

## ÜBER RADIOAKTIV MARKIERTE VERBINDUNGEN

## IV. MITTEILUNG. DER PAPIERLEERWERT ALS STÖRFaktor BEI DER QUANTITATIVEN BESTIMMUNG REDUZIERENDER SUBSTANZEN MITTELS TETRAZOLIUMSALZEN AUF CHROMATOGRAPHIEPAPIER

WALTER HARTRODT

*Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für kortiko-viszerale Pathologie und Therapie\*, Berlin-Buch (Deutschland)*

(Eingegangen den 24. Mai 1966)

Die direkte Umsetzung reduzierender Substanzen (Steroide, Zucker, Ferment-systeme) auf Papierchromatogrammen<sup>1-10</sup> durch Besprühen oder Tauchen mit alkalischen Tetrazoliumsalzlösungen ist auch für die Anwendung<sup>11-14</sup> radioaktiver Tetrazoliumsalze, wie sie kürzlich<sup>15,16</sup> mit <sup>14</sup>C und <sup>3</sup>H markiert wurden, vorteilhaft. Die Methode erlaubt, das überschüssige, radioaktive Tetrazoliumsalz nach der Reaktion durch Waschen der Chromatogramme mit Wasser oder 2 %iger Essigsäure<sup>2</sup> zu entfernen. An Stelle der photometrischen Auswertung wird das schwerlösliche, radioaktive Formazan auf dem Chromatogramm oder nach der Elution (z.B. Äthylacetat-Methanol, 7:3 v/v) mit einem geeigneten Durchfluss- bzw. Szintillationszähler gemessen.

Auch die von VECSEI<sup>10,12</sup> beschriebene chromatographische Trennung von Tetrazoliumsalzen und entsprechenden Formazanen im Bush B<sub>5</sub>-System lässt sich unter diesen Bedingungen anwenden.

Trotzdem erscheint es für einen exakten Nachweis günstiger, die betreffenden Substanzen vorher von den Chromatogrammen zu eluieren, erneut auf wesentlich kleinere Papierflächen aufzutragen und diese zu tauchen. Dadurch wird radioaktives Tetrazoliumsalz eingespart, die konzentriertere Strahlung besser messbar und der Papierleerwert wesentlich herabgedrückt.

Da der Papierleerwert die Empfindlichkeit einer Bestimmungsmethode entscheidend begrenzen kann, wurden mit dem von uns durch Austauschmarkierung gewonnenen 2,5-Diphenyl-3-(*p*-jodphenyl)-tetrazoliumchlorid-[<sup>131</sup>J] (<sup>131</sup>JTTC)\*\* verschiedene unbehandelte und mit Lösungsmitteln gewaschene Chromatographiepapiere vergleichend untersucht.\*\*\* In der Literatur existieren nur wenige Angaben über die Bedeutung einer Vorbehandlung der Chromatographiepapiere, durch die eine Verminderung des Papierleerwertes als Störfaktor bei Mikrobestimmungen mit Tetrazoliumsalzen erreicht werden kann (vergl. Tabelle I).

Einige andere Hinweise<sup>5,22-25</sup> deuten die vorhandene bzw. mögliche Störgröße des Papierleerwertes an.

\* Direktor: Prof. Dr. med. R. BAUMANN.

\*\* Synthese wird an anderer Stelle beschrieben.

\*\*\* Unter dankenswerter Assistenz von Frau G. LAUX und Fr. H. STAUSKE.

