

CHROMATOGRAPHISCHE EIGENSCHAFTEN VON ALUMINIUMOXIDEN UNTERSCHIEDLICHER STRUKTUR

H. HALPAAP UND W. REICH

Chemische Forschung, E. Merck AG, Darmstadt (Deutschland)

SUMMARY

Chromatographic properties of aluminium oxides with different structures

A series of aluminium oxides may be prepared by heating hydrargillite up to 1150°. The structures of the oxides were determined by Debye-Scherrer pictures and specific surfaces according to the BET method. Distinct differences can be noticed in their chromatographic behaviour, which is particularly evident when isomeric compounds are to be separated. A new type of alumina possessing a smaller specific surface is recommended for chromatography.

Aluminiumoxid gilt neben Kieselgel und Magnesiumsilikat allgemein als starkes Adsorbens von hoher Aktivität. Ein auf 350–400° erhitztes Aluminiumoxid zieht aus der Luft Wasser an und verliert durch Blockierung der aktivsten Zentren seiner Oberfläche an Aktivität. Durch weiteren dosierten Wasserzusatz lassen sich so aus dem starken Adsorbens schwächere Aktivitätsstufen^{1,2} erreichen, die in ihren Eigenschaften weniger aktiven Sorptionsmitteln gleichkommen. Das Wasser wird dabei teils chemisch durch Einbau von Hydroxylgruppen in das Gitter³, teils adsorptiv durch Wasserstoffbrückenbindung⁴ gebunden. Die Aktivitätsstufen I bis V werden nach dem chromatographischen Verhalten der von BROCKMANN UND SCHODDER¹ bzw. STAHL⁵ ausgewählten Testfarbstoffe festgelegt und dienen zur Charakterisierung des Adsorptionsvermögens der Aluminiumoxide.

Diese sogenannte Standardisierung ist zweifellos bei der Säulenchromatographie unpolarer Substanzen mit Fliessmitteln geringer Dielektrizitätskonstanten berechtigt. Sobald man aber bei der üblichen Gradientenchromatographie stärker polare Fliessmittel benutzt, ist mit einer teilweisen Verdrängung des Wassers besonders bei Aluminiumoxiden höherer Aktivitätsstufen zu rechnen. Zu dem Lösungsmittelgradienten tritt also noch ein Aktivitätsgradient in der Säule auf. Die Ermittlung des vorhandenen Adsorptionsmilieus⁶, das sich aus der Wechselwirkung von Fliessmittel und Sorptionsmittel ergibt, wird dadurch sehr kompliziert, so dass man von einer Standardisierung der Versuchsbedingungen nicht mehr sprechen kann.

Bei der Dünnschichtchromatographie an Aluminiumoxiden sind die Verhältnisse noch komplizierter. Die beim Beschichten der Platte verlorengewangene Aktivität wird zwar durch das anschliessende Trocknen wiedergewonnen, auch kann die gewünschte Brockmann-Stufe durch Einstellen der Platten in eine Kammer mit de-

finierter relativer Feuchtigkeit eingehalten werden⁶. Während der Chromatographie aber lässt sich auch in einer aufwendigen Apparatur eine bestimmte Aktivitätsstufe besonders bei Anwendung stärker polarer Fließmittel nicht einhalten.

Für die Dünnschicht-, aber auch für die Säulenchromatographie erscheint es daher zweckmässig, das jeweilige Sorptionsmittel im Zustand der normalen Luftfeuchtigkeit, also in seiner Gleichgewichtsaktivität, zu verwenden. Eine Standardisierung sollte nicht auf variierendem Wassergehalt beruhen, sondern auf echten, stabilen Aktivitätsstufen, die sich nur aus Unterschieden in der Sorptionsmittelstruktur herleiten lassen. Der Wert der Einteilung der Aluminiumoxide nach Brockmann-Stufen wird überschätzt, denn bei weitem nicht alle Trennungen lassen sich mit einem aktiven, nur durch Wasserzugabe variierbaren Adsorbens durchführen. Die neutralen und sauren Aluminiumoxide, die beide durch nachträgliche Säurebehandlung hergestellt sind⁷, stellen hinsichtlich ihrer Aktivitäten keine neuen Formen dar. Bei Verwendung stark polarer Fließmittel unterscheiden sie sich in ihrem Austauschvermögen^{6,8}; das normale basische Aluminiumoxid ist schwach kationotrop, das saure schwach anionotrop. Kaum beachtet wurden bisher die komplizierten Zusammenhänge zwischen Herstellungsverfahren der verschiedenen Aluminiumoxide, ihren unterschiedlichen Gerüststrukturen und ihrem chromatographischen Verhalten.

