

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE ZUR ANALYSE VON SCHILDDRÜSENHORMONEN

H. SCHORN UND C. WINKLER

(UNTER TECHNISCHER MITARBEIT VON G. BERG)

Nuclearmedizinische Abteilung in der Chirurgischen Universitätsklinik, Bonn (Deutschland)*

(Eingegangen den 19. August 1964)

Nachdem die bereits seit etwa 25 Jahren bekannte¹ Dünnschichtchromatografie (DC) durch die methodische Bearbeitung von STAHL² in ständig zunehmendem Masse Eingang in die analytische Technik gefunden hat, sind die Vorteile dieses Verfahrens (kurze Laufzeit, scharfe Trennung etc.) auch der Biochemie zugute gekommen. Durch geeignete Massnahmen war es möglich, die DC als Radiochromatografie (RC) anzuwenden. Dadurch haben sich u.a. neue Möglichkeiten für die medizinische Diagnostik und Forschung ergeben. Hierbei kann, wie nachstehend gezeigt werden soll, eine einfache und billige Ausrüstung zur Erzielung brauchbarer Ergebnisse durchaus hinreichend sein. Ein interessantes Anwendungsgebiet der DC, die Identifizierung von Schilddrüsenhormonen, konnte durch eine systematische Untersuchungsreihe für klinische und wissenschaftliche Zwecke erschlossen werden.

METHODIK³

(1) *Dünnschichtchromatografie*

Bei den meisten Versuchen wurde in folgender Weise vorgegangen: 5 g Kieselgel G (Merck) wurden mit 25 ml Wasser im Mörser zu einer gleichmässigen Suspension verrieben und diese auf gründlich gereinigte Glasplatten (20 × 20 cm) durch Hin- und Herschwenken gleichmässig verteilt. Auf ebener Unterlage wurden die Platten über Nacht an der Luft bei Zimmertemperatur getrocknet. Nach entsprechender Markierung und Beschriftung erfolgte das Auftragen der Substanzlösungen mit Mikropipetten. Zur Entwicklung wurden die Platten in Chromatografietröge mit Filterpapierauskleidung gebracht, die bis etwa 0.8 cm Höhe mit dem Elutionsmittel gefüllt waren. Die in $1/2$ -2 Std. aufsteigend entwickelten Platten wurden durch kurzes Erwärmen im Trockenschrank (bis 60°) getrocknet und anschliessend angefärbt. Zum Jodidnachweis diente eine $PdCl_2$ -Lösung⁴. Die Aminosäuren konnten in verschiedener Weise angefärbt werden⁵. Meist kam Ninhydrinreagens in essigsaurer Butanollösung zur Anwendung⁶. Nach abermaligem Trocknen wurden die Platten zwecks Dokumentation mit Neatan bis zur guten Durchfeuchtung besprüht und nach Aufdrücken einer transparenten Klebefolie unter Wasser vorsichtig abgezogen.

(2) *Papierchromatografie*

Die (zur Kontrolle und zum Vergleich durchgeführte) papierchromatografische

* Leiter: Dozent Dr. C. WINKLER.

Trennung erfolgte absteigend unter Anwendung des Systems *n*-Butanol-Dioxan-2 *N* NH₄OH (4:1:5) in bekannter Weise⁷. Die Lokalisierung der Tyrosine und Thyronine erfolgte unter der U.V.-Lampe, die des Jodids wiederum durch Ansprühen mit PdCl₂.

(3) Radiochromatografie

Aus den mit Neotan behandelten Dünnschichtchromatogrammen und den eindimensionalen Papierchromatogrammen wurden die Laufstrecken als 4 cm breite Streifen ausgeschnitten. Die Messung der Aktivitätsverteilung erfolgte mit dem Radiochromatografen FH 417 mit Methandurchflusszähler, schrittweisem Vorschub, Impulsvorwahl und Registrierung mit einem Zeitdrucker. Zur quantitativen Auswertung dienten die Flächenintegrale der aufgenommenen Aktivitätskurven.