TABELLE I

VORBEHANDELTE CHROMATOGRAPHIEPAPIERE BEI TETRAZOLIUMSALZREAKTIONEN

<i>Literatur</i>	<i>Papiersorte</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Behandlungszeit</i>
AXELROD <sup>17</sup>	Whatman No. 1	2 N Essigsäure, dest. Wasser, dest. Methanol	3 Tage
NOWACZYNSKI, KOIW UND GENEST <sup>18</sup>	Whatman No. 2	Soxhlet: Benzol-Methanol (1:1 v/v)	72 Std.
BRAUNSBURG UND JAMES <sup>10</sup> (nach LEWIS)	keine Angabe	2 N äthanolische NaOH	sorgfältig
ENDRÖCZI UND YANG <sup>20</sup>	S.S.2043b	Äthylacetat-Äthanol	mehrere Tage
BENRAAD UND KLOPPEN- BORG <sup>21</sup>	Whatman No. 1	Soxhlet: Methanol	verschiedene Tage

## METHODISCHER TEIL

*Herstellung der Papiere*

Von 11 gebräuchlichen Chromatographiepapieren wurden längere Streifen (ungefähr 4 × 30 cm) in Chromatographiegefäßen 5 Tage absteigend mit gereinigtem Methanol\* bzw. 2 N methanolischer KOH gewaschen und nach 2–3 Std. vortrocknen an der Luft im Exi an der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Die mit methanolischer KOH getränkten Streifen müssen vor dem Trocknen bis zur neutralen Reaktion mit dest. Wasser und anschliessend mit gereinigtem Methanol gewaschen werden. Für die Untersuchungen wurden von den unbehandelten und mit Methanol bzw. methanolischer KOH gewaschenen Papieren Blättchen im Format 2 × 2 cm benutzt.

*Tauchmethode*

Die spezifische Aktivität des <sup>131</sup>JTTC betrug durchschnittlich 1 mC/10–15 mg, die in 2 ml Methanol-Wasser (1:1) gelöst waren. Davon wurden 0.2 ml mit 1.6 ml 10 %igem wässrigen Tetramethylammoniumhydroxyd (TMAH) auf einem Urglas verrührt und in diese ungefähr 0.06–0.08 %ige, frisch hergestellte Lösung vom pH 11–12 mit einer Pinzette 6–8 Blättchen kurz eingetaucht. Die anschliessende Entwicklung (1–5 min) der Blättchen geschah wegen der allgemeinen Lichtempfindlichkeit der Tetrazoliumsalze im Dunkeln auf Objektträgern, ehe sie in 50 ml Wasser bzw. 2 %iger Essigsäure unter leichtem Schütteln 60 min eluiert wurden, wobei der Flüssigkeitswechsel alle 15 min erfolgte.

Um den Anteil des nicht eluierten <sup>131</sup>JTTC am Papierleerwert festzustellen, wurden genaue Mengen <sup>131</sup>JTTC mit bekannter Impulszahl im Bereich von 0.01 bis 0.02 ml (50–150 µg) auf die Blättchen pipettiert und diese sofort wie oben eluiert. Diese <sup>131</sup>JTTC-Konzentrationen/Blättchen gewährleisteten ein ausreichendes Angebot für Mikrobestimmungen reduzierender Substanzen unter 10 µg.

*Radioaktive Messung der Chromatographiepapiere*

Die eluierten Blättchen wurden kurze Zeit zur Entfernung der Essigsäure in dest.

\* Angesäuert und mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin am Rückfluss gekocht.

Wasser gelegt, auf Filterpapier angetrocknet und noch feucht auf Plexiglas-Schälchen unter einem Szintillationszähler\* gemessen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Anwendung eines formazanfreien, radioaktiven Tetrazoliumsalzes nach der beschriebenen Tauchmethode sollte der Papierleerwert aus dem restlichen, nicht eluierten Tetrazoliumsalz und dem durch unspezifische, besonders im alkalischen Milieu reduzierende Substanzen des jeweiligen Papiers entstehenden Formazan resultieren. Mit der radioaktiven Messung lassen sich die Anteile der beiden Komponenten relativ einfach erfassen. Vorversuche ergaben, dass die Eluierbarkeit des <sup>131</sup>JTTC von Chromatographiepapieren mittels Wasser oder 2 %iger Essigsäure durch öfteren Wechsel des Elutionsmittels erleichtert und besonders durch leichtes Schütteln zeitlich verbessert wird.

