

ST. TUSZYŃSKA, J. TAUTT

MIKROBIOLOGICZNE OZNACZANIE WITAMIN GRUPY B WE KRWI

Z Zakładu Badania Organopreparatów i Witamin Instytutu Leków w Warszawie
Dyrektor: prof. dr P. Kubikowski

Badaniem zawartości witamin z grupy B we krwi ludzkiej zaczęto zajmować się w ostatnim dwudziestoleciu. Dotychczasowe prace na ten temat nie są liczne i dotyczą głównie oznaczania tiaminy, amidu kwasu nikotynowego i witaminy B₁₂ we krwi. W pracach tych posługiwano się zarówno metodami chemicznymi jak i mikrobiologicznymi, przy czym pierwsze oznaczenia mikrobiologiczne we krwi dotyczyły kwasu nikotynowego [2].

Friedemann, Edwards, Jansen i ich wsp. oznaczali tiaminę w postaci wolnej i związanej, przy zastosowaniu szczepów *Lactobacillus fermenti* i *Escherichia coli*.

Zawartością amidu kwasu nikotynowego we krwi pełnej zajmowali się *Isbell* i *Wooley*, stosując szczep *Shigella paradysynteriae*, a *Karlin* [21] i *Jännes* posługiwali się dla oznaczenia tej witaminy szczepem *Lactobacillus arabinosus*.

Kwas pantotenowy we krwi oznaczali *Karlin* [20], *Jännes* i *Owen*, stosując autolizę lub hydrolizę enzymatyczną. *Gounelle* i *Richet* oznaczali wolny kwas pantotenowy w surowicy.

Prace z lat ostatnich obejmowały głównie oznaczanie poziomu witaminy B₁₂ w surowicy. Między innymi były to prace *Killandera*, *Ostrowskiego*, *Wolffa* i *Karlina*, *Spraya*, *Rosenthala*, *Pitneya*, *Grossowicza*, *Maia* i *Yavorkowskiego*. Badacze ci posługiwali się w swoich metodach szczepami: *Euglena gracilis*, *Lactobacillus leichmanii* i *Escherichia coli*.

Jedyna praca *Pearsona* i *Brodovskiego*, dotycząca oznaczenia kwasu foliowego we krwi, była wykonana ze *Streptococcus faecalis*. Oznaczano w niej wolny i związany kwas foliowy, przy zastosowaniu enzymu z trzustki kurcząt. Poza tym *Pfander* oznaczył kwas foliowy we krwi szczura, stosując autolizę.

Oznaczaniem mikrobiologicznym ryboflawiny we krwi ludzkiej zajmowali się jedynie *Białecki* i *Sternal* w 1956 r.

Nie znaleźliśmy prac dotyczących mikrobiologicznego oznaczania pirydoksyny i biotyny we krwi.

W naszej pracy zastosowaliśmy dla oznaczania zawartości witamin we krwi wyłącznie metody mikrobiologiczne, które okazały się najbardziej wybiórcze i najczulsze, pozwalające oznaczyć poszczególne witaminy w milimikrogramach w 1 ml krwi.

W odróżnieniu od wyżej przytoczonych prac, w których oznaczano jedynie poszczególne witaminy, praca nasza obejmuje oznaczanie we krwi ludzkiej całego zespołu witamin z grupy B. Mając na celu zastosowanie opracowanych przez nas metod do celów diagnostycznych, ustaliliśmy takie metody analityczne, aby operując dostępnymi w warunkach klinicznych ilościami krwi, oznaczyć w niej zawartość witamin z grupy B. Materiałem, którym posługiwaliśmy się w pracy, była krew ludzi zdrowych dostarczana przez szpital nr 8 w Warszawie.

We krwi pełnej oznaczyliśmy całkowitą zawartość tiaminy, ryboflawiny, biotyny i kwasu foliowego. We krwi odwłóknionej pirydoksynę i niacynę, a w surowicy krwi kwas pantotenowy w postaci wolnej i związanej oraz zespół witamin B₁₂.

Główny nacisk położyliśmy na opracowanie takich sposobów przygotowania krwi do analizy przy których następowałoby całkowite, ilościowe uwolnienie poszczególnych witamin z badanego materiału.

