

## Literatur

1. VESTERGAARD, P., *Acta endocr., K'hvn. Supp.* 64, 50 (1964). —
2. BURSTEIN, S. und S. LIEBERMAN, *J. biol. Chemistry* 233, 331 (1958). —
3. DE WATTEVILLE, H., R. BORTH und M. GSELL, *J. Clin. Endocr., Springfield* 8, 962 (1948). —
4. BONGIOVANNI, A. M. und W. R. EBERLEIN, *Analytic Chem.* 30, 388 (1958). —
5. MARTIN, M. M., W. J. REDDY und G. W. THORN, *J. Clin. Endocr., Springfield* 21, 923 (1961). —
6. STARKA, L. und J. MALIKOVA, *J. Endocr.* 22, 215 (1961). —
7. OERTEL, G. W. und K. GROOT, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 11, 512 (1965). —
8. LIPSKY, S. R. und R. A. LANDAWNE, *Analytic Chem.* 33, 818 (1961). —
9. WOTIZ, H. H. und H. F. MARTIN, *J. biol. Chemistry* 236, 1312 (1961). —
10. VANDENHEUVEL, W. J. A., C. C. SWEeley und E. C. HORNING, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 3481 (1962). —
11. HORNING, E. C., W. J. A. VAN DENHEUVEL und B. G. CREECH, *Methods of Biochem. Analysis*, Vol. 2, Interscience, New York (1963). —
12. WOTIZ, H. H., *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 69, 415 (1963). —
13. JANSEN, A. P., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 8, 785 (1963). —
14. FRANCE, J. T., R. RIVERA, N. L. MCNIVEN und R. I. DORFMAN, *Steroids* 5, 687 (1965). —
15. HAMMOND, K. B. und H. LEACH, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 11, 584 (1965). —
16. KLOPPER, A., E. A. MICHIE und J. B. BROWN, *J. Endocr.* 12, 209 (1955). —
17. PETERSON, R. E., J. B. WYNGAARDEN, S. L. GUERRA, B. B. BRODIE und J. J. BUNIM, *J. Clin. Invest.* 34, 1779 (1955). —
18. BONGIOVANNI, A. M., W. R. EBERLEIN und J. CARA, *J. Clin. Endocr., Springfield* 14, 409 (1954). —
19. FINKELSTEIN, M. und J. SHOENBERGER, *J. Clin. Endocr., Springfield* 19, 608 (1959).

Dr. H.-Ch. Curtius

CH 8032 Zürich, Steinwiesstr. 75

## Bestimmung von Kreatin in Serum und Urin

Von K. LAUBER

*Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. med. H. Aebi)*

(Eingegangen am 20. September 1965)

Eine einfache Methode zur Bestimmung von Kreatin in Serum und Urin mit der Diacetylreaktion wird beschrieben. Das Serum wird mit Perchlorsäure enteiweißt. Enteiweißtes Serum bzw. Urin werden mit einem Farbreagensatz bestehend aus Diacetyl und 1-Naphthol in Natronlauge zur Reaktion gebracht und photometriert. Die Messung der Extinktion nach zwei verschiedenen Zeiten erlaubt eine Korrektur des durch andere Guanidinderivate verursachten Fehlers. Die optimalen Reaktionsbedingungen werden diskutiert. Der Normalbereich im Serum wird ermittelt.

A simple method is described for the determination of creatine by the diacetyl reaction in serum and urine. The serum is deproteinised with perchloric acid. Deproteinised serum or urine is reacted with a colorimetric reagent consisting of diacetyl and 1-naphthol in sodium hydroxide solution and the colour is measured photometrically. By measuring the extinction at two different time intervals, a correction may be made for the interference by other guanidine derivatives. The optimal reaction conditions are discussed. The normal values for serum are reported.

Für die Ermittlung des Kreatingehaltes von biologischen Flüssigkeiten stehen heute im wesentlichen *drei Analysetypen* zur Verfügung: I. Photometrische Bestimmung als Kreatinin nach vorangehender Zyklisierung im sauren Milieu in der Wärme; II. Photometrische Bestimmung nach Überführung in roten Farbstoff mittels Diacetyl und  $\alpha$ -Naphthol (*Barritt-Reaktion*); III. Enzymatische Bestimmung im optischen Test nach WARBURG.