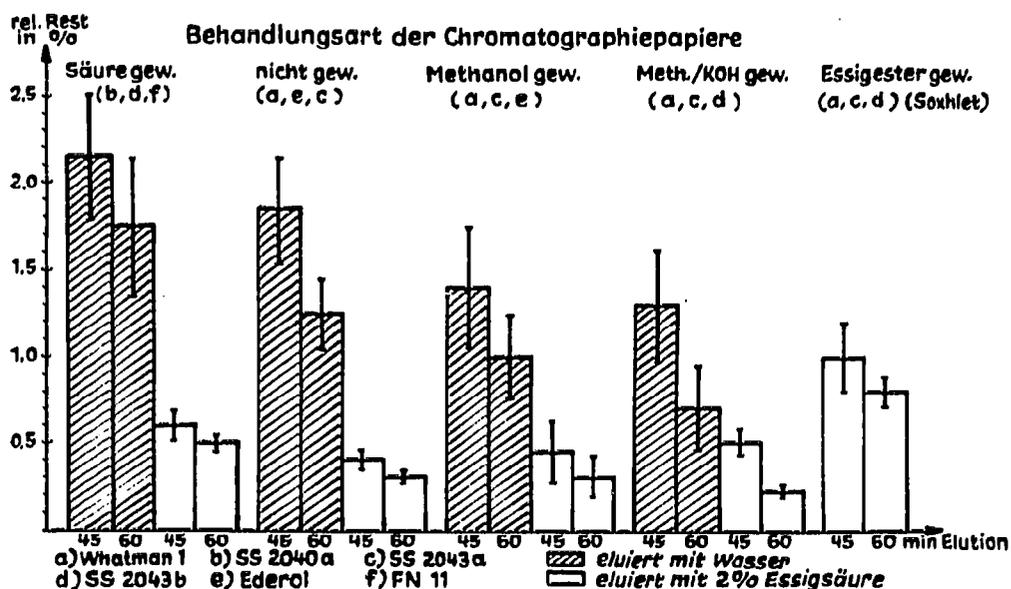


Fig. 1. Die Elution von <sup>131</sup>JTTC (50–150 µg) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Chromatographiepapieren und Elutionsmitteln (schütteln; 15-minütiger Wechsel des Elutionsmittels).

Wie die Ergebnisse der Fig. 1 zeigen, ist zur Erreichung einer niedrigen Restquote eine Eluierungszeit von 60 min nützlich und die Verwendung 2 %iger Essigsäure gegenüber Wasser von erheblichem Vorteil, was auf der Bildung des leichter löslichen Tetrazoliumacetats beruhen dürfte. Von den unterschiedlich vorbehandelten Papieren ergaben die mit Methanol bzw. Methanol-KOH gewaschenen Papiere mit beiden Elutionsmitteln die günstigsten Resultate, wobei allgemein die Papiersorten auf die Eluierbarkeit von <sup>131</sup>JTTC keine wesentliche Rolle spielen. Auch der Gebrauch von Toluol-Methanol vorgewaschenen Papieren (6 Std. im Soxhlet) ergab nur Werte, die etwas tiefer als die mit Essigester behandelten Papiere lagen.

Bei der Beurteilung der Papiere ist jedoch das aufgetragene <sup>131</sup>JTTC unmittelbar danach zu eluieren, da die Substanz wie die meisten Tetrazoliumsalze lichtempfindlich

\* VA-S-971 in Verbindung mit dem Zählgerät VA-M-16 (beide VEB Vakutronik Dresden) bzw. FH 49 und Probenwechsler FH 449 (beide Fricsecke u. Höpfner Erlangen).

TABELLE II

DER EINFLUSS VON TAGESLICHT AUF DIE ELUTION VON  $^{131}\text{JTTC}$   
60 min. mit 2%iger Essigsäure eluiert; Mittelwerte.