METODYKA

Oznaczanie tiaminy. Metoda całkowitego uwolnienia tiaminy we krwi z jej połączeń w kokarboksylazie oparta została na pracach Rerat *, który badał tę witaminę we krwi zwierząt.

Przygotowanie krwi: 5 ml krwi heparynowanej (zawierających około 0,35 mikrograma tiaminy) hydrolizowano z 20 ml 0,1 n HCL w temp. 100° w ciągu 30 minut. Po oziębieniu i doprowadzeniu próby do pH 4,5 poddawano ją hydrolizie enzymatycznej z 1 ml 10% roztworu enzymów papainy i takadiastazy. Hydrolizę przeprowadzano w temp. 37° przez 18 godzin. Po tym czasie inaktywowano w próbie enzymy, ogrzewając je krótko w temp. 100°, po czym próbę oziębiano, dopełniano do objętości 30 ml i sączono. Zebrany przesącz w ilości 25 ml, po doprowadzeniu do pH 6,5 dopełniano wodą dest., tak aby końcowe stężenie witaminy B₁ wynosiło około 0,01 mikrograma/ml.

W tak przygotowanej próbie oznaczano tiaminę w oparciu o metodę mikrobiologiczną Saretta i Cheldelina, przy pomocy szczepu *Lactobacillus fermenti* 36, wprowadzając własne modyfikacje, które polegały:

a) na uproszczeniu i skróceniu czasu przygotowania pożywki podstawowej. Aby uniknąć pojedynczego dodawania poszczególnych składników pożywki podstawowej zgrupowano je w następujący sposób: I i II grupa obejmowała witaminy, III grupa składała się z puryn, a IV z mieszaniny soli mineralnych z glukozą w postaci suchej. Kazeinę, pepton i octan sodu dodawano do pożywki osobno.

* Metoda udostępniona przez dr A. Rerat w L'Institut National de la Recherche Agronomique, Bellevue, Francja.

W naszej pracy zastosowano do trawienia enzymatycznego autolizat świeżej wątroby szczura, w oparciu o prace *Marnay*, która, w toku swych badań na organizmach zwierzęcych, stwierdziła, że jedynie autolizat wątroby jest zdolny uwolnić kwas pantotenowy z różnych jego form związanych, a głównie z koenzymu A. w reakcjach biologicznych. Wartości kwasu pantotenowego, uwolnionego w ten sposób, były zawsze wyższe od znalezionych po trawieniu innymi enzymami.

Przygotowanie surowicy do oznaczania kwasu pantotenowego wolnego. 4 ml surowicy (o zawartości około 0,4 mikrograma kwasu pantotenowego wolnego) wlewano z 4 ml buforu fosforanowego o pH 5,2 w autoklawie pod ciśnieniem 1 atm. w ciągu 6 minut. W oziębionej próbce rozcierano dokładnie strąć białkową i wywarano go dwukrotnie z 10 ml wody destylowanej. Po każdym wirowaniu znowo wlewano płyn z nad osadu. Połączone płyny po zubożeniu, rozcieńczano wodą destylowaną, tak, aby końcowe stężenie kwasu pantotenowego wynosiło około 0,1 mikrograma w 1 ml próby.

Przygotowanie surowicy do oznaczania kwasu pantotenowego. 2 ml surowicy zawierającej około 0,4 mikrograma kwasu pantotenowego (całkowitego) oddzielono od białka przez ogrzewanie z 2 ml buforu fosforanowego o pH 5,2 w autoklawie pod ciśnieniem 1 atm. przez 6 minut. Po oziębieniu i dokładnym rozróżeniu strąconego białka wirowano dwukrotnie z 10 ml wody destylowanej każdorazowo dekantując płyn z osadu. Połączone płyny poddawano hydrolizie enzymatycznej z autolizatem wątrobowym w ciągu 16-tu godzin w temp. 37°. Po zakończeniu hydrolizy, inaktywowały enzymy w próbce przez krótkie jej ogrzanie do 100°. Oziębioną próbę zubożyły i rozcieńczano tak, aby końcowe stężenie kwasu pantotenowego wynosiło 0,1 mikrograma w 1 ml.

Przygotowanie autolizatu wątrobowego. 1 g świeżej wątroby szczura, po dokładnym rozróżeniu z 25 ml wody destylowanej, pozostawiono przez 16 godzin w temperaturze 37°. Następnie sączono. Autolizat przechowywano w chłodnicy w okresie 10 dni.

