

CHROM. 4217

PRÄPARATION VON REINEM MYOGLOBIN MITTELS DER GELCHROMATOGRAPHIE

KARL BÜNNIG UND REINER HAMM

Institut für Chemie und Physik, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach/Ofr. (B.R.D.)

(Eingegangen am 4. Juni 1969)

SUMMARY

Preparation of pure myoglobin by means of gel chromatography

A widely applicable method for the preparation of pure myoglobin is described. The total myoglobin present in an aqueous extract from muscle tissue can be isolated. The procedure of preparation includes fractionation of the extracted proteins by heat treatment and Sephadex chromatography for a complete separation of myoglobin from hemoglobin. After desalting and concentration of the myoglobin solution by a membrane filtration procedure, pure metmyoglobin can be obtained by lyophilisation.

EINLEITUNG

Die Isolierung von Myoglobin (Mb) aus dem Muskelgewebe verschiedener Individuen bringt wegen der unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Mb Schwierigkeiten mit sich.

So haben Säugetier-Mb in der Regel Molmassen zwischen 17000 und 20000, manche Mollusken-Mb jedoch Molmassen von 31000 bis 34000¹⁻³. Mb sind—soweit uns bekannt ist—zwar stets aus den gleichen 16-18 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut⁴⁻⁷, aber nur die Hälfte der durch tryptischen und chymotryptischen Abbau erhaltenen Peptide zeigt Übereinstimmung⁸. Trotz der Gleichartigkeit der Mb aus verschiedenen anatomischen Bereichen eines Tierkörpers⁹ gilt es heute als sicher, dass—wie beim Hämoglobin (Hb)—neben den Adult-Mb foetale Mb¹⁰⁻¹² und weitere Abwandlungen existieren, die sich durch verschiedene Löslichkeit, Molmasse und optische Eigenschaften unterscheiden können. Auch isoelektrischer Punkt¹³, Hämanteil¹⁴, Kristalltyp¹⁵ und Thermostabilität¹⁶⁻¹⁸ können voneinander abweichen.

Eine allgemein anwendbare Methodik zur Isolierung von Mb sollte so beschaffen sein, dass sie von diesen Unterschieden sowie von den durch Alter und Krankheit bedingten Veränderungen im Gehalt an Mb-Varianten¹⁹⁻²² möglichst wenig beeinflusst wird. Hier ergeben sich jedoch, wie die vielen Publikationen über die Präparation von Mb bestätigen, Schwierigkeiten. Keines der uns bekannten Isolierungsverfahren verzichtet auf die mühevoll Vorreinigung der Extraktionslösungen durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat oder Phosphat²³⁻³¹. Auch deren Kombination mit

einer Bleiacetat-Fällung³²⁻³⁴ und/oder ionenaustausch-chromatographischen Methoden³⁵⁻⁴³ zeigt, dass die Methodik der Isolierungsschritte von Tierart zu Tierart neu entwickelt werden musste.

Da es für exakte Mb-Gehaltsbestimmungen in Muskelgeweben, die in der Regel photometrisch durchgeführt werden, notwendig ist, bei der Ermittlung eines Extinktionskoeffizienten die oben angedeuteten artspezifischen Unterschiede zu berücksichtigen, suchten wir nach einer allgemein anwendbaren Präparationstechnik. Seit 1963 wurden einige Arbeiten über die chromatographische Trennung von Hb und Mb an Säulen mit Sephadex- und Epidex-Gelen veröffentlicht⁴⁴⁻⁴⁹. Sie erschienen uns erst nach Verbesserung der Hb-Mb-Trennung dazu geeignet, für eine breiter anwendbare Präparationsmethode verwendet zu werden.

MATERIAL UND METHODEN

Material

Als Ausgangsmaterial der Mb-Gewinnung diente frische oder tiefgefrorene Herz- oder Skelettmuskulatur (von Rind und Schwein), die von Fett, Sehnen und Faszien weitgehend befreit war.