Bei den zweidimensionalen Dünnschichtchromatografie wurde zusammen mit der Probe ein Gemisch der Tyrosine (T₁, T₂), Thyronine (T₃, T₄) und Jodid aufgetragen. Nach der Trennung erfolgte die Anfärbung der Referenzsubstanzen. An den entsprechenden Stellen wurde die lose Kieselgelschicht abgekratzt und in Reagensgläser überführt. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte im Bohrlochszintillationszähler.

(4) Serumprobe

Von einem Patienten, der wegen Schilddrüsenüberfunktion trägerfreies Na¹³¹J zur Therapie erhalten hatte⁸, wurde 40 Stunden nach Applikation des radioaktiven Präparats eine Blutprobe entnommen. Die Aufarbeitung des abgetrennten Serums geschah in üblicher Weise⁹.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Über die Trennung von Aminosäuren durch DC ist bereits verschiedentlich berichtet worden^{5,10-14}, jedoch liegen unseres Wissens bisher keine Untersuchungsergebnisse über DC-Analyse von Tyrosinen und Thyroninen vor. Wegen der diagnostischen Bedeutung der Differenzierung von Schilddrüsenhormonen (bzw. ihrer Metaboliten) erschien es daher von Interesse, die Möglichkeiten für ihre Identifizierung durch DC systematisch zu prüfen. Die guten Trenneffekte bei kurzer Laufzeit und die relativ einfache Handhabung der Methode liessen erwarten, dass sie sowohl für klinische, wie auch für medizinisch-wissenschaftliche Zwecke von wesentlichem Nutzen sein könnte.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in Tabelle I zusammengestellt. Es konnten demnach mehrere Systeme ermittelt werden, die eine gute Trennung der Substanzen ermöglichen. Da bekanntlich *R_F*-Werte nach manueller Absorbenauftragung schlecht reproduzierbar sind, wurden auch die *R_S*-Werte (S = Jodid) angegeben. Bei Anwendung der Durchlauftechnik oder bei mehrmaligem Entwickeln liessen sich die Trenneffekte noch verstärken. Dabei ergab sich, ebenso wie bei der zweidimensionalen DC, die Möglichkeit, beliebige Systeme miteinander zu kombinieren. Die Entwicklungszeit der eindimensionalen Dünnschichtchromatogramme betrug maximal 2 Stunden, im Vergleich zu ca. 24 Stunden bei Anwendung der Papierchromatografie (PC). Die Trennung von Trijodthyronin (T₃) und Thyroxin (T₄) bei Anwendung der PC und DC sind aus Fig. 1 und 2 ersichtlich. Ergänzend ist zu er-