Do przeprowadzenia hydrolizy enzymatycznej 2 ml surowicy, używano autolizatu, w którym również oznaczano kwas pantotenowy. Uzyskaną ilość uwzględniano w obliczeniach kwasu pantotenowego znalezionej w surowicy.

W próbach surowicy i w autolizacie wątrobowym oznaczano kwas pantotenowy metodą *Skeggs'a* i *Wright'a* z *Lactobacillus arabinosus* 17—5, wprowadzając następujące modyfikacje mające na celu:

1) Uproszczenie i skrócenie czasu przygotowania pożywki podstawowej zgrupowanie poszczególnych składników pożywki podstawowej w następujących formach: I roztwór składał się z cystyny i tryptofanu, II — z adeniny, guaniny i tyminy, III — z tiaminy, ryboflawiny i biotyny, IV — z pirydoksyny, niacyny i kwasu aminobenzoowego, V i VI — z mieszaniny soli mineralnych. Poszczególne roztwory jałowiono.

2) Skrócenie czasu inkubacji prób z 48 godzin do 18 godzin i zastąpienie pomiaru absorpcyjnego pomiarom turbidymetrycznym.

Oznaczanie biotyny. Dotychczas oznaczanie biotyny przeprowadzano w takich materiałach jak np. drożdże [27], jaja kurze [1, 2]. Nie znaleziono natomiast precyzyjnych oznaczeń biotyny we krwi. Metoda, którą zastosowano w tej pracy, została na pracach odnoszących się do oznaczania biotyny w wyżej wymienionych materiałach. Zastosowano metodę bardzo prostą polegającą jedynie na przeprowadzeniu próby hydrolizy kwasowej. Uwalnianie biotyny w środowisku HCl i H₂SO₄ zało, że hydroliza z kwasem solnym, trwająca 1 godzinę, dawała lepsze wyniki.

Przygotowanie krwi: Heparynową krew w ilości 2 ml (zawierających około 30 milimikrogramów biotyny) poddawano hydrolizie z 10 ml 2 n HCl w autoklawie w temp. 121° w ciągu 1 godz. Po oziębieniu i doprowadzeniu próby do pH 5,3 dopełniano ją do 50 ml wodą destylowaną i sączono. Zebrany przesącz, po doprowadzeniu do pH 6,8 rozcieńczano tak, aby końcowe stężenie biotyny wynosiło 1 milimikrograma w 1 ml próby.

W tak przygotowanym wyciągu w krwi oznaczano biotyne metodą mikrobiologiczną Wright'a i Skeggs'a z *Lactobacillus arab.* 17—5 w modyfikacji Tuszyńskiej i wsp.

Oznaczanie kwasu foliowego. W celu uwolnienia kwasu foliowego z połączeń peptydowych w materiałach biologicznych, Johnson, Adrian [1], Pearson i wsp., stosowali hydrolizę enzymatyczną, posługując się enzymem z nerki świni, z trzustki kurcząt oraz enzymem z wątroby świni. Na podstawie wyników tych prac, w celu uwolnienia całkowitej ilości kwasu foliowego z krwi zastosowano do hydrolizy enzymatycznej Bc koniugazę z nerki świni. Przygotowanie tego enzymu oparto na metodzie Birda, Brinkleya i Blooma, jako najdogodniejszej w naszych warunkach laboratoryjnych. W tak przygotowanym roztworze enzymu oznaczano każdorazowo zawartość kwasu foliowego, którą uwzględniano w obliczeniach.

Przygotowanie krwi: 5 ml heparynowej krwi (zawierających około 60 milimikrogramów kwasu foliowego (rozcieńczonej wodą destylowaną w stosunku 1 : 4, odbiałczano przez ogrzewanie z buforem octanowym o pH 4,5 na łaźni wodnej w 100° przez 5 minut. Po oziębieniu i dokładnym roztarciu strąconego białka próbę poddawano trawieniu enzymatycznemu z 0,5 ml roztworu koniugazy Bc w ciągu 48 godzin w temp. 37°. Po doprowadzeniu próby do pH 7, inaktywowano enzymy przez ogrzanie w 100° w ciągu 5 minut. Strącone i dokładnie roztarte białko odwirowywano dwukrotnie z wodą destylowaną. Zdekantowany płyn dopełniano wodą destylowaną tak, aby końcowe stężenie kwasu foliowego wynosiło około 4 milimikrogramów w 1 ml próby. W tak przygotowanym wyciągu z krwi oznaczano kwas foliowy metodą mikrobiologiczną Teply'a i Elvehjem'a ze *Streptococcus faecalis* R.