Lösungen

0.1 M Hexacyanoferrat (III)-Lösung.

Tris-HCl-Puffer, pH 7.95 ± 0.05 (20°): 0.05 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 0.05 M Natriumchlorid und 0.001 M Äthylendiamintetraessigsäure-dinatrium-Salz.

1 %ige AgNO₃-Lösung.

Herstellung des Muskelextraktes für die Gel-Chromatographie

Das Muskelgewebe wurde mit einem Fleischwolf (4 mm-Scheibe) grob vorzerkleinert und dann mit der gleichen Gewichtsmenge feinzerstossenem Eis (aus entmineralisiertem Wasser) homogenisiert (Ultra-Turrax oder Bühler-Homogenisator). Der resultierende Fleischbrei wurde in einer Kühlzentrifuge (3°) 15 min bei ca. $35000 \times g$ zentrifugiert. Der klare rote Überstand wurde dekantiert und durch ein Faltenfilter (Macherey u. Nagel, Düren, Typ No. 615, 1/4) filtriert. Der Rückstand wurde erneut mit der seinem Gewicht entsprechenden Eismenge homogenisiert und — wie oben angegeben — zentrifugiert. Dieser zweite Extrakt wurde mit dem ersten vereinigt. Eine dritte Extraktion erhöhte die Ausbeute nur unwesentlich. Der wässrige Extrakt wurde unter Rühren 10 min auf 50° erwärmt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Vervollständigung der Oxydation wurde nun ein grosser Überschuss an Hexacyanoferrat(III)-Lösung zugegeben: Je nach Pigmentgehalt des Fleisches 0.05–0.20 ml pro 100 g Gewebe. Die durch die Erwärmung entstandene, fast farblose Proteinfällung wurde 15 min bei ca. $35000 \times g$ (+ 3°) abzentrifugiert und verworfen. Nach Filtrieren wurde der klare braune Überstand durch Membranfiltration in Mb-dichten Kollodium-Hülsen (Sartorius-Membranfiltergesellschaft Göttingen; SM 132 00, Mb-dicht) bis zu fast gesättigten Lösungen konzentriert. Falls eine Trübung in der eingeengten Extraktionslösung auftrat, wurde sie durch 15 min Zentrifugieren bei ca. 5000 r.p.m. (Raumtemperatur) entfernt.

Isolierung des Metmyoglobins durch Sephadex-Chromatographie

Die Gel-Chromatographie wurde in einer präparativen Chromatographie-Säule (K 50/100) an Sephadex G-75 Superfine (Fa. Pharmacia, Schweden) durchgeführt. Das Sephadex wurde im Tris-Puffer gequollen; in Abständen von *ca.* 4 Std. wurde der Überstand über den sedimentierten Gelpartikeln durch frischen Puffer ersetzt. Nach 24 Std. Quellungsdauer bei Raumtemperatur wurde das Gel nach Vorschrift (Firmen-Broschüre "Sephadex® — Gelfiltration in Theorie und Praxis") in die Säule eingefüllt.

Der Tris-Puffer diente auch als Elutionsmittel. Nach Äquilibrierung des Gelbettes, welches zur Fixierung der Gelpartikel am Gelbettanfang mit einem Monodur-Sieb (Maschenweite 375μ) bedeckt war, wurden 25 ml Extrakt (= 1.8% des Gelbettvolumens) auf die Säule gebracht. Mit Hilfe einer Mariotte'schen Flasche konnte eine hinreichend gleichmässige Volumenströmungsgeschwindigkeit in der Säule erreicht werden. In dem breiten Intervall von 0.2 bis 4.0 ml/min \times cm² wurde vollständige Auftrennung von Hb und Mb erzielt; Fig. 1 zeigt diese Auftrennung am Beispiel eines Schweineherz-Extraktes*.