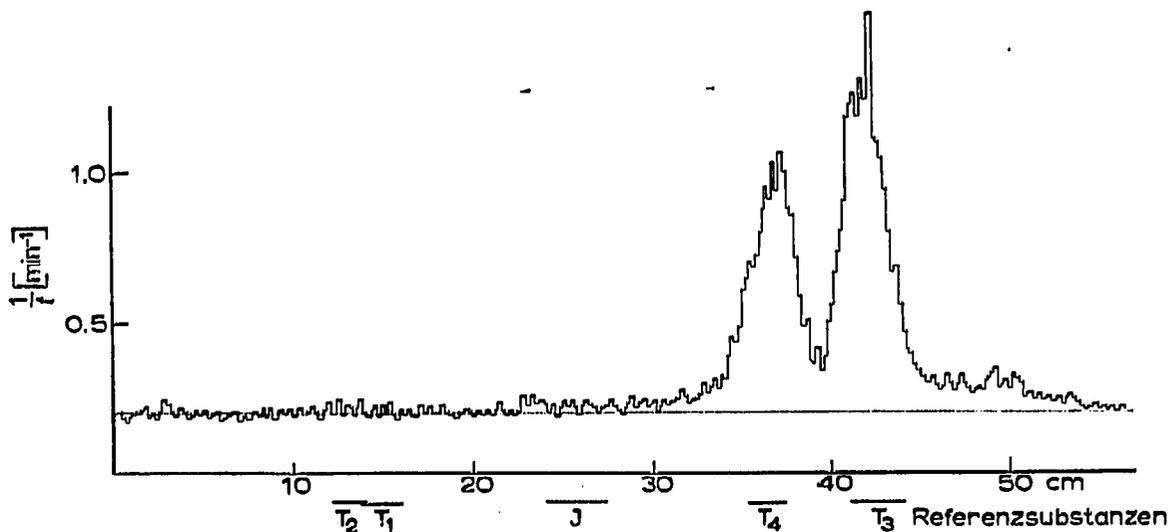


Fig. 1. Papierchromatogramm. System: *n*-Butanol-Dioxan-1 N NH₄OH (4:1:5).

wähnen, dass Magnesiumsilikat prinzipiell eine ebenso gute Trennung wie Kieselgel ermöglicht, dass damit jedoch die doppelte Laufzeit benötigt wird. Ausserdem lässt sich die Schicht nach Neatanbehandlung nur schwer quantitativ von der Glasplatte abziehen. Bei Anwendung von Kieselgelmengen unter 5 g stellten wir fest, dass dabei häufig "Tailing-Effekte" auftraten.

In der klinischen Diagnostik bzw. zur Bearbeitung endocrinologischer Probleme haben wir die DC bereits praktisch anwenden können. Im einzelnen soll darüber in gesonderten Mitteilungen berichtet werden^{15,16}. Hier sei zur Erläuterung lediglich ein Beispiel angeführt. Als stoffwechselwirksame Inkrete der Schilddrüse finden sich im zirkulierenden Blut T₄ und T₃. Deren Produktions- und Umsatzrate sind verschieden, ebenso wie ihre metabolische Wirksamkeit. T₃ wird eine etwa viermal stärkere Hormonwirkung zugeschrieben als T₄. Demnach kann eine quantitative Verschiebung der Relation zugunsten von T₃ zu Änderungen des Körperstoffwechsels

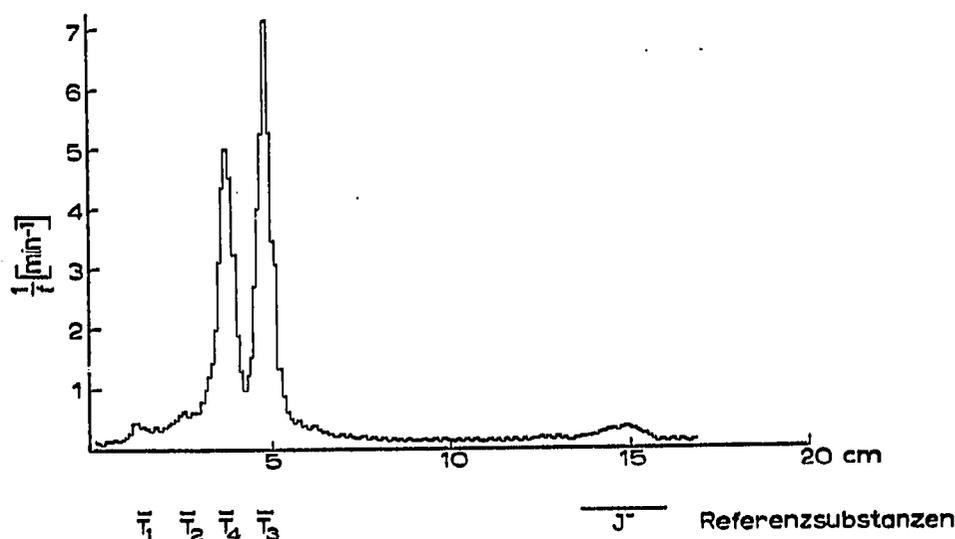


Fig. 2. Dünnschichtchromatogramm. System: Methyläthylketon-Äthanol-1 N NH₄OH (8:1:1), 2 × gelaufen.