Papier (Format: 2 × 2 cm)	Anfangs-Impulse	Liegezeit	End-Impulse	Rest %
SS 2043a Meth.-KOH gewaschen (29.1.1966)	169491 c.p.m.	30 min	478 c.p.m.	0.28
	$^{131}\text{JTTC}$ (24.1.66; 74 $\mu\text{g}/0.01$ ml)	75 min	729 c.p.m.	0.43
		150 min	1289 c.p.m.	0.76

ist<sup>5,26</sup>, und die je nach Liegezeit auftretende schwache Rotfärbung als erhöhte Restquote radioaktiv eindeutig gemessen werden kann (Tabelle II).

Unter Berücksichtigung der in Fig. 1 und Tabelle II gefundenen günstigen Faktoren interessierte schliesslich, inwieweit eine entscheidende Beziehung zwischen dem nicht eluierbaren Tetrazoliumsalz und seiner eingesetzten Konzentration besteht.

Innerhalb des verwendeten Konzentrationsbereiches pro Papierblättchen zeigten die Versuche mit steigenden  $^{131}\text{JTTC}$ -Mengen (Tabelle III), dass die Erhöhung des Tetrazoliumsalzrestes keineswegs proportional erfolgt, was sich deutlich in den ab-

TABELLE III

DIE ELUTION VON  $^{131}\text{JTTC}$  IN ABHÄNGIGKEIT VON SEINER KONZENTRATION  
60 min mit 2%iger Essigsäure eluiert; Mittelwerte.

Papiersorte Format: 2 × 2 cm)	$^{131}\text{JTTC}$ -Menge	Anfangs-Impulse	End-Impulse	Rest %
SS 2043b Meth.-KOH gewaschen (10.9.1965)	75 $\mu\text{g}$ (0.01 ml)	87000 c.p.m.	116 c.p.m.	0.13
	150 $\mu\text{g}$ (0.02 ml)	174000 c.p.m.	174 c.p.m.	0.10
	225 $\mu\text{g}$ (0.03 ml)	261000 c.p.m.	213 c.p.m.	0.08
Whatman No. 1 Meth.-KOH gewaschen (10.9.1965)	75 $\mu\text{g}$ (0.01 ml)	87000 c.p.m.	211 c.p.m.	0.25
	150 $\mu\text{g}$ (0.02 ml)	174000 c.p.m.	300 c.p.m.	0.17
	225 $\mu\text{g}$ (0.03 ml)	261000 c.p.m.	282 c.p.m.	0.11

nehmenden prozentualen Werten ausdrückt. Ähnliche Werte wurden mit den gleichen Papiersorten und Konzentrationen eines anderen  $^{131}\text{JTTC}$ -Präparates nach einer von VECSEI *et al.*<sup>4</sup> beschriebenen Verstärkungschromatographie im BUSH A-System erhalten. Die Ergebnisse deuten auf eine allgemeine Absorptionseigenschaft der Chromatographiepapiere von nur geringen Unterschieden hin, wobei der hauptsächlich vom vorbehandelten Papier und Eluierungsmittel abhängige Tetrazoliumsalzrest kaum verändert wird. Im stark alkalischen Bereich ist zu erwarten, dass dieser relativ geringe Anteil am Papierleerwert auch oder zusätzlich als quartäre schwerlösliche Tetrazoliumbase<sup>27, 28</sup> vorliegen kann.

Wesentlich andere Verhältnisse ergeben sich zwischen der Höhe des Papierleerwertes und den verschiedenen Papiersorten bzw. ihrer Vorbehandlung, wenn in dem für die Reaktion mit Tetrazoliumsalzen erforderlichen alkalischen Milieu die unspezifischen Substanzen der Papiere das  $^{131}\text{JTTC}$  zum entsprechenden  $^{131}\text{J}$ -Formazan reduzieren können. Die Untersuchungen wurden mit 10%igem TMAH (pH

11-12) durchgeführt, da eine starke Alkalität mögliche Unterschiede der Papiere besser erkennen lässt und z.B. mit NaOH bei der Bestimmung von Zuckern<sup>5, 20</sup> und Steroiden<sup>4, 8, 30, 31</sup> erforderlich ist.