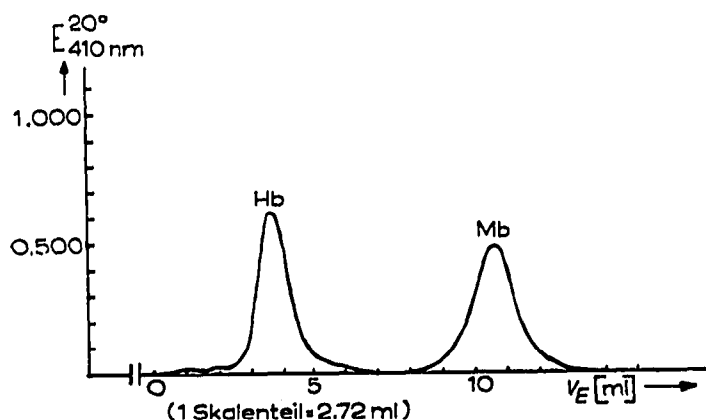


Fig. 1. Chromatogramm eines Schweineherzmuskel-Extraktes.

Es genügt, die Äquilibrierung des Gelbettes und die Gelchromatographie des Extraktes bei Raumtemperatur durchzuführen, da eine Temperatursenkung auf 4° keine Vorteile brachte. Eine photometrische Registrierung der Protein zonen entfiel, da die getrennten braunen Zonen von Met-Hb und Met-Mb gut sichtbar sind. Ein Fraktionssammler nahm das Säuleneluat mit den Komponenten auf. Met-Mb verlässt die Säule nach dem Met-Hb. Sehr viel später treten auch Hexacyanoferrat (III) und Hexacyanoferrat (II) in einer gelben Zone aus der Säule aus. Die Met-Mb-Fractionen wurden vereinigt und mit Hilfe von Kollodium-Hülsen (s.o.) eingengt. Wir benutzten zur Konzentrierung der Mb-Lösung eine einfache Vorrichtung (Membranfilter-Gesellschaft Göttingen), die es möglich machte, gleichzeitig mit der Einengung alle niedermolekularen Bestandteile — nämlich die Salze des Puffers — aus der Lösung zu entfernen: Mit Hilfe eines dünnen Polyäthylenschlauches (Innendurchmesser *ca.* 1 mm)

* Spätere Untersuchungen ergaben, dass bei der wässrigen Extraktion auch Cytochrom *c* extrahiert wird, welches jedoch unter den hier angegebenen chromatographischen Bedingungen fast vollständig von Mb abgetrennt wird (Publikation in Vorbereitung).

wurde die Mb-Lösung kontinuierlich während der Membranfiltration in die Kolloid-Hülsen hinübergesogen. War die Hülse dann bis etwa zur Hälfte mit stark konzentrierter Mb-Lösung gefüllt, wurde das Filtrationssystem mit Wasser aufgefüllt und durchgemischt; an Stelle der Mb-Lösung wurde dann Wasser über den Schlauch in die Hülsen gesogen. Bei diesem "Auswaschprozess" fand in den Hülsen eine Anreicherung des Mb bis zur Sättigung statt, ohne dass der Flüssigkeitsspiegel sich in dem Filtrationssystem unter eine einstellbare Höhe senkte. Waren im Filtrat keine Chlorid-Ionen mehr nachweisbar, so wurde die über der gesättigten Mb-Lösung befindliche farblose Flüssigkeit mit einer Schlauchpipette entfernt; die wässrige Mb-Lösung wurde herausgesogen, filtriert und bei -22° eingefroren. Nach Gefriertrocknung resultierte ein kristallin erscheinendes braunes Produkt, das sich in Wasser wieder klar löste und das sich über Monate unverändert lagern liess, wenn es in Kunststoff-Folien vakuumverpackt (ca. 99 % Vakuum) und vor Lichteinwirkung geschützt bei 4° aufbewahrt wurde. Eine Kristallisation des Met-Mb aus den wässrigen Lösungen kann nach den bekannten Verfahren⁵⁰ erfolgen.