TABELLE I
DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE VON TYROSINEN UND THYRONINEN

| System | Trennung | R_F -Werte ^a | | | | R_S -Werte ^b | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------------|-------|-------|-------|---------------------------|-------|-------|-------|
| | | T_1 | T_2 | T_3 | T_4 | T_1 | T_2 | T_3 | T_4 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (4:1:5) | + | 0.37 | 0.35 | 0.49 | 0.44 | 0.55 | 0.52 | 0.73 | 0.66 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-0.6 <i>N</i> NH ₄ OH (4:1:5) | — | 0.23 | 0.25 | 0.35 | 0.32 | 0.57 | 0.62 | 0.87 | 0.80 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-1 <i>N</i> NH ₄ OH (4:1:5) | — | 0.30 | 0.29 | 0.41 | 0.38 | 0.73 | 0.71 | 1.00 | 0.93 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-6 <i>N</i> NH ₄ OH (4:1:5) | — | 0.41 | 0.43 | 0.46 | 0.45 | 0.89 | 0.93 | 1.00 | 0.98 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (8:1:1) ^c | + | 0.10 | 0.39 | 0.22 | 0.21 | 0.19 | 0.17 | 0.41 | 0.39 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (8:1:1) ^u | + | 0.06 | 0.06 | 0.25 | 0.26 | 0.15 | 0.15 | 0.64 | 0.51 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (8:1:1) ^e | + | 0.05 | 0.04 | 0.19 | 0.12 | 0.12 | 0.10 | 0.45 | 0.25 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (8:1:1) ^f | + | | | | | 0.15 | 0.14 | 0.48 | 0.39 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (8:1:1) ^g | + | | | | | 0.13 | 0.12 | 0.47 | 0.36 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (8:1:1) ^h | + | | | | | 0.13 | 0.10 | 0.35 | 0.19 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (8:1:2) | + | 0.13 | 0.12 | 0.23 | 0.19 | 0.44 | 0.43 | 0.82 | 0.68 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (4:1:1) | + | 0.18 | 0.14 | 0.33 | 0.27 | 0.43 | 0.33 | 0.79 | 0.64 |
| <i>n</i> -Butanol-Dioxan-2 <i>N</i> NH ₄ OH (2:2:1) | + | 0.22 | 0.18 | 0.37 | 0.31 | 0.53 | 0.44 | 0.90 | 0.76 |
| <i>n</i> -Butanol-Methyläthylketon-1 <i>N</i> NH ₄ OH (4:1:1) | + | 0.25 | 0.21 | 0.35 | 0.32 | 0.56 | 0.47 | 0.78 | 0.71 |
| <i>n</i> -Butanol-Methyläthylketon-2 <i>N</i> NH ₄ OH (2:2:1) | + | 0.14 | 0.17 | 0.23 | 0.27 | 0.29 | 0.35 | 0.47 | 0.55 |
| <i>n</i> -Amylalkohol-Aceton-1 <i>N</i> NH ₄ OH (1:4:1) | + | 0.28 | 0.18 | 0.64 | 0.60 | 0.72 | 0.25 | 0.89 | 0.83 |
| <i>n</i> -Butanol-Aceton-1 <i>N</i> NH ₄ OH (1:4:1) | + | 0.35 | 0.28 | 0.55 | 0.50 | 0.56 | 0.45 | 0.89 | 0.81 |
| Benzylalkohol-Aceton-1 <i>N</i> NH ₄ OH (1:8:1) | + | 0.09 | 0.07 | 0.26 | 0.17 | 0.81 | 0.09 | 0.32 | 0.21 |
| Benzylalkohol-Aceton-2 <i>N</i> NH ₄ OH (1:8:1) | + | 0.04 | 0.03 | 0.14 | 0.08 | 0.60 | 0.05 | 0.23 | 0.13 |
| Äthylenglykol-Aceton-1 <i>N</i> NH ₄ OH (1:8:1) | + | 0.33 | 0.32 | 0.55 | 0.45 | 0.83 | 0.39 | 0.66 | 0.54 |
| Äthylenglykol-Aceton-1 <i>N</i> NH ₄ OH (1:4:1) | + | 0.09 | 0.04 | 0.25 | 0.15 | 0.28 | 0.14 | 0.89 | 0.53 |
| Äthylenglykol-Methyläthylketon-2 <i>N</i> NH ₄ OH (1:8:1) | + | 0.03 | 0.02 | 0.10 | 0.08 | 0.17 | 0.12 | 0.59 | 0.47 |
| Äthylenglykol-Methyläthylketon-2 <i>N</i> NH ₄ OH (1:8:1) | + | 0.01 | 0.01 | 0.13 | 0.06 | 0.21 | 0.06 | 0.62 | 0.29 |

| | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Äthanol-Methyläthylketon-2 N NH ₄ OH (1:4:2) | + | 0.46 | 0.43 | 0.56 | 0.49 | 0.67 | 0.69 | 0.64 | 0.84 | 0.74 |
| Äthanol-Methyläthylketon-2 N NH ₄ OH (2:7:1) | + | 0.09 | 0.07 | 0.25 | 0.17 | 0.64 | 0.14 | 0.11 | 0.40 | 0.27 |
| Äthanol-Methyläthylketon-2 N NH ₄ OH (1:8:1) | + | 0.07 | 0.03 | 0.14 | 0.09 | 0.40 | 0.17 | 0.08 | 0.36 | 0.23 |
| Äthanol-Methyläthylketon-2 N NH ₄ OH (1:4:1) | + | 0.39 | 0.31 | 0.56 | 0.48 | 0.73 | 0.51 | 0.42 | 0.76 | 0.67 |
| Äthanol-Methyläthylketon-2 N NH ₄ OH (1:4:1) | + | 0.31 | 0.24 | 0.45 | 0.39 | 0.59 | 0.52 | 0.41 | 0.76 | 0.67 |
| Isopropanol-Methyläthylketon-1 N NH ₄ OH (1:4:1) | + | 0.08 | 0.05 | 0.17 | 0.12 | 0.56 | 0.14 | 0.09 | 0.30 | 0.21 |
| Benzylalkohol-Methyläthylketon-1 N NH ₄ OH (1:4:1) | + | 0.08 | 0.04 | 0.14 | 0.10 | 0.37 | 0.22 | 0.11 | 0.38 | 0.27 |
| tert.-Amylalkohol-Dioxan-1 N NH ₄ OH (2:2:1) | + | 0.23 | 0.14 | 0.36 | 0.27 | 0.39 | 0.59 | 0.36 | 0.92 | 0.69 |
| tert.-Amylalkohol-Dioxan-1 N NH ₄ OH (2:2:1) ⁱ | + | 0.33 | 0.18 | 0.46 | 0.36 | 0.57 | 0.58 | 0.32 | 0.81 | 0.63 |
| Dichloräthan-Aceton-1 N NH ₄ OH (1:8:1) | + | 0.05 | 0.02 | 0.14 | 0.09 | 0.24 | 0.21 | 0.08 | 0.58 | 0.38 |
| n-Butanol-Dichlormethan-1 N NH ₄ OH (8:1:1) | + | 0.16 | 0.14 | 0.33 | 0.24 | 0.45 | 0.36 | 0.31 | 0.73 | 0.53 |
| n-Butanol-Dichloräthan-1 N NH ₄ OH (8:1:1) | + | 0.13 | 0.09 | 0.26 | 0.20 | 0.43 | 0.30 | 0.21 | 0.60 | 0.46 |
| n-Amylalkohol-Äthanol-2 N NH ₄ OH (8:1:1) | + | 0.05 | 0.03 | 0.14 | 0.08 | 0.28 | 0.18 | 0.11 | 0.50 | 0.29 |
| sec.-Butanol-Benzylalkohol-1 N NH ₄ OH (8:1:1) | + | 0.04 | 0.03 | 0.19 | 0.12 | 0.38 | 0.11 | 0.08 | 0.50 | 0.32 |
| n-Butanol-Äthanol-2 N NH ₄ OH (4:1:5) | + | 0.26 | 0.25 | 0.37 | 0.34 | 0.49 | 0.53 | 0.51 | 0.75 | 0.69 |
| n-Butanol-Äthanol-1 N NH ₄ OH (4:1:5) | + | 0.26 | 0.19 | 0.37 | 0.31 | 0.50 | 0.52 | 0.38 | 0.75 | 0.62 |
| n-Butanol-Äthanol-1 N NH ₄ OH (8:1:1) | + | 0.08 | 0.07 | 0.21 | 0.15 | 0.45 | 0.18 | 0.16 | 0.47 | 0.30 |
| n-Butanol-Äthanol-1 N NH ₄ OH (4:1:1) | + | 0.19 | 0.17 | 0.31 | 0.26 | 0.47 | 0.40 | 0.36 | 0.66 | 0.55 |
| Äthanol-Aceton-Acetatlupfer (pH 4.8) (1:4:1) | — | 0.35 | 0.37 | 0.46 | 0.45 | 0.85 | 0.41 | 0.43 | 0.54 | 0.53 |
| Phenol-Wasser (3:1) | + | 0.43 | 0.55 | 0.61 | 0.65 | 0.28 | 1.53 | 1.96 | 2.18 | 2.32 |
| n-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser (10:10:2:5) | — | 0.47 | 0.49 | 0.60 | 0.68 | 0.52 | 0.50 | 0.94 | 1.15 | 1.30 |
| Methyläthylketon-Pyridin-Wasser-Eisessig (70:15:15:2) | — | 0.45 | 0.49 | 0.54 | 0.53 | 0.64 | 0.70 | 0.76 | 0.84 | 0.83 |
| Aceton- <i>p</i> -Hydroxybenzoesäuremethylester-1 N NH ₄ OH (16:1:3) | + | 0.15 | 0.12 | 0.33 | 0.23 | 0.65 | 0.23 | 0.18 | 0.48 | 0.35 |
| n-Butanol-Methylcellosolve-1 N NH ₄ OH (8:1:1) | + | 0.18 | 0.19 | 0.30 | 0.24 | 0.51 | 0.36 | 0.38 | 0.60 | 0.48 |
| Methyläthylketon-Cellosolve-1 N NH ₄ OH (8:1:1) | + | 0.09 | 0.06 | 0.24 | 0.15 | 0.44 | 0.21 | 0.14 | 0.55 | 0.34 |
| Methyläthylketon-Methylcellosolve-Formamid (4:1:1) | + | 0.18 | 0.23 | 0.26 | 0.30 | 0.77 | 0.23 | 0.30 | 0.34 | 0.39 |
| Aceton-Methylcellosolve-Formamid (4:1:1) | + | 0.17 | 0.14 | 0.32 | 0.28 | 0.46 | 0.37 | 0.30 | 0.70 | 0.61 |