Oznaczanie zespołu witamin B₁₂. Witaminę B₁₂ oznaczano w surowicy krwi, opierając się na pracach z lat ostatnich Wolffa, Karlina i Paysanta [43] oraz Mai'a i wsp.

Stosowany w wyżej wymienionych pracach bufor octanowy, utrzymujący słabo kwaśne środowisko roztworu surowicy, zastąpiono buforem fosforanowym, ze względu na wchodzące w skład pożywki podstawowej dla *Escherichia coli*, sole fosforanowe. Pora tym B-gedeu, Killander, Spray, Calet i Rerat dodawali cyjanek potasu do badanych prób, aby zabezpieczyć witaminę B₁₂ przed rozkładem w czasie ogrzewania.

W sprawie o powyższe prace, mając na celu uwolnienie z kompleksu białkowego w surowicy witaminy B₁₂ i przekształcenie różnych jej form w odporną na wysokie temperatury cyjanokobalaminę, ogrzewano surowicę w środowisku słabo kwaśnym z dodatkiem KCN. O wyborze przez nas szczepu *Escherichia coli*, do oznaczania mikrobiologicznego witaminy B₁₂ w surowicy, zdecydowała jego specjalna wrażliwość na cyjanokobalaminę, znacznie większa niż na inne postacie witaminy B₁₂, znajdujące się w materiałach pochodzenia naturalnego. Stwierdzono również, że szczep *Escherichia coli* jest około 10-krotnie bardziej czuły na cyjanokobalaminę niż inne szczepy jak *Lactobacillus Leichmani*, *Euglena Gracillis*, *Lactobac. Lactis Dornier*.

Przygotowanie surowicy: 5 ml surowicy (zawierających około 2 milimikrogramów witaminy B₁₂ po rozcieńczeniu jej w stosunku 1 : 2 buforem fosforanowym o pH 5,2 i po dodaniu 10 ml roztworu KCN o stężeniu 100 µg/1 ml, pozostawiano w ciemności na przeciąg 24 godzin. Następnie próbę ogrzewano w autoklawie pod ciśnieniem

1 amt. przez 6 minut. Po oziębieniu próby, rozcierano dokładnie strąconą cieślą i odwirowywano z 10 ml wody destylowanej przez 15 minut. W zdekantowanym cieście, którego końcowe stężenie wynosiło około 0,1 milimikrograma witaminy B₁₂ w 1 ml oznaczano badaną witaminę jako cyjanokobalaminę.

Do oznaczenia zastosowano zmodyfikowaną przez nas metodę *Burkholdera* z *Escherichia coli mutant* 113—3.

Modyfikacje polegały na:

a) uproszczeniu i skróceniu czasu przygotowania pożywki podstawowej, polegającym na odpowiednim zgrupowaniu roztworów aminokwasów dodawanych do pożywki oraz sporządzeniu mieszaniny soli mineralnych z glikozą w postaci sproszkowanej, wchodzącej w skład pożywki podstawowej,

b) zastosowaniu dla szczepu *Escherichia coli* pożywki macierzystej, składającej się z *Bacto-peptonu*, wyciągu mięsnego o pH 7,2, chlorku sodu, glikozy i agaru. Szczep hodowany na takiej pożywce dawał, w wyniku oznaczenia cyjanokobalaminy w surowicy, najlepsze wyniki.