REINHEITSUNTERSUCHUNGEN

Eisenbestimmung

Bei der Anwendung der Sulfosalicylsäure-Methode in der von FRIES⁵¹ beschriebenen Weise mussten wir feststellen, dass bei Veraschung des Mb mit Perchlorsäure und Salpetersäure Nitrokörper entstehen, die mit Sulfosalicylsäure unter den Bedingungen der Farbbildung ebenfalls eine gelbe Lösung liefern. Die Störung konnte durch Veraschung mit Perchlorsäure/Perhydrol vermieden werden. FRIES führte die photometrischen Messungen gegen Wasser aus; wir zogen es vor, gegen eine Blindwertlösung zu messen. Es zeigte sich, dass im pH-Bereich 9.6–11.0 die Farbintensität der Eisen-Sulfosalicylat-Lösungen sich praktisch nicht ändert. Wir bestimmten den Extinktionskoeffizienten zu $k_{420}^{20^{\circ}} = 98.87 \pm 1.25 \text{ ml/mg} \times \text{cm}$ ($\underline{\Delta\epsilon} = 5.522 \cdot 10^3 \text{ l/Mol} \cdot \text{cm}$). Da wir die Lösungen der Verdünnungsreihe auf pH 10.2 eingestellt hatten, wurde auch die Eisenbestimmung in den Veraschungslösungen bei diesem pH-Wert durchgeführt.

Methodik. 10 mg (= a) Met-Mb wurden in einem 25 ml-Weithals-Erlenmeyerkolben mit 0.5 ml Perchlorsäure, ca. 65 %ig, und 0.5 ml Perhydrol über der Sparflamme eines Bunsenbrenners erhitzt. War die Lösung auf ca. 0.5 ml eingedampft, so wurden noch einmal 0.5 ml Perhydrol in die heisse Lösung gegeben und wieder auf ca. 0.5 ml eingedampft. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur resultierte eine farblose Lösung, die mit Wasser auf 10 ml (= V_G) verdünnt wurde (10 ml-Messkolben). 1.0 ml (= V_A) dieser verdünnten Veraschungslösung wurden mit 1.0 ml 10 %iger Sulfosalicylsäure-Lösung (10 g in Wasser zu 100 ml gelöst) und 1.0 ml Ammoniak, ca. 25 %ig, p.a., gemischt und in einem Messkölbchen mit Wasser auf 10 ml (= V_E) verdünnt. Die resultierende gelbe Lösung wurde innerhalb von 3 Std. bei 420 nm in Küvetten von 5 cm Schichtdicke (= s) gegen eine Blindlösung (Reagenzlösungen) bei 20° photometriert (= E).

Die Berechnung des Eisengehaltes (= %Fe) erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\% \text{ Fe} = \frac{E \cdot V_G \cdot 100}{k_{420} \cdot s \cdot a} \cdot \frac{V_E}{V_A} = 2.023 \cdot E$$

Häminbestimmung

Der Hämingehalt wurde nach der Methode von HORNSEY⁵² bestimmt. Aus ihm wurde unter der Annahme, dass in einem Molekül Mb ein Atom Häm-Fe enthalten ist, der Eisengehalt berechnet. Der Bestimmung wurde der von HORNSEY ermittelte molare Extinktionskoeffizient des Hämins, $\epsilon_{640}^{20^\circ} = 4.80 \cdot 10^3$ l/Mol·cm, zugrunde gelegt.

Methodik. 5 mg (= a) Met-Mb wurden in einem spitzen Zentrifugenglas mit ca. 1 ml einer Mischung von Aceton-Wasser-konz. HCl (40:9:1) übergossen, mit einem Glasstab gemischt und dabei möglichst fein zerrieben. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur bei ca. 2500 r.p.m. (10 min) wurde der klare braune Überstand in ein 10 ml-Messkölbchen dekantiert. Diese Extraktion wurde so oft wiederholt (in der Regel genügte eine zweimalige Wiederholung) bis der Überstand farblos war; das ausgefällte Eiweiss war dann ebenfalls farblos. Die vereinigten Extrakte wurden mit der Aceton-Salzsäure-Mischung auf 10 ml (= V_G) aufgefüllt. Die Lösung ist mindestens 5 Std. stabil, wenn sie vor Licht geschützt wird. Es empfiehlt sich, die Aceton-Salzsäure-Mischung täglich neu anzusetzen. Die Häminextraktlösung wurde in 1 cm (= s)-Küvetten bei 640 nm und 20° gegen Aceton-Salzsäure photometriert (= E).