^a T₁ = Monojodtyrosin; T₂ = Dijodtyrosin; T₃ = 3,5,3'-Trijodthyronin; T₄ = Thyroxin.

^b R_F-Wert in Bezug auf Jodid.

^c 3 g Kieselgel.

^d 10 g Kieselgel.

^e 5 g Kieselgel.

^f Zweimalige Laufzeit (erneutes Einsetzen).

^g Doppelte Laufzeit (Durchlauftechnik).

^h Dreimalige Laufzeit (3 Einsetzen).

Magnesiumsulfat als Adsorbens.

im Sinne einer Schilddrüsenüberfunktion führen. Bei pauschaler Bestimmung des Hormonjods im Serum (PB¹²⁷I) und (BE¹²⁷I) mit üblichen Methoden¹⁷ wird ein pathologisch verändertes Mengenverhältnis T₄:T₃ nicht erfasst, und es ist eventuell möglich, dass bei "im Normbereich" liegenden Werten unter Umständen trotzdem eine hyperthyreote Stoffwechsellage bestehen kann. In Fig. 1 und 2 sind die Chromatogramme eines unserer Hyperthyreosefälle dargestellt. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung im Hinblick auf die durch Papierchromatografie und Dünnschichtchromatografie nachgewiesenen Verhältnisse von T₃ zu T₄. Zum quantitativen Vergleich sind die ermittelten Werte bei ein- und zweidimensionaler Dünnschichtchromatografie, sowie bei Papierchromatografie in Tabelle II zusammengestellt.