Im klinischen Labor sind Kreatinbestimmungen relativ selten. Es besteht daher das Bedürfnis nach einer Methode, die auch bei nur sporadischem Gebrauch mit möglichst geringem Aufwand möglichst zuverlässige Resultate liefert. Die nach Prinzip I arbeitenden Methoden sind von vornherein wenig geeignet, weil sie für jede Probe zwei Analysen erfordern (Kreatininbestimmung vor und nach Zyklisierung des Kreatins) und bei Gegenwart großer Mengen von präformiertem Kreatinin ungenau sind. Es sind außerdem zahlreiche Bedenken gegen diesen Analysetyp erhoben worden, wie gegen die relative Ungenauigkeit der Pikratmethode an sich (1); Zerstörung von Kreatinin durch das Erhitzen (2); Bildung von unspezifischen Chromogenen (3); unvollständige Umwandlung des Kreatins in Kreatinin bei Gegenwart von viel präformiertem Kreatinin (Gleichgewichtsbildung) (4). Die auf Prinzip III basierenden Verfahren besitzen wohl eine nicht zu überbietende Spezifität und

haben für wissenschaftliche Reihenuntersuchungen entschieden den Vorrang. Bei seltener Anwendung sind aber auch sie umständlich und teuer, wegen der beschränkten Haltbarkeit der vielen Hilfspräparate (drei Enzyme, Adenosintriphosphat, Nikotinamid-adenin-dinukleotid, Phospho-enolpyruvat). ANDERSON und Mitarbeiter (5) haben eine auf der *Barritt-Reaktion* aufbauende Methode beschrieben, welche eine genaue und spezifische Erfassung des Kreatins in Serum und Urin ermöglicht. Die Verwendung von mehreren Ionenaustauschern in Serie macht das Verfahren zeitraubend und für die nicht besonders geschulte Arbeitskraft wenig geeignet. Auch ist der Serumbedarf (3–6 ml) für heutige Begriffe zu hoch. Das Verfahren von ABELIN und RAAFLAUB (1,6) ist wohl einfach, liefert aber zu kleine Extinktionen und läßt die Störfaktoren im Serum unberücksichtigt. Im folgenden wird eine Methode beschrieben und diskutiert, welche mit einem Minimum an Aufwand eine für klinische Belange hinreichend genaue Kreatinbestimmung in Serum und Urin erlaubt.

## Methodik

## Reagenzien

1. Perchlorsäure 6g/100 ml (0,6 n): 5,2 ml 70-proz. Säure mit Wasser ad 100 ml (unbeschränkt haltbar).
2. Diacetyl: 0,5 ml/100 ml Wasser (bei 4° praktisch unbeschränkt haltbar).

3.  $\alpha$ -Naphthol: Verfärbtes Material kann wie folgt umkristallisiert werden: 10 g Naphthol werden mit 50 ml Alkohol + 450 ml Wasser unter gelegentlichem Schütteln zum Sieden erhitzt. Das geschmolzene Naphthol geht dabei nicht vollständig in Lösung. Die dunklen Oxydationsprodukte reichern sich in der Schmelze an. Die überstehende Lösung wird heiß durch ein weiches Papierfilter filtriert. Allfällig mitgerissene dunkle Naphtholtröpfchen bleiben dabei größtenteils am Papier kleben. Das nun milchig gewordene Filtrat wird auf 0° abgekühlt. Die ausgefallenen weißen Naphtholnadeln werden abfiltriert, getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.
4. Farbreagenz für Serum: 10 ml 2 n NaOH + 400 mg Naphthol + 0,2 ml Diacetylverdünnung 2; *unmittelbar* vor Gebrauch herstellen.
5. Farbreagenz für Urin: 20 ml 0,5 n NaOH + 300 mg Naphthol + 0,15 ml Diacetylverdünnung 2; *unmittelbar* vor Gebrauch herstellen.
6. Kreatinstandard für *Serumanalysen*: 10 mg Kreatin p. a. mit Wasser ad 500 ml lösen (2 mg/100 ml).
7. Kreatinstandard für *Urinanalysen*: 10 mg Kreatin mit Wasser ad 100 ml lösen.

