem Molekül Pikrinsäure und Kreatinin, die schon früher als Reaktionsprodukt angesehen wurde (4–7), zeigte sowohl spektroskopisch als auch chromatographisch ein mit der Jaffé-Lösung identisches Verhalten. Wir müssen daher die oft für die Rotfärbung verantwortlich gemachte Reduktion der Pikrinsäure zu Pikraminsäure (8–10) ablehnen.

Da die Rotfärbung alkalischer Pikrinsäure nicht nur mit Kreatinin, sondern auch mit aliphatischen und zyklischen Carbonylverbindungen, Säureamiden und Imiden, Estern, Äthylenverbindungen, Cyan-, Nitro- und Diazokörpern erzielt werden kann, versuchten WEISSE und TROPP (11) eine einheitliche Deutung der Reaktion aller in der Kälte jaffépositiver Substanzen über eine diesen Molekülen eigene aktive Methylene- und Methingruppe zu geben. Die Jaffé-Reaktion mit Kreatinin stellt somit den Spezialfall einer allgemeinen Reaktion zwischen nitrosubstituierten Benzolen und Molekülen mit aktiver Methylengruppe dar. Allein aus der visuell beobachteten Rotfärbung kann aber nicht auf eine allgemeine Reaktion geschlossen werden.

Im Falle des Kreatinins tritt nur dann eine Rotfärbung auf, wenn das Molekül eine ungehinderte Fähigkeit zur Keto-Enol-Tautomerie besitzt (5). Die auf Grund dieses Ergebnisses entwickelte Vorstellung einer roten Salzverbindung aus Pikrinsäure und basischem Kreatinin-Enol kann aber nicht zutreffen, da nichtbasische Körper wie Aceton nach unseren spektroskopischen Untersuchungen sich dem Kreatinin gleich verhalten und da das schwach basische Kreatinin ($K_B = 3,7 \cdot 10^{-11}$) in dem stark alkalischen Medium basische Eigenschaften nicht mehr besitzen kann. Stellen wir uns die Keto-Enol-Tautomerie als das Gleichgewicht zwischen zwei Säuren und ihrem gemeinsamen Anion vor, so wird Kreatinin ganz besonders in alkalischer Lösung unter Abspaltung eines Protons Eigenschaften eines Säurerestes annehmen (Abb. 5).

Der eigentliche Grund der Rotfärbung wird aber bei der Pikrinsäure zu suchen sein, kann doch durch genügende Alkalisierung eine von Kreatinin nicht zu über-treffende Rotfärbung erzielt werden. Diese alkali-bedingte Bathochromie der Pikrinsäure beruht auf einer Erweiterung der lichtabsorbierenden Systeme mit mesomerer Stabilisierung der Grundzustände und Senkung der Anregungsenergie, die sich formal durch die Auf-richtung des doppelt gebundenen O-Atoms der Nitro-

Abb. 5

- a) Keto-Enol-Tautomerie des Kreatinins als Gleichgewicht zwischen zwei Säuren und ihrem gemeinsamen Anion
b) Formale Darstellung prototrop tautomerer und mesomerer Erscheinungen der Pikrinsäure

gruppe erklären läßt (Abb. 5). Begünstigt werden diese Vorgänge bei der Pikrinsäure durch den starken negativ mesomeren Effekt ihrer Nitrogruppen, der zu einem Elektronenabzug aus dem Ring und dadurch zu dessen Positivierung führt.

Die für den Reaktionseintritt notwendige Alkalität kann einmal zu einer Enolisierung des Kreatinins, andererseits zu einer Positivierung des N-Atoms an der Pikrinsäure führen. Wahrscheinlich werden hier die Pole liegen, die zu der Bindung beider Partner beitragen. Genaue Aufschlüsse über die Art der Verbindung und die beteiligten Gruppen können aber nur eingehende Analysen der IR-Spektren geben.

Die Jaffé-Reaktion stellt nach allen bisher erhobenen Befunden eine Gleichgewichtsreaktion dar, die formal durch

$$\frac{[\text{Pikrinsäure-Kreatinin}]}{[\text{Kreatinin}] [\text{Pikrinsäure}]} = K$$

dargestellt werden kann (12). Auf Grund unserer Ergebnisse bei extremer Variation der Parameter müssen wir jedoch einen noch komplizierteren Reaktionsmechanismus annehmen. Da das Maximum der Farbintensität erst dann erreicht wird, wenn der Kreatininhalt der Lösung die Pikrinsäure-Konzentration überschreitet, kann sich nicht alles vorhandene Kreatinin an der Reaktion beteiligt haben, was durch die Annahme eines Gleichgewichtes zwischen reagibler Enol- und inerter Ketoform des Kreatinins zu erklären ist. Die Lage dieses Gleichgewichtes wird im wesentlichen von der Konzentration der Natronlauge beeinflusst. Eine Erhöhung derselben führt aber nicht zu der erwarteten Steigerung der Farbintensität, sondern zur Farbblöschung. Ein weiterer Reaktionsmechanismus muß daher das Geschehen komplizieren.