TABELLE II

VERGLEICH DER AUS DREI METHODEN GEWONNENEN PROZENTUALEN AKTIVITÄTSWERTE

| <i>Substanz</i> | <i>Zwei- dimensionale DC</i> | <i>Ein- dimensionale DC</i> | <i>Papier- chromato- grafie</i> | <i>Mittelwert</i> |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|
| 3,5,3'-Trijodthyronin | 50.0 | 50.7 | 50.7 | 50.47 |
| Thyroxin | 38.9 | 39.5 | 37.9 | 38.77 |
| Jodid | 2.9 | 3.8 | 3.6 | 3.43 |
| Rest | 7.0 | 5.9 | 7.6 | 6.83 |

Die klinische Problematik des erwähnten Falles kann hier ebensowenig besprochen werden, wie etwa Probleme der thyreoidalen Jodfehlverwertung¹⁸ etc. Nur soviel sei gesagt, dass bei der Untersuchung der ¹³¹J-markierten Hormone und ihrer Metaboliten die Jodkinetik von entscheidendem Interesse ist. Serienuntersuchungen von Blutproben können daher zur Bearbeitung spezieller Fragestellungen erforderlich sein. Die schnell und einfach durchführbare Technik der Dünnschichtchromatografie bietet hierfür günstige Voraussetzungen.

ZUSAMMENFASSUNG

Anhand der Ergebnisse systematischer Untersuchungen wird die Anwendungsmöglichkeit der Dünnschichtchromatografie zur Analyse von Jodhormonverbindungen aufgezeigt. Zur Erläuterung ist ein Fall der klinischen Praxis angeführt. Als entscheidende Vorteile der Dünnschichtchromatografie-Technik wird auf deren relativ einfache Handhabung, die kurze Laufzeit und die ausgezeichneten Trenneffekte hingewiesen.

SUMMARY

The results of systematic investigations have shown that thin-layer chromatography can be applied to the analysis of hormonal iodo-compounds. As an illustration a clinical case is discussed. It is emphasized that the primary advantages of thin-layer chromatography are its relative simplicity, rapidity and the excellent separations obtainable.

LITERATUR

- 1 N. A. ISMAILOV UND M. S. SCHRAIBER, *Farmazia*, No. 3 (1938) 1.
- 2 E. STAHL, *Chemiker Ztg.*, 82 (1958) 323.
- 3 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 1962.
- 4 J. GROSS UND C. P. LEBLOND, *Endocrinology*, 48 (1951) 714.
- 5 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 1962, S. 403.
- 6 D. WALDI, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 1962, S. 496.
- 7 W. KEIDERLING UND D. EMRICH, *Klin. Wochschr.*, 38 (1960) 535.
- 8 C. WINKLER, *Strahlentherapie*, 39 (1951) 468.
- 9 E. KLEIN, *Biochem. Z.*, 326 (1955) 9.
- 10 K. TEICHER, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 100 (1960) 283.
- 11 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND A. R. FAHMY, *Experientia*, 18 (1962) 101.
- 12 E. VON ARX UND R. NEHER, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 329.
- 13 E. NÜRNBERG, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 610.
- 14 P. WOLLENWEBER, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 369.
- 15 C. WINKLER UND H. SCHORN, *Atompraxis*, im Druck.
- 16 C. WINKLER, H. SCHORN UND G. KLOSS, in Vorbereitung.
- 17 K. STERLING UND A. HEGEDUS, *J. Clin. Invest.*, 41 (1962) 1039.
- 18 J. B. STANBURY, K. OHELA UND R. PITT-RIVERS, *J. Clin. Endocrinol.*, 15 (1955) 54.

J. Chromatog., 18 (1965) 69-75