### Arbeitsweise

#### Serum

Serumproben, Zentrifugengläschen und Perchlorsäure sollen nach Möglichkeit im Kühlschrank vorgekühlt werden. Bei Zimmertemperatur ist die Enteiweißung ab und zu nicht ganz vollständig (opaleszenter Überstand nach dem Zentrifugieren).

In Zentrifugengläschen werden je 0,4 ml Serum bzw. Standardlösung 6 bzw. Wasser mit 2 ml Perchlorsäure 1 gut gemischt. Nach ungefähr 20 Min. Stehen wird bei 1000—1500 g (2500—3500 U./Min.) 10 Min. zentrifugiert. Vom klaren Überstand bzw. von der Standard- und Leerprobe werden je 1,8 ml in Reagenzglaschen übergeführt. Nach Starten der Stoppuhr wird alle 20 Sek. eine Probe mit 1 ml Farbreagenz 4 gemischt. Alle Proben werden genau 15 Min. und die Serumproben ein zweitesmal genau 30 Min. nach Reagenzzusatz gegen die Leerprobe photometriert (das Absorptionsmaximum liegt bei 525 m $\mu$ ; bei der Hg-Linie 546 m $\mu$  ist die Extinktion etwa 85% des Maximums).

Berechnung des Kreatingehaltes:

$$\frac{E_{Se15} - 2(E_{Se30} - E_{Se15})}{E_{St}} \cdot 2 = \text{mg}/100 \text{ ml}$$

$E_{Se15}$  bzw.  $E_{Se30}$ : Extinktion der Serumprobe nach 15 bzw. 30 Min.

$E_{St}$ : Extinktion der Standardprobe nach 15 Min.

(Erläuterung der Formel s. Abschnitt *Spezifität*).

#### Urin

Für jede Urinprobe werden 2 Reagenzglaschen mit „U“ und „St“ markiert. Ein weiteres Gläschen für die Leerprobe wird mit „L“ bezeichnet. In „L“ werden 40  $\mu$ l Wasser gegeben, in „U“ 20  $\mu$ l Urin + 20  $\mu$ l Wasser und in „St“ 20  $\mu$ l Urin + 20  $\mu$ l Standardlösung 7. Nach Starten der Stoppuhr wird alle 20 Sek. eine Probe mit 2 ml Farbreagenz 5 gemischt. Alle Proben werden genau 15 Min. und die Proben „U“ ein zweitesmal genau 29 Min. nach Reagenzzusatz gegen die Leerproben photometriert (525 m $\mu$  oder Hg 546 m $\mu$ ).

Berechnung des Kreatingehaltes:

$$\frac{2E_{U15} - E_{U29}}{E_{St} - E_{U15}} \cdot 10 = \text{mg}/100 \text{ ml}$$

$E_{U15}$  bzw.  $E_{U29}$ : Extinktion der Urinprobe nach 15 bzw. 29 Min.

$E_{St}$ : Extinktion der Urinprobe mit dem inneren Standard nach 15 Min.

(Erläuterung der Formel s. Abschnitt *Spezifität*).

### Diskussion

#### Wahl des Enteiweißungsmittels

Trichloressigsäure ist zur Enteiweißung ungeeignet, weil sie unter Lichteinwirkung die Diacetyl-Farbreaktion stört (7). ABELIN und RAAFLAUB (6) verwenden Metaphosphorsäure. Diese hat den Nachteil, daß sie nur kurzfristig haltbar ist, was sich bei einer selten ausgeführten Analyse unangenehm auswirkt. Die hier verwendete Perchlorsäure ist unbeschränkt haltbar und hat keine störende Wirkung auf die Farbentwicklung. Die von ANDERSON (5) geäußerte Befürchtung, das Serumkreatin werde durch die Gegenwart von starken Säuren teilweise zu Kreatinin zyklisiert, hat sich für die Perchlorsäure als unbegründet erwiesen. Proben von 0,3 ml Kreatinlösung (5 mg/100 ml) wurden mit je 1,5 ml 6-proz. Perchlorsäure gemischt und vor dem Farbreagenzzusatz verschieden lange stehengelassen.