Auf Grund einer wenig bekannten Tatsache lassen sich hierüber gewisse Schlüsse ziehen. Die Pikrinsäure ist mit drei Nitrogruppen substituiert, an die sie nach ihrer Aufrichtung in alkalischem Milieu je ein Kreatinin-

molekül anlagern kann. Es besteht daher die Möglichkeit einer Bildung von Di-Kreatinin-Pikrinsäure bei einem Überschuß von NaOH oder Kreatinin. Tatsächlich konnte aus einer Lösung mit einer gegenüber der Pikrinsäure-Konzentration hohen Kreatinin- und NaOH-Konzentration eine Verbindung aus einem Molekül Pikrinsäure und zwei Molekülen Kreatinin isoliert werden (6), die in alkalischer Lösung keine Rotfärbung aufwies. Neben dem Keto-Enol-Gleichgewicht kann bei der Jaffé-Reaktion noch ein Gleichgewicht zwischen Kreatinin-Pikrinsäure und Di-Kreatinin-Pikrinsäure bestehen, das sich bei einer Erhöhung der Kreatinin- oder NaOH-Konzentration zugunsten der Di-Kreatinin-Pikrinsäure-Bildung verschiebt.

Schlußbetrachtung

Ungeachtet der noch offenen Probleme können wir aus den vorliegenden spektroskopischen und chromatographischen Untersuchungen der Jaffé-Reaktion mit Kreatinin folgende Schlüsse ziehen:

1. Das für die Rotfärbung der Lösung verantwortliche Reaktionsprodukt ist sicher keine Pikraminsäure. Es handelt sich um ein Assoziat aus Pikrinsäure und Kreatinin, das keine reine kovalente Bindung besitzt und nur in alkalischen Lösungen stabil ist.
2. Die Reaktion stellt eine mehrschichtige Gleichgewichtsreaktion dar, die unter Umständen zur Bildung weiterer Pikrinsäure-Kreatininassoziate mit anderem Farbverhalten führt.
3. Zu hohe NaOH- und Kreatininkonzentrationen müssen bei der Jaffé-Reaktion vermieden werden. Maximale Extinktionen werden bei NaOH-Konzentration von 0,05–0,06N erhalten (Abb. 3). Bei vielen Methoden liegen sie aber um 0,2N NaOH. Da die kreatinin-induzierte Farblöschung bei hohen NaOH-Konzentrationen schneller eintritt, sollte diese auch wegen des sehr kleinen proportionalen Verhältnisses von Extinktion zur Kreatininkonzentration niedergehalten werden.
4. Die Linearität der Eichkurve bei 490 nm kann nur bis zu 8, höchstens 10 mg/100 ml Kreatinin gewährleistet werden. Im langwelligen Teil (bis zu 550 nm) steigt sie bis zu 100 und mehr mg/100 ml an. Eine Messung außerhalb des relativen Maximums (490 nm) sollte daher vorgezogen werden.
5. Unterschiede in der NaOH-Konzentration zwischen Leerwert, Standard und Probe sind auf jeden Fall zu vermeiden. Die Standards sollten eiweißhaltig sein und wie Serum behandelt werden, sofern die gebräuchlichen Methoden zur Kreatininbestimmung herangezogen werden.

Literatur

1. JAFFÉ, M., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 10, 391 (1886). — 2. DUBACH, U. C., I. METZ und P. SCHMID, Klin. Wschr. 45, 621 (1967). — 3. GREENWALD, I., J. biol. Chemistry 80, 104 (1928). — 4. REISSERT, A., Chem. Ber. 37, 831 (1904). — 5. GREENWALD, I., J. Amer. chem. Soc. 47, 1440 (1925). — 6. GREENWALD, I., J. biol. Chemistry 77, 539 (1928). — 7. ANSLOV, W. K. und H. KING, J. Chem. Soc. London 1210 (1929). — 8. CHAPMAN, Analyst 34, 475 (1909). — 9. DOX, A. W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. (1925). — 10. PILSUM, J. F. VAN, R. P. MARTIN, E. KIRO und J. HESS, J. biol. Chemistry 222, 225 (1956). — 11. WEISSE, W. und C. TROPP, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 178, 125 (1928). — 12. DUNICZ, B. L., Clin. chim. Acta Amsterdam 9, 203 (1964).

Dr. H. P. Seelig
1 Berlin 19
Patholog. Institut
der Freien Universität
im Klinikum Westend