Zmodyfikowano również przygotowanie zawiesiny szczepu *Escherichia coli* do posiewu prób. W przeddzień oznaczenia przeszczepiano kulturę *E. coli* z pożywki stałej na pożywkę wzrostową bulionową f-my Difco i inkubowano przez 24 godziny w temp. 34°. W dniu oznaczania kulturę z pożywki wzrostowej bulionowej przeszczepiano na drugą pożywkę wzrostową, składającą się z pożywki podstawowej z dodatkiem 0,4 milimikrograma wzorcowej cyjanokobalaminy i inkubowano w ciągu 6 godzin w temp. 30°. W wyniku pasażowania otrzymano szczep dostatecznie rozwinięty i uczulony na obecność badanej witaminy. Po dwukrotnym odwirowaniu drugej kultury wzrostowej i zawieszeniu w pożywce podstawowej, używano jej do posiewu prób w ilości 5 kropli na probówkę.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Stosowanie wyżej podanych metod analitycznych do oznaczenia poszczególnych witamin we krwi, miało na celu przede wszystkim całkowite uwolnienie ich w hydrolizatach krwi, uchronienie od straty przy oznaczaniu oraz uzyskanie powtarzalnych wyników.

W celu upewnienia się, że stosowane przez nas metody spełniały wyżej podane warunki, dodawano do krwi lub surowicy, w początkowej fazie jej przygotowania, określone ilości wzorca badanej witaminy, odzyskiwano, w przypadku wszystkich witamin, od 93—102% ilości dodanych witamin.

Załączona tabela przedstawia średnie wartości liczbowe otrzymanych przez nas wyników w porównaniu z analogicznymi danymi w piśmiennictwie.

Z podanej tabeli wynika, że wartości otrzymane dla tiaminy, ryboflawiny, niacyny, kwasu pantotenowego i witaminy B₁₂ odpowiadają danym zaczerpniętym z prac innych autorów, przy czym, jedynie dwóch autorów podaje wartości kwasu pantotenowego wolnego, a tylko jeden kwasu pantotenowego całkowitego w surowicy ludzkiej.

Tabela 1.

		Zawartość witamin w µg na 100 ml 1)																
		Dane z piśmiennictwa 2)																
		Zawartość witamin w µg na 100 ml 1)																
Witaminy 3)	Materiał badany 4)	Wyniki własne 5)	Bialecki (4)	Bicknell (5)	Gouelle (14)	Jansen (18)	Jannes (17)	Karlin (21)	Marnay (24)	Mücke (26)	Ostrowski (28)	Pitney (32)	Raoul (33)	Rosenthal (34)	Spray (39)	Thiers (41)	Wolff (44)	
B ₁	k r e w 6)	7,6	—	8	—	7,5	—	—	8,5	15	—	—	—	—	—	—	—	
B ₂		35	24,5	40	—	—	—	—	—	45	—	—	—	—	—	—	—	
B ₆		1,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PP		620	—	565	—	—	610	650	600	500	500	—	—	550	—	—	440	—
B ₁₂		1,2	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—
H		1,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
wolny 7)	surowica 9)	8	—	—	5	—	—	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
B ₃ całkowity 8)		21	—	—	—	—	—	20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
B ₁₂		0,043	—	—	—	—	—	—	0,06	0,044	0,023	0,045	—	—	0,025	0,05	—	0,053

Vitamins content in µg in 100 ml 1); Data from literature 2); Vitamins 3); tested material 4); Our results 5); blood 6); free 7); total 8); serum 9).

W piśmiennictwie nie udało się znaleźć danych liczbowych dotyczących zawartości pirydoksyny i biotyny we krwi ludzi, co nie pozwala na porównanie naszych wyników.

Jedyna wartość, którą znaleziono w odniesieniu do kwasu foliowego, podana przez Mücke'a, jest prawie czterokrotnie wyższa od średniej wartości znalezionej przez nas. Autor nie podaje jednak źródła ani metody przy której uzyskano ten wynik. Pearson i wsp. natomiast, podając metodę oznaczania tej witaminy we krwi, nie podają wyników swej pracy.

Opracowane metody znalazły zastosowanie do badań diagnostycznych przy obserwowaniu obrazu krwi w różnych stanach chorobowych ludzi.

C. Тушиньска, Я. Таутт

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИН ГРУППЫ В В КРОВИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ

Содержание

Целью работы было разработать такой аналитический метод, по которому было бы можно пользуясь малыми, доступными в клинических условиях количествами крови, определить в ней содержание витамин группы В.

В исследованиях применялись микробиологические методы, которые оказались более селективными и чувствительными, чем химические методы, и создали возможность определить содержание в миллимикrogramмах витамин в мл крови. Главной задачей настоящей работы была разработка таких способов приготовления крови для анализа, при которых происходит полное количественное отделение отдельных витамин из исследуемого материала.