Min. Inkub.	Extinktion
0	0,840
20	0,845
40	0,835
60	0,835

#### Optimale Reagenzienkonzentrationen

Einige orientierende Vorversuche zeigten, daß weder die Angaben von ABELIN (6) noch diejenigen von ANDERSON (5) optimale Reaktionsbedingungen für die *Serumanalyse* darstellen. Bei Umrechnung auf gleiche Serum- und Probenendvolumen liefert die Methode ABELIN 65%, die Methode ANDERSON 73% der hier erreichten Maximalextinktion. Bei der Ermittlung der optimalen Reagenzienkombination wurden alle Volumina und auch die Konzentration der Perchlorsäure konstant gehalten. Variiert wurde die Konzentration des Naphthols (10, 20, 30, 40, 50 mg pro Ansatz), des Diacetyls (10, 20, 30, 40  $\mu$ l 0,5-proz. Lösung pro Ansatz) und der Natronlauge (6-, 8-, 10-, 12-proz. Lösung). Unter den 80 durchgetesteten Kombinationen dieser 3 Variablen erwies sich die oben angeführte als die günstigste. Abbildung 1 zeigt eine Auswahl von drei Kurvenscharen, welche die zeitliche Abhängigkeit der Extinktion darstellen. Zwei Konzentrationen sind dabei jeweils auf dem Optimum gehalten, die dritte wird variiert. Der Extinktionszuwachs bei Erhöhung der Naphtholmenge von 40 auf 50 mg beruht fast nur noch auf der Zunahme des Leerwertes. Eine Naphtholkonzentration von mehr als 40 mg pro Ansatz ist daher nicht zu empfehlen. ENNOR und STOCKEN (8) kamen bei ihren Urinexperimenten zu einem ähnlichen Ergebnis (160 mg Naphthol/10 ml Endvolumen, entspr. 45 mg/2,8 ml).

Bei der *Urinanalyse* fällt der Perchlorsäurezusatz weg. Um die gleiche Endkonzentration an Naphthol, Diacetyl und Alkali zu bekommen wie bei der Serumanalyse, wurden die Reagenzienmengen sinngemäß korrigiert. EGGLETON (7) fand, daß die Farbausbeute durch Zusatz von Soda erhöht wird. Bei Befolgung seiner Vorschrift fanden wir tatsächlich eine Extinktionssteigerung von