Aus dem Hämingehalt wurde der Eisengehalt (= % Fe) nach folgender Gleichung berechnet (M_{Fe} = Atomgewicht des Eisens = 55.85):

$$\% \text{ Fe} = \frac{E \cdot V_G \cdot 100 \cdot M_{Fe}}{\epsilon_{640} \cdot s \cdot a} = 2.329 \cdot E$$

Elektrophorese

Die Mb-Präparate wurden auf Celluloseacetatfolien in Veronalpuffer (pH 8.6, $\mu = 0.025$) 1.5 Std. bei 200 V der Elektrophorese unterworfen. Die Hämin-haltigen Zonen wurden mit einer Mischung aus 4 %iger o-Tolidin-Lösung (in Äthanol), Eisessig, Wasser und Perhydrol (4:2:3:1) angefärbt. Sämtliche Protein-Zonen wurden mit Amidoschwarz 10 B sichtbar gemacht*.

Extinktionsverhältnis

Die Extinktion bei 280 nm ist ein Mass sowohl für die Konzentration des Proteinteils des Mb als auch für die Konzentration der eventuell in der Lösung vorhandenen Fremdproteine. Die Hämgruppe im Mb hat bei 522 nm (im Tris-Puffer) einen isobestischen Punkt; die Extinktion bei dieser Wellenlänge ist ein Mass für die Konzentration an Häm in der Mb-Lösung. Das Extinktionsverhältnis E_{280}/E_{522} ist für nicht reine Mb-präparate stets grösser als für reine. In Tabelle I sind die Werte für einige isolierte reine Mb-Präparate angegeben.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle I zeigt die Ergebnisse der Reinheitsuntersuchungen an Mb-Präparaten. Die Molmassen wurden aus den Mittelwerten der beiden auf verschiedene Weise ermittelten Eisengehaltswerte berechnet.

In der Literatur werden für den Eisengehalt von Myoglobinen bemerkenswert

* Firmen-Broschüre der Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen.

TABELLE I

ERGEBNISSE DER REINHEITSUNTERSUCHUNGEN AN MYOGLOBINEN VON SIEBEN VERSCHIEDENEN TIEREN

Tierart	Art des Muskelgewebes	E_{280} E_{522}	% Fe (Sulfosalicylsäure Methode)	% Fe (Hämin- Methode)	Elektro- pherogramm: Begleit- proteine	Zahl der Myoglobin- varianten	Molmasse (aus dem Eisengehalt berechnet)
Rind	Herz	4.6	0.287	0.289	keine	4	19 400
Rind	Skelett	4.1	0.302	0.298	keine	3	18 600
Rind	Herz	4.4	0.308	0.288	keine	3	18 700
Rind	Herz	4.6	0.265	0.262	keine	3	21 100
Rind	Herz	— ^a	0.324	0.324	— ^a	— ^a	17 200
Schwein	Skelett	— ^a	0.302	0.298	— ^a	— ^a	18 600
Schwein	Herz	3.81	0.294	0.274	— ^a	— ^a	19 650

^a Nicht ermittelt.

unterschiedliche Werte angegeben, die — je nach Bestimmungsmethode und Tierart — zwischen 0.28 und 0.35 % liegen. Trotz der Streuung der Werte scheint sich eine Häufung um 0.30 abzuzeichnen^{5,7,13,14,24,26,33,53,54}. Bei den von uns untersuchten Mb-Präparaten ist die Übereinstimmung zwischen den nach der Sulfosalicylsäure-Methode und den über die Hämin-Bestimmung ermittelten Eisengehalten befriedigend. Andererseits besteht auch Übereinstimmung mit vergleichbaren Ergebnissen anderer Autoren^{24,32}. Dass in den Pherogrammen nur Myoglobin-Varianten gefunden wurden, spricht ebenfalls für die Reinheit der Präparate.