Die Rohstoffe zur Herstellung von Aluminiumoxiden sind die Aluminiumhydroxide Hydrargillit, Bayerit und Nordstrandit sowie die Aluminiumoxidhydroxide Böhmit und Diaspor. Während der Entwässerung durchlaufen diese Verbindungen mit steigenden Temperaturen eine Reihe von Zwischenzuständen. Bei etwa 1200° wird ein stabiler Endzustand, die Modifikation α -Al₂O₃ erreicht, die mit dem natürlichen Korund identisch ist⁹. In den Zwischenzuständen liegen Übergangsoxide vor, die noch Hydroxylgruppen enthalten. Bei ihnen handelt es sich um keine eigentlichen Modifikationen, sie werden daher als χ -, κ -, η -, γ -, δ - bzw. ϑ -Form bezeichnet¹⁰. Welche dieser Formen gebildet werden, hängt—abgesehen vom Ausgangsmaterial und der Temperatur—von dem Ineinandergreifen einer Vielzahl von Faktoren wie Druck, Feuchtigkeit, Erhitzungsgeschwindigkeit, Erhitzungsdauer, Korngrösse, Alkaligehalt u.a.m. ab. In der Praxis liegen deshalb fast immer Gemische von mindestens zwei Übergangsoxiden vor. Als Ausgangsmaterial verwendet man technisch fast nur das Aluminiumhydroxid Hydrargillit, das beim Bayer-Verfahren in grosster Menge und in ausreichender Qualität anfällt.

Mit der thermischen Entwässerung der Aluminiumhydroxide bilden sich unterschiedliche Porenstrukturen aus, die die chromatographischen Eigenschaften bedingen. Die damit zusammenhängende innere Oberfläche (Summe der Wandflächen aller Poren) erreicht bei etwa 300° einen Maximalwert von etwa 300 m²/g¹¹. Für grössere Moleküle sind solche Oberflächen allerdings wegen der zu engen Poren nicht zugänglich^{11,12}. Bei weiterem Erhitzen auf höhere Temperaturen tritt neben der Entwässerung auch eine teilweise Sinterung ein, wodurch sich die Oberflächen verkleinern und die Poren erweitern⁷. Diese können dann auch durch grössere Moleküle belegt werden. Das Gebiet wird noch komplexer, wenn man bedenkt, dass unter dem Einfluss der oben erwähnten Versuchsbedingungen weitere verschiedene Oberflächenstrukturen entstehen¹³.

Zur Untersuchung dieser Vorgänge wurde Hydrargillit entsprechender Korngrösse drei Stunden in einem Kammerofen verschiedenen Temperaturen zwischen 150° und 1150° ausgesetzt. Die Versuchsbedingungen wurden dabei jeweils genau