В отличие от других работ по этому вопросу, в которых исследования относились только к отдельным витаминам, авторы разработали метод для определения в крови всего комплекса витамин из группы В, причем введен одновременно метод микробиологического определения биотина и пиридоксина в крови.

Разработанный метод относится к определению следующих витамин: В₁, В₂, В₆, РР₂, пантотеновой кислоты, биотина, фолиевой кислоты и витамина В₁₂.

Тиамин и рибофлавин определялся в кислотно-энзиматических гидролизатах целостной крови, используя штамм *Lactobacillus fermenti* 36 (витамин В₁) и *Lactobacillus casei* E (витамин В₂).

Пиридоксин и амид никотиновой кислоты определяли в целостной, дефибрированной, лишенной белка крови, причем для определения пиридоксина использовали дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis* а для амида никотиновой кислоты — *Lactobacillus arabinosus* 17—5.

Пантотеновую кислоту определяли в лишенной белка сыворотке крови применяя *Lactobacillus arabinosus* 17—5.

Биотин определяли в кислых гидролизатах целостной крови, используя штамм *Lactobacillus arabinosus* 17—5.

Определение фолиевой кислоты проводили в энзиматических гидролизатах крови применяя штамм *Streptococcus faecalis* R.

Витамин В₁₂ определяли в сыворотке крови, лишенной белка, пользуясь штаммом *Escherichia coli* mutant 113-3.

В отдельных определениях витаминов авторы ввели модификацию, основывающуюся на усовершенствовании и сокращении процесса микробиологических определений.

В результате разработанных методов определения комплекса витаминов группы В в крови человека, получены повторяющиеся данные, согласующиеся в общем с литературными данными.

Разработанные методы нашли применение в диагностических исследованиях.

St. Tuszyńska, J. Taytt

MICROBIOLOGICAL DETERMINATION OF VITAMINS B IN THE BLOOD

Summary

The object was to find a method that would enable vitamins B to be determined in the small blood samples routinely used in clinical practice.

The microbiological methods used in these investigations proved superior to chemical ones in selectivity and accuracy, enabling the particular vitamins to be determined in concentrations as low millimicrogram/ml.

Attention was focussed especially on such methods of preparing blood samples for analysis as would completely release the whole amount of particular vitamins from the material investigated.

Unlike other investigations, which were concerned with particular vitamins separately, this study covers determination in human blood of the entire complex of vitamins B, and introduces a microbiological method for determining biotin and pyridoxine in blood.

Methods were developed for vitamins B₁, B₂, B₆, and PP, pantothenic acid, biotin, folic acid, and vitamin B₁₂.

Thiamine and riboflavine were determined in acido-enzymatic hydrolyzates of whole blood with the aid of *Lactobacillus fermenti* 36 and *Lactobacillus casei* E respectively.

Pyridoxine and nicotinamide were determined in whole defibrinized and deproteinized blood with the aid of *Saccharomyces carlsbergensis* and *Lactobacillus arabinosus* 17—5 respectively.

Pantothenic acid, free and bound, was determined in deproteinized blood serum with the aid of *Lactobacillus arabinosus* 17—5.

Biotin was determined in acid hydrolyzates of whole blood with the aid of *Lactobacillus arabinosus* 17—5.

Folic acid was determined in whole-blood enzymatic hydrolyzates with the aid of *Streptococcus faecalis* R.

Vitamin B₁₂ was determined in deproteinized blood serum with the aid of *Escherichia coli* mutant 113—3.

Determinations of particular vitamins were modified so as to improve and speed them.

The results obtained by the methods developed for the determination of Vitamins B in human blood were reproducible and on the whole concordant with literature.

The methods have been applied in diagnostic practice.