Unter gleichen Bedingungen (<sup>131</sup>JTTC-Präparat; Zeit) ergaben die 11 getesteten Papiersorten eindeutig unterschiedliche Restimpulse und teilweise Rosafärbung, wobei allgemein eine Verminderung vom unbehandelten zum Methanol und Methanol-KOH gewaschenen Papier erfolgte. Neben den Papieren mit relativ hohen Restimpulsen (MN 214\*, FN 11\*\*, SS 2045b Mgl, SS 2045a) mussten auch teilweise Papiere mit niederen Restimpulsen (Whatman No. 1, SS 2040a, SS 2040a (Säure gew.), SS 2043a) als wenig geeignet angesehen werden, weil ihre mechanische Festigkeit durch die Methanol-KOH-Vorbehandlung merklich verringert<sup>10</sup> war.

Die Abstufungen und Eigenschaften der übrigen brauchbaren Papiere sind in Tabelle IV dargestellt.

TABELLE IV

MITTLERE LEERWERTE UNTERSCHIEDLICH VORBEHANDELTEN PAPIERE NACH DER REAKTION MIT ALKALISCHER <sup>131</sup>JTTC-LÖSUNG (10.1.66)

<i>Papiersorte</i> (18.1.1966)	<i>Reinigungsart</i>	<i>C.p.m./</i> <i>Blättchengewicht</i>	<i>Rel. c.p.m./</i> <i>Blättchen</i>	<i>C.p.m./1 mg</i>	<i>Rel. c.p.m./</i> <i>1 mg</i>
<i>Format: 2 x 2 cm</i>					
SS 2043a Mgl	Meth.-KOH gew.	3623/33.7 mg	100 %	107	111 %
	Methanol gew.	5037/34.0 mg	139 %	148	154 %
SS 2043b Mgl	Meth.-KOH gew.	5464/48.5 mg	150 %	112	116 %
	Methanol gew.	8994/47.4 mg	248 %	190	198 %
SS 2043b	Meth.-KOH gew.	4447/46.5 mg	122 %	96	100 %
(Säure gew.)	Methanol gew.	6572/44.2 mg	181 %	148	154 %

Während exakte Vergleiche der Restimpulse auf Grund der Abklingzeit und unterschiedlichen Aktivität der <sup>131</sup>JTTC-Präparate nur in zeitlich gemeinsamen Versuchsreihen erfolgen können, ist die Beurteilung nach rel. c.p.m./Blättchen (Fläche) davon unabhängig. Nach einer Methanol-KOH-Vorbehandlung zeigen das SS 2043a Mgl vor dem SS 2043b (Säure gew.) die besten Eigenschaften, die sich jedoch in der Reihenfolge umkehren, wenn statt Impulszahl/Fläche die Impulszahl/Gewicht (1 mg Papier) für die Papierqualität berücksichtigt wird.

Mit beiden Papieren wurde die Abhängigkeit des Leerwertes von der eingesetzten <sup>131</sup>JTTC-Konzentration, der Alkalistufe und der Entwicklungszeit nach dem Tauchen (Tabelle V) untersucht.

Besonders bei einer Steigerung der beiden letzten Parameter — Entwicklungszeit und Alkalität — erhöhen sich die Leerwerte, was sicherlich auf einer zunehmenden Veränderung der Cellulose durch Alkali beruht. Die Vermehrung an reduzierenden, unspezifischen Substanzen innerhalb einer Papiersorte ist in Tabelle V deutlich zu erkennen, und die Reaktionen mit Tetrazoliumsalzen auf Chromatographiepapieren sollten daher kurzzeitig und mit minimal erforderlichem Alkaligehalt durchgeführt werden.

\* Macheroy u. Nagel.

\*\* VEB Niederschlag (Erzgeb.).