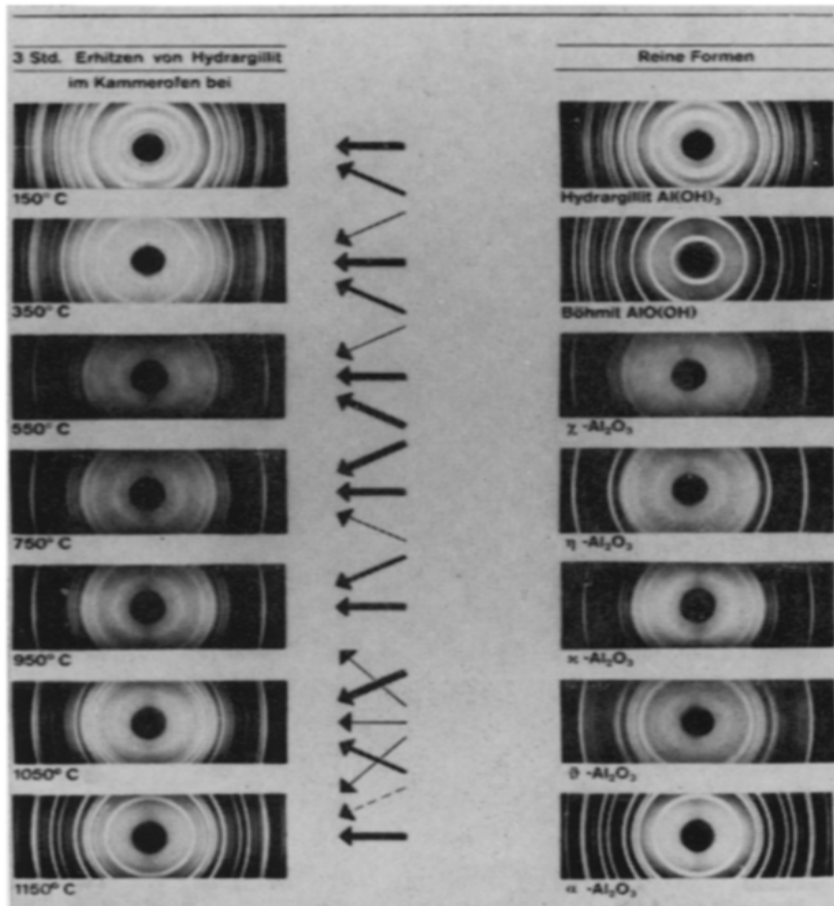


Fig. 1. Debye-Scherrer-Aufnahmen von Aluminiumhydroxiden und Aluminiumoxiden.

eingehalten, um reproduzierbare Endprodukte zu erzielen. In Fig. 1 sind die Debye-Scherrer-Aufnahmen dieser Versuchsreihe denen der in gesonderten Ansätzen hergestellten reinen Aluminiumoxidformen vergleichend gegenübergestellt. Als Aufnahmebedingungen wurden gewählt: Cu-K α -Strahlung, Belichtungszeit 2 h (35 kV, 25 mA), Kammerradius 57,54 mm, Filmmaterial Adox Mikrotest 2. Richtung und Stärke der Pfeile geben ausserdem die Zusammensetzung der bei den entsprechenden

TABELLE I

RÖNTGENANALYTISCHE BEWERTUNG VON GEGLÜHTEN HYDRARGILLITEN
3 Std. Kammerofen.

Temp. (°C)	Hydrargillit	Böhmit	ζ -Al ₂ O ₃	η -Al ₂ O ₃	κ -Al ₂ O ₃	θ -Al ₂ O ₃	α -Al ₂ O ₃
150	+++	++					
350	+	+++	++				
550		+	+++	+++			
750			+++	+++	+		
950				++	+++		+
1050					+++		++
1150					+	(+)	+++

Temperaturen gewonnenen einzelnen Mischoxide wieder, wie sie sich nach Auswertung der Pulverdiagramme ergab. Diese Bewertung ist in Tabelle I noch einmal übersichtlicher dargestellt. Bei allen gewählten Temperaturen entstehen Mischoxide von meist drei verschiedenen Formen, wobei mit steigenden Temperaturen die Aluminiumhydroxide und Aluminiumoxide in der Reihe Hydrargillit, Böhmit, χ - Al_2O_3 , η - Al_2O_3 , κ - Al_2O_3 , ϑ - Al_2O_3 , α - Al_2O_3 auftreten.

In Tabelle II sind die spez. Oberflächen nach der BET-Methode¹⁴ und die Glühverluste zwischen 300° und 1200° der in der Erhitzungsreihe entstandenen Mischoxide angeführt. Man erkennt deutlich, dass mit steigenden Temperaturen die inneren Oberflächen fast linear abnehmen, um bei 1200° mit Erreichen der reinen

TABELLE II

SPEZIFISCHE OBERFLÄCHEN VON GEGLÜHTEN HYDRARGILLITEN

3 Std. im Kammerofen (°C)	Glühverlust bei 300°-1200° (%)	Spez. Oberfläche BET-Methode (m ² /g)
150	17.5	72
350	9.0	245
550	2.5	173
750	1.6	121
950	0.6	66
1050	0.4	14
1150	0.2	9

α -Modifikation praktisch auf Null abzusinken. Auch die Glühverluste, die ein Mass für das gebundene Wasser darstellen, können zur Charakterisierung der verschiedenen Misch-Aluminiumoxide herangezogen werden. Aus der Tabelle sieht man, dass die bis etwa 400° erhitzten Präparate noch Aluminiumhydroxid-Anteile aufweisen. Die höher erhitzten Proben enthalten Reste von gebundenem Wasser, und zwar in abnehmenden Mengen mit steigenden Glühtemperaturen. Ein reines α -Aluminiumoxid ist "totgebrannt" und nimmt auch aus der Luft keine Feuchtigkeit mehr auf.