Im Gegensatz zu den Aussalz-Methoden kann mit der hier beschriebenen Methode auch die Präparation kleinster Mb-Mengen (z.B. Milligramm-Mengen) durchgeführt werden, da praktisch das gesamte in einem Extrakt enthaltene Mb gewonnen werden kann.

DANK

Wir danken Fräulein E. HEISINGER für die ausgezeichnete technische Assistenz.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine allgemein anwendbare Methode zur Präparation von reinem Myoglobin beschrieben. Aus den wässrigen Extrakten von Muskelgeweben kann das gesamte Myoglobin isoliert werden. Dies gelingt mit einer thermischen Fraktionierung der extrahierten Proteine und einer anschließenden Sephadex-Chromatographie, durch welche Myoglobin quantitativ von Hämoglobin getrennt wird. Die so erhaltene Myoglobinlösung wird durch Membranfiltration entsalzt und konzentriert. Aus der entsalzten Lösung wird durch Lyophilisation reines Metmyoglobin gewonnen.

LITERATUR

- 1 K. R. H. READ, *Comp. Biochem. Physiol.*, 17 (1966) 375.
- 2 K. R. H. READ, *Comp. Biochem. Physiol.*, 22 (1967) 1.
- 3 K. R. H. READ, *Comp. Biochem. Physiol.*, 25 (1968) 81.