TABELLE V

MITTLERE LEERWERTE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ENTWICKLUNGSZEIT NACH DER REAKTION MIT ALKALISCHER  $^{131}\text{JTTC}$ -LÖSUNG

Entw.-Zeit	SS 2043b (S. gew.)		SS 2043a Mgl	
	C.p.m./Blättchen- gewicht (Fläche)	Rel. c.p.m./ Blättchen	C.p.m./Blättchen- gewicht (Fläche)	Rel. c.p.m./ Blättchen
1 min	4057/47.2 mg	100 %	3363/35.2 mg	100 %
2 min	5015/47.3 mg	123 %	3890/35.4 mg	116 %
3 min	5885/47.8 mg	144 %	4568/35.8 mg	135 %
5 min	7143/47.4 mg	176 %	5244/35.6 mg	155 %

Zwischen der verwendeten Tauchmethode und dem Einlegen der Papierblättchen in die alkalische  $^{131}\text{JTTC}$ -Lösung für die gesamte Entwicklungszeit\* ergaben sich keine Unterschiede im Leerwert, wobei jedoch zu bedenken ist, dass durch das Einlegen der Papiere die zu bestimmenden Substanzen ausgelaugt werden können. Die Spray-Methode<sup>4</sup> ist aus Gründen des Strahlenschutzes mit dem  $^{131}\text{JTTC}$  nicht vertretbar.

Der Anteil unspezifischer, reduzierender Substanzen am Leerwert ist durchschnittlich 10–20mal grösser als der Rest an nicht eluierbarem  $^{131}\text{JTTC}$ . Eine weitere Senkung sollte bei Anwendung von Glasfaserpapier oder acetyliertem Papier möglich sein. Es ist anzunehmen, dass die mit der radioaktiven Methodik erfassten Faktoren auch bei Anwendung anderer Tetrazoliumsalze für den Papierleerwert massgebend sind.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die Mikrobestimmung reduzierender Substanzen mit Tetrazoliumsalzen auf Papierchromatogrammen ist besonders für radioaktive Tetrazoliumsalze vorteilhaft. Dabei kann jedoch der Papierleerwert die Auswertung der gebildeten Formazane beträchtlich stören. Während das überschüssige Tetrazoliumsalz mit 2 %iger Essigsäure gut eluiert wird (unter 1 %), bilden die unspezifischen reduzierenden Substanzen der Chromatographiepapiere den Hauptanteil am Papierleerwert. Mit Methanol/KOH vorbehandeltes SS 2043a und SS 2043b (Säure gewaschen), kurze Reaktionszeit und möglichst geringer Alkaligehalt der Tetrazoliumsalzlösung ergeben die niedrigsten Papierleerwerte. Die Versuche wurden mit  $^{131}\text{J}$ -markiertem Triphenyltetrazoliumchlorid ( $^{131}\text{JTTC}$ ) durchgeführt und das  $^{131}\text{J}$ -Formazan auf dem Chromatographiepapier direkt radioaktiv gemessen.

#### SUMMARY

The micro-determination of reducing substances with tetrazolium salts on paper chromatograms is of advantage especially for radioactive tetrazolium salts. However, the paper blank value may considerably impede the analysis of the produced formazans. While the excess tetrazolium salt is satisfactorily eluted (below 1 %) with 2 %

\* Privatmitteilung von P. VECSEI.

acetic acid, the unspecific reducing substances of chromatography papers form the main part of the paper blank value. The lower paper blank values are obtained by pretreating SS 2043a and SS 2043b (acid washed) with methanol/KOH, and by having as short a reaction time and as low an alkalinity of the tetrazolium salt solution as possible. The experiments were conducted with  $^{131}\text{I}$ -labelled triphenyl-tetrazolium chloride ( $^{131}\text{ITTC}$ ) and the radioactivity of the  $^{131}\text{I}$ -formazan was measured directly on the chromatography paper.