PIŚMIENNICTWO

1. Adrian J.: Ann. Zootech. 1956, 4, 295.
2. Adrian J.: Arch. Sci. Ph. 1958, 12, 1.
3. Atkin L., Schultz A. S., Williams W. L., Frey C. N.: Ind. Eng. Chem. Anal. 1943, 15, 141.
4. Białecki M., Sternal M.: Patologia Polska 1956, 7, 109.
5. Bicknell F., Prescott F.: The Vitamins in Medicine. 1947, London.
6. Bird O., Binkley S., Bloom E.: J. Biol. Chem. 1945, 157, 413.
7. Brigeau J.: Dosage microbiologique de l'activite vitaminique B₁₂ des extraits de foie et des nuoc-mam. Faculte de Pharmacie Serie E n° 50. 1954.
8. Burkholder R. R.: Science N. Y. 1951, 459, 114.
9. Buskirk H. H., Bergdahl A. M., Delor R. A.: J. Biol. Chem. 1948, 172, 671.
10. Calet C., Rerat A.: Ann. Zootech. 1954, 3, 247.
11. Edwards M. A., Kaufman M. L., Storvick: Amer. J. Clin. Nutr. 1957, 5, 51.
12. Friedemann T. E.: J. Lab. Clin. Med. 1943, 28, 1262.
13. Gounelle H., Marnay C.: Les Signes et Test des Carences Vitaminique. Bruxelles-Paris. 1958.
14. Gounelle H., Richet F.: C. R. Soc. Biol., 1956, 150, 2167.
15. Grossowicz N., Aronovitch J., Rachmilewitz M.: Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y. 1954, 87, 513.
16. Isbell H., Wooley J. G., Butler E. E., Sebrell.: J. Biol. Chem. 1941, 139, 499.
17. Jännes J.: Acta Med. Scand., Supp. 1950, 249.
18. Jansen J. D., Thyse G. J., Kingma Boltjes T. Y., Jansen B. C. P.: Inter. Zsch. Vit. forsch., 1957, 27, 279.
19. Johnson C. B.: Methods of Vitamin Determination. Minneapolis. 1949.
20. Karlin R.: C. R. Soc. Biol., 1958, 152, 793.
21. Karlin R.: C. R. Soc. Biol., 1959, 153, 1044.
22. Killander A.: Acta Soc. Med. Upsalinensis, 1957, 62, 39.
23. Mai O., Javorkovskü I., Krumin L. Ya.: Biokhimiya 1958, 23, 237.
24. Marnay C.: Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 35, 220., 1171.
25. Meunier P., Raoul Y.: Le Diagnostic Chimique des Vitamines. Paris. 1942.
26. Mücke D.: Einführung in microbiologische Bestimmungverfahren, Leipzig. 1957.
27. Myszkowska K., Tautt J., Tuszyńska S., Woźniak W.: Chem. Anal. 1960, 5, 471.
28. Ostrowski W.: Acta Bioch. Polon. 1955, 3, 297.
29. Owen B. D., Bowland J. P.: J. Nutr. 1952, 48, 317.
30. Paerson W. N., Brodovsky E. R., Carnes E. R., Darby W. J.: J. Anal. Chem. 1959, 31, 1113.
31. Pfander W. H., Dietrich L. S., Morison W. J., Harper A. E., Elvehjem C. A.: Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y. 1952, 79, 219.
32. Pitney W. R., Beard M. F., V. Loon E. J.: J. Biol. Chem. 1954, 143, 207.
33. Raoul Y., Marnay C.: Le Dosage phisico-chimique des vitamines 1956.
34. Rosenthal H. L., Sarett H. P.: J. Biol. Chem. 1952, 199, 433.
35. Sarett H. P., Cheldelin V. H.: J. Biol. Chem. 1944, 155, 153.
36. Skeggs H. R., Wright L. D.: J. Biol. Chem. 1944, 156, 21.
37. Snell E. W., Strong F. M.: Anal. Ed., 1939, 11, 346.
38. Snell E. E., Wright L. D.: J. Biol. Chem. 1941, 139, 675.
39. Spray G. H.: Brit. Med. J., 1958, 8, 295.
40. Teplý L. J., Elvehjem C. A.: J. Biol. Chem., 1945, 157, 303.

41. *Thiers H.*: Les Vitamines. 1956 Paris.
42. *Tuszyńska M., Myszkowska K., Woźniak W., Lewandowska K.*: Chem. Anal. 1956, 1, 93.
43. *Wolff R., Karlin R., Paysant P.*: Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 1409.
44. *Wolff R., Karlin R., Paysant P.*: Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 735.
45. *Wright L., Skeggs H.*: Proc. Exper. Biol. Med., 1944, 56, 14067.

Otrzymano: 29. XI. 1960.

Adres autorów: Instytut Leków, Zakład Badania Organopreparatów i Witamin
Warszawa, ul. Długa 16.