- 4 L. TENTORI, G. VIVALDI, S. CARTA, E. ANTONINI UND M. BRUNORI, *Nature*, 219 (1968) 487.
- 5 G. T. PERKOFF, R. L. HILL, M. BROWN UND F. H. TYLER, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2820.
- 6 A. ROSSI-FANELLI, D. CAVALLINI UND D. DEMARCO, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 377.
- 7 A. M. DOLLAR, D. BROWN UND H. S. OLCOTT, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1 (1959) 276.
- 8 O. V. TROITSKAYJA, *Biokhimiya*, 33 (1968) 343.
- 9 L. J. KAGEN UND R. GUREVICH, *Immunology*, 12 (1967) 667.
- 10 A. ROSSI-FANELLI, D. CAVALLINI UND D. DEMARCO, *Arch. Biochem. Biophys.*, 50 (1954) 496.
- 11 R. WOLFSON, V. YAKULIS, R. D. COLEMAN UND P. HELLER, *J. Lab. Clin. Med.*, 69 (1967) 728.
- 12 G. B. THEIL UND J. K. WILLIAMS, *Nature*, 213 (1967) 75.
- 13 N. M. RUMEN, *Acta Chem. Scand.*, 13 (1959) 4.
- 14 G. T. PERKOFF, R. T. HILL, D. M. BROWN UND F. H. TYLER, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2820.
- 15 J. C. KENDREW, R. G. PARRISH, J. R. MARRACK UND E. S. ORLANS, *Nature*, 174 (1954) 946.
- 16a F. MATSUURA UND K. HASHIMOTO, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries*, 24 (1959) 809.
- 16b G. ACAMPORA UND J. HERMANS, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 89 (1967) 1543.
- 17 E. S. AWAD UND D. A. DERANLEAU, *Biochemistry*, 7 (1968) 1791.
- 18 H. E. SNYDER UND J. D. AYRES, *J. Food Sci.*, 26 (1961) 469.
- 19 T. A. J. PRANKERD, *Brit. J. Haematol.*, 2 (1956) 80.
- 20 G. T. PERKOFF, D. M. BROWN UND F. H. TYLER, *J. Clin. Endocrinol.*, 17 (1957) 1395.
- 21 G. T. PERKOFF UND F. H. TYLER, *Metabolism, Clin. Exptl.*, 7 (1958) 751.
- 22 K. MIYOSHI, K. SAIJO, Y. KURYU, Y. OSHINA, M. NAKANO UND H. KAWAI, *Science*, 159 (1968) 736.
- 23 C. J. KENDREW UND R. G. PARRISH, *Proc. Roy. Soc. London Ser., A*, 238 (1956) 305.
- 24 U. J. LEWIS UND B. S. SCHWEIGERT, *J. Biol. Chem.*, 214 (1955) 647.
- 25 A. ROSSI-FANELLI, *Science*, 108 (1948) 15.
- 26 W. J. BOWEN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 747.
- 27 H. P. FLEMING, T. N. BLUMER UND H. B. CRAIG, *J. Animal Sci.*, 19 (1960) 1164.
- 28 H. B. CRAIG, T. N. BLUMER UND E. R. BARRICK, *J. Animal Sci.*, 18 (1959) 241.
- 29 H. THEORELL UND C. DE DUVE, *Arch. Biochem.*, 12 (1947) 113.
- 30 V. E. MORGAN, *J. Biol. Chem.*, 112 (1935-36) 557.
- 31 W. H. LUGINBUHL, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 105 (1960) 504.
- 32 I. D. GINGER UND B. S. SCHWEIGERT, *J. Agr. Food Chem.*, 2 (1954) 1037.
- 33 G. D. WILSON, I. D. GINGER UND B. S. SCHWEIGERT, *J. Animal Sci.*, 18 (1959) 1080.
- 34 D. A. RICKANSRUD UND R. L. HENRICKSON, *J. Food Sci.*, 32 (1967) 57.
- 35 N. K. BOARDMAN UND G. S. ADAIR, *Nature*, 177 (1956) 1078.
- 36 A. AKESON UND H. THEORELL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 91 (1960) 319.
- 37 W. D. BROWN, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2238.
- 38 A. B. EDMUNDSON UND C. H. HIRS, *Nature*, 190 (1961) 663.
- 39 G. T. PERKOFF, *Spurenanalyse, J. Med.*, 270 (1964) 263.
- 40 J. OKUBO, *Kyushu J. Med. Sci.*, 14 (1963) 431.
- 41 R. GONDKO, M. SCHMIDT UND W. LEYKO, *Biochim. Biophys. Acta*, 86 (1964) 190.
- 42 J. R. QUINN, A. M. PEARSON UND J. R. BRUNNER, *J. Food Sci.*, 29 (1964) 422.
- 43 R. GONDKO, Z. KUZMINSKA UND W. LEYKO, *Zeszyty Nauk Uniw. Lodz, Ser. II*, No. 24 (1967) 47.
- 44 M. C. BERMAN UND J. E. KENCH, *J. Clin. Pathol.*, 16 (1963) 358.
- 45 W. AWAD, B. CAMERON UND L. KOTITE, *Nature*, 198 (1963) 1201.
- 46 P. ANDREWS, *Biochem. J.*, 91 (1964) 222.
- 47 B. F. CAMERON, S. A. AZZAM, L. KOTITE UND E. S. AWAD, *J. Lab. Clin. Med.*, 65 (1965) 883.
- 48 K. MUELLER, W. SCHELER UND R. VOELKER, *Z. Med. Labortechn.*, 7 (1966) 234.
- 49 G. B. THEIL, *Am. J. Clin. Pathol.*, 49 (1968) 190.
- 50 R. A. LAWRIE, *Nature*, 169 (1951) 802.
- 51 J. FRIES, *Spurenanalyse*, E. Merck AG, Darmstadt, S. 52.
- 52 H. C. HORNSEY, *J. Sci. Food Agr.*, 7 (1956) 534.
- 53 A. H. T. THEORELL, *Biochem. Z.*, 252 (1932) 1.
- 54 H. THEORELL UND A. AKESON, *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, AII, 60 (1955) 303.