## LITERATUR

- 1 R. B. BURTON, A. ZAFFARONI UND E. H. KEUTMANN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 763.
- 2 S. BURSTEIN UND H. KIMBALL, *Anal. Biochem.*, 4 (1962) 132.
- 3 I. E. BUSH, in D. GLICK (Herausgeber), *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. XI, Interscience, New York, 1963, S. 149.
- 4 T. GOSZTONYI, J. MÁRTON, V. KEMÉNY UND P. VECSEI (WEISZ), *J. Chromatog.*, 10 (1963) 29.
- 5 W. HERB UND H. VENNER, *Z. Physiol. Chem.*, 308 (1957) 36.
- 6 H. J. HÜBNER UND W. H. STAIB, *Biochemie der Nebennierenrindenhormone*, Thieme, Stuttgart, 1965, S. 147.
- 7 M. KRAUS UND M. POPP, *Physiol. Bohemoslov.*, 13 (1964) 457.
- 8 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *J. Clin. Invest.*, 35 (1956) 800.
- 9 S. B. PAL, *Acta Endocrinol.*, 47 (1964) 466.
- 10 P. VECSEI, D. TANKA, K. FARKAS, M. KELLER UND V. KEMÉNY, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 525.
- 11 J. MÁRTON, T. GOSZTONYI, P. WEISZ UND J. MEISEL, *Acta Endocrinol., Suppl.*, 51 (1960) 1055.
- 12 P. VECSEI, D. TANKA, M. KELLER, V. KEMÉNY, J. MÁRTON UND T. GOSZTONYI, *Acta Physiol. Hung.*, 22 (1962) 125.
- 13 P. WEISZ (VECSEI), J. MÁRTON UND T. GOSZTONYI, *Lancet*, (1960) 286.
- 14 P. WEISZ (VECSEI), J. MÁRTON UND T. GOSZTONYI, *Acta Physiol. Hung., Suppl.*, 16 (1959) 7.
- 15 J. MÁRTON, T. GOSZTONYI UND L. ÖTVÖS, *Acta Chim. Hung.*, 25 (1960) 115.
- 16 T. GOSZTONYI, J. MÁRTON, P. VECSEI (WEISZ) UND V. KEMÉNY, *Nucl. Med.*, 4 (1964) 220.
- 17 L. R. AXELROD, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 173.
- 18 W. NOWACZYNSKI, E. KOIW UND J. GENEST, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35 (1957) 425.
- 19 H. BRAUNSBURG UND V. H. T. JAMES, *J. Endocrinol.*, 21 (1960) 327.
- 20 E. ENDRÖCZI UND T. L. YANG, *Acta Physiol. Hung.*, 18 (1961) 125.
- 21 T. J. BENRAAD UND P. W. C. KLOPPENBORG, *Clin. Chim. Acta*, 12 (1965) 565.
- 22 G. DÜSTERDIECK, *Dissertation*, Technische Hochschule, München, 1965.
- 23 E. HEFTMAN, *Chem. Rev.*, 55 (1955) 693.
- 24 G. OERTEL, *Chemische Bestimmungen von Steroiden im Menschlichen Plasma*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962, S. 56.
- 25 F. G. PÉRON, in R. I. DORFMAN (Herausgeber), *Methods in Hormone Research*, Vol. I, Academic Press, New York, 1962, Chap. 6, S. 218.
- 26 H. BEYER UND T. PYL, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 1505.
- 27 N. D. CHERONIS, *Mikrochim. Acta*, (1956) 925.
- 28 N. D. CHERONIS UND H. STEIN, *J. Chem. Educ.*, 33 (1956) 120.
- 29 G. AVIGAD, R. ZELIKSON UND S. HESTRIN, *Biochem. J.*, 80 (1960) 57.
- 30 H. CARSTENSEN, in D. GLICK (Herausgeber), *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. IX, Interscience, New York, 1962, S. 133.
- 31 R. NEHER, *Steroid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 1964, S. 122.