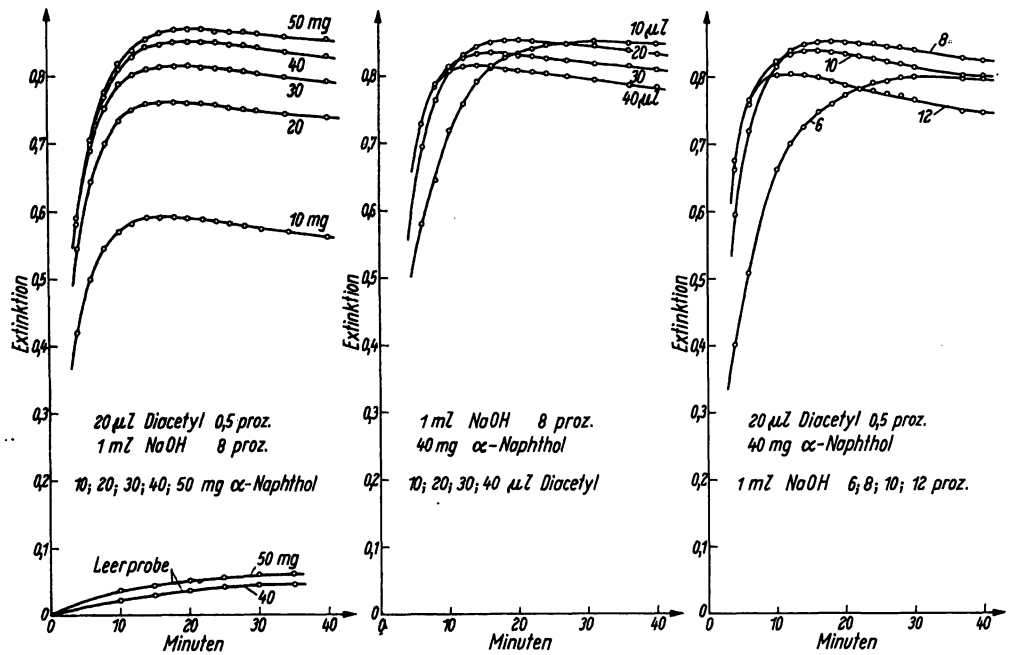


Abb. 1  
Ermittlung der optimalen Reagenzienkonzentrationen

etwa 7% durch den Carbonatzusatz. Bei Verwendung der oben vorgeschlagenen Reagenzienkombination erhält man dagegen mit und ohne Soda praktisch identische Extinktion-Zeit-Kurven. Das Natriumcarbonat kann somit ohne jeden Nachteil weggelassen werden. — Das Beersche Gesetz ist unter den angegebenen Bedingungen bis zu Konzentrationen von mindestens 10 mg Kreatin/100 ml Serum bzw. mindestens 80 mg/100 ml Urin gültig.

Zusatzversuche

Serum

Eine Reihe von 43 Seren von Blutspendern (23 Frauen, 20 Männer) wurde einerseits direkt und andererseits nach Zusatz von je 20 µg Kreatin pro ml analysiert. Das zugesetzte Kreatin wurde in der für die Eiweißfällung benutzten Perchlorsäure aufgelöst. Die Wiederfindungsquote betrug im Mittel 96,2% bei den Frauen und 95,7% bei den Männern ( $s = \pm 1,8\%$ ). Die beiden tiefsten Werte waren 92,0 und 92,7%, die beiden höchsten 99,3 und 100%. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den von GRIFFITH (9) für den „Autoanalyzer“ gemachten Beobachtungen. Der Einfluß von serum-eigenen Inhibitoren ist somit gering und rechtfertigt kaum das Arbeiten mit einem inneren Standard.

Urin

Bei 10 Urinproben war die mittlere Wiederfindungsquote wie beim Serum 96%. Bei verdünntem Urin betrug sie nahezu 100%, bei konzentriertem dagegen z. T. knapp 90%. Für eine genaue Harnanalyse empfiehlt sich somit die Verwendung eines inneren Standards, wie oben vorgeschlagen.

Spezifität

Die Barritt-Reaktion ist, wie seit langem bekannt, nicht spezifisch für Kreatin. Eine Vielzahl von anderen Guanidin-Abkömmlingen geben eine ähnliche, wenn auch im allgemeinen schwächere Farbreaktion.

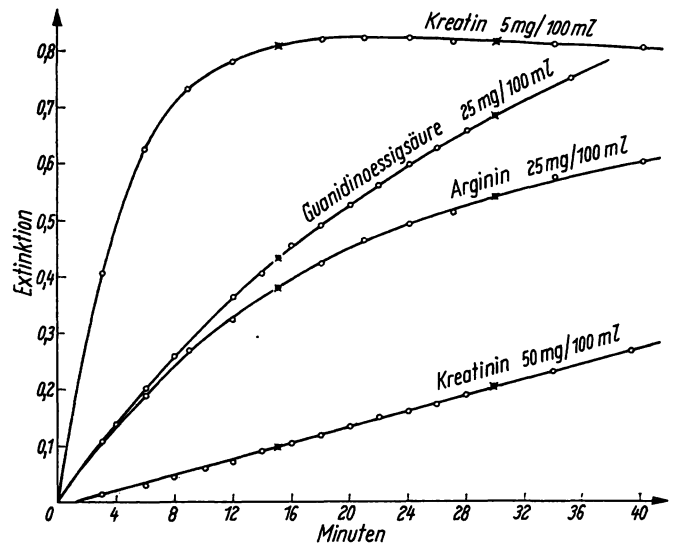


Abb. 2  
Barritt-Reaktion verschiedener Guanidinderivate  
Jeweils 0,3 ml Testlösung + 1,5 ml HClO<sub>4</sub> 6-proz. + 1 ml 8-proz. NaOH mit 20 µl 0,5-proz. Diacetylsg. + 40 mg α-Naphthol gegen Leerprobe photometriert.

Serum

Im Serum wird die Kreatinanalyse nur durch Arginin, Guanidinoessigsäure und Kreatinin wesentlich verfälscht. Für die drei Stoffe gelten folgende Normalwerte: Arginin: 1,1—3,6 mg/100 ml (Mittel 2,3) (10); Guanidinoessigsäure 0,24—0,28 mg/100 ml (11); Kreatinin 0,7—1,2 mg/100 ml (Mittel 0,9) (eigene Messungen). Abbildung 2 zeigt die Zeitabhängigkeit der Farbstoffbildung für die vier fraglichen Guanidinderivate. Bei Ableseung 15 Min. nach Reagenzzusatz verhalten sich die Extinktionen bei gleichem Prozentgehalt der Lösungen wie folgt:

Kreatin : Arginin : Guanidinoessigsäure : Kreatinin wie 100 : 9,4 : 10,6 : 1,2.

Die Extinktion ändert sich für das Kreatin nach 15 Min. praktisch nicht mehr, während sie bei den drei anderen Derivaten in unterschiedlichem Maß weiter ansteigt. Wird die Extinktion einer Serumprobe nach 15 Min. abgelesen, so wird der Kreatinwert bei Annahme obiger Mittelwerte wie folgt verfälscht: (Werte in mg/100 ml) durch Arginin: + 0,22; durch Guanidinoes.: + 0,03; durch Kreatinin: + 0,01; Total: + 0,26. Dieser Fehler macht gut die Hälfte des mittleren „wahren“ Serumkreatins aus und darf nicht vernachlässigt werden. Er läßt sich aber durch eine einfache Korrektur weitgehend eliminieren. Wird die Extinktion genau nach 15 und 30 Min. abgelesen, dann ergibt sich für die vier reinen Substanzen:

Kreatin	$E_{30}-E_{15} = \Delta E = 0,01 \cdot E_{15}$
Arginin	$\Delta E = 0,42 \cdot E_{15}$
Guanidinoessigsäure	$\Delta E = 0,58 \cdot E_{15}$
Kreatinin	$\Delta E = 1,05 \cdot E_{15}$

Zusatzversuche mit Arginin anhand von 5 Seren zeigten, daß die Zuwachsrate der Extinktion in den zweiten 15 Min. weitgehend konstant ist (40–44% von  $E_{15}$ ). Für Kreatinin und Guanidinoessigsäure wurde auf Zusatzversuche verzichtet, da deren Störwirkung bedeutend weniger ins Gewicht fällt als die des Arginins. Für die drei binären Lösungsgemische berechnet sich die auf reines Kreatin korrigierte Extinktion wie folgt:

Kreatin/Arginin	$E_{\text{kor}} = E_{15} - \frac{\Delta E}{0,42}$
Kreatin/Guanidinoessigs.	$E_{\text{kor}} = E_{15} - \frac{\Delta E}{0,58}$
Kreatin/Kreatinin	$E_{\text{kor}} = E_{15} - \frac{\Delta E}{1,05}$

In einem beliebigen quaternären Gemisch dieser vier Substanzen läßt sich  $E_{\text{kor}}$  natürlich nicht berechnen. Da aber der Beitrag von Guanidinoessigsäure und Kreatinin im Mittel eine Größenordnung kleiner ist als der des Arginins, dürfen obige Rechnungen mit guter Näherung in folgende Formel zusammengefaßt werden:

$$E_{\text{kor}} = E_{15} - \frac{E_{30} - E_{15}}{0,5} = E_{15} - 2 \Delta E.$$

Bei Annahme der oben angeführten mittleren Konzentrationen von Arginin, Kreatinin und Guanidinoessigsäure bleibt bei Gebrauch dieser Näherungsformel noch ein Fehler von etwa + 0,02 mg/100 ml Kreatin (entsprechend einer Extinktion von etwa 0,003). Durch die Wirkung der serumeigenen Inhibitoren (vgl. „Zusatz-

versuche“) wird dieser Restfehler auch noch kompensiert. Bei normalem Arginin- und Guanidinoessigsäure-Spiegel und einem Kreatiningehalt von 5 mg/100 ml wird der Fehler für das Kreatin etwa — 0,03 mg/100 ml. Bei stark pathologischem Kreatiningehalt empfiehlt es sich, dieses gesondert zu bestimmen. 10 mg Kreatinin täuschen etwa 0,12 mg Kreatin vor.

#### Urin

Im Harn werden die Kreatinwerte in erster Linie durch den hohen Kreatiningehalt verfälscht. Zur Korrektur dieses Fehlers haben wir uns im wesentlichen auf die Angaben von RAAFLAUB und ABELIN (1) gestützt. Mit 9 verschiedenen Urinproben wurden Zusatzversuche mit 5 mg Kreatinin/ml Urin gemacht. Nach 7,5, 15, 22,5 und 30 Min. wurde die Extinktionsdifferenz zwischen „Nativprobe“ und „Zusatzprobe“ abgelesen. Die graphische Darstellung dieser vom zugesetzten Kreatinin verursachten Extinktionsunterschiede in Abhängigkeit von der Zeit ergibt für alle Urinproben eine Gerade. Deren Schnittpunkt mit der Zeitachse liegt aber nicht bei 0, sondern zwischen 0,5 und 1,5 Min. Dieser verzögerte Beginn der Farbstoffbildung aus dem Kreatinin, das durch Hydrolyse erst in Kreatin übergeführt wird, ist bereits von ENNOR und STOCKEN (8) festgestellt worden. Bei Befolgung der oben vorgeschlagenen Arbeitsweise ist aber die Schnittpunktverschiebung geringer als von jenen Autoren angegeben. Die Extinktion für das Urinkreatin läßt sich somit wie folgt korrigieren:

$$E_{\text{kor}} = E_{15} - (E_{29} - E_{15}) = 2E_{15} - E_{29}.$$

Die zweite Extinktionsmessung bei 29 statt bei 30 Min. kompensiert den um durchschnittlich 1 Min. verzögerten Start der Farbreaktion beim Kreatinin.

#### Normalwerte im Serum

Anhand von 43 Seren (23 Frauen, 20 Männer) wurden unter Verwendung der oben beschriebenen Methode folgende Normalwerte ermittelt:

*Frau:* Mittelwert 0,44 mg/100 ml;  
s = 0,24 · Höchstwert 0,94, Tiefstw. 0,11

*Mann:* Mittelwert 0,32 mg/100 ml;  
s = 0,11 · Höchstwert 0,53, Tiefstw. 0,14.

Als Vergleich seien die von TIERNEY und PETERS (12) nach der Pikratmethode bestimmten Werte angegeben:

*Frau:* Bereich 0,35–0,93 mg/100 ml;

*Mann:* Bereich 0,17–0,50 mg/100 ml.

#### Literatur

1. RAAFLAUB, J. und I. ABELIN, *Biochem. Z.* 321, 158 (1950). — 2. ALBANESE, A. A. und D. M. WANGERIN, *Science (New York)* 100, 58 (1944). — 3. LINNEWEH, F. und N. LINNEWEH, *Klin. Wschr.* 13, 589 u. 1581 (1934). — 4. BRINKERINK, P. C., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 6, 531 (1961). — 5. ANDERSON, D. R., C. M. WILLIAMS, G. M. KRISSE und R. M. DOWBEN, *Biochem. J.* 67, 258 (1957). — 6. ABELIN, I. und J. RAAFLAUB, *Biochem. Z.* 323, 382 (1952). — 7. EGGLE-

TON, P., S. R. ELSDEN und N. GOUGH, *Biochem. J.* 37, 526 (1943). — 8. ENNOR, A. H. und L. A. STOCKEN, *Biochem. J.* 55, 310 (1953). — 9. GRIFFITHS, W. J., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 9, 210 (1964). — 10. KREBS, H. A., *Annu. Rev. Biochem.* 19, 411 (1950). — 11. HOBERMANN, H. D., *J. biol. Chemistry*, 167, 721 (1947). — 12. TIERNEY, N. A. und J. P. PETERS, *J. Clin. Invest.* 22, 595 (1943).

Dr. chem. Konrad Lauber  
Medizinisch-Chemisches Institut der Uni-  
versität Bern (Schweiz), Bülhstraße 28