Auf Grund dieser Versuchsreihe und der ermittelten physikalischen Daten wird es verständlich, dass jede Änderung der spez. Oberfläche, des spez. Porenvolumens, des mittleren Porendurchmessers und des adsorptiv gebundenen Wassers zu Unterschieden im chromatographischen Verhalten der betreffenden Aluminiumoxid-Formen und ihrer Mischungen führen muss.

Bei dem Versuch zur Auftrennung von Testosteron und 17-epi-Testosteron werden diese Unterschiede deutlich. Diese Trennung, die in der klinischen Diagnostik zur Bestimmung der beiden Steroide im Harn von Bedeutung ist, stiess bisher auf Schwierigkeiten¹⁵. Neben der gaschromatographischen Trennung in Form der Trimethylsilyläther¹⁶ oder der Acetate¹⁷ gelang die Trennung der freien Alkohole nur gelegentlich an papierchromatographischen Systemen nach Bush¹⁸⁻²¹ oder an bestimmten Aluminiumoxidchargen²². Vor kurzem ist eine erste erfolgreiche Trennung auch an Kieselgel mit einem Dichlormethan-Äthylacetat-Gemisch bei mehrfacher Entwicklung beschrieben worden²³. Fig. 2 zeigt die Trennung dieser beiden Epimere bei

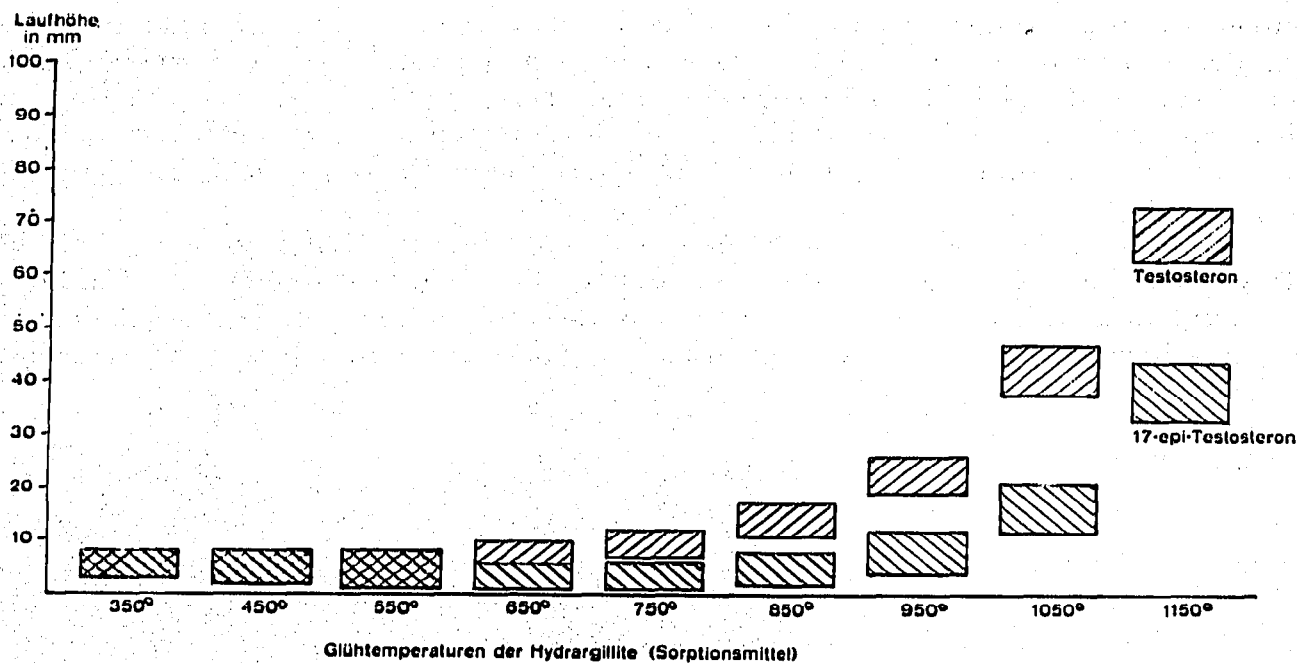


Fig. 2. Dünnschichtchromatographie von Testosteron und 17-*epi*-Testosteron an geglühten Hydrargilliten. Auftragsmenge: je 15 μ l einer Lösung von 10 mg Testosteron und 10 mg 17-*epi*-Testosteron in 10 ml Chloroform-Methanol (50:50), strichförmig auf 3 cm Länge aufgetragen. Fließmittel: Benzol-Äther (40:60), einmalige Entwicklung 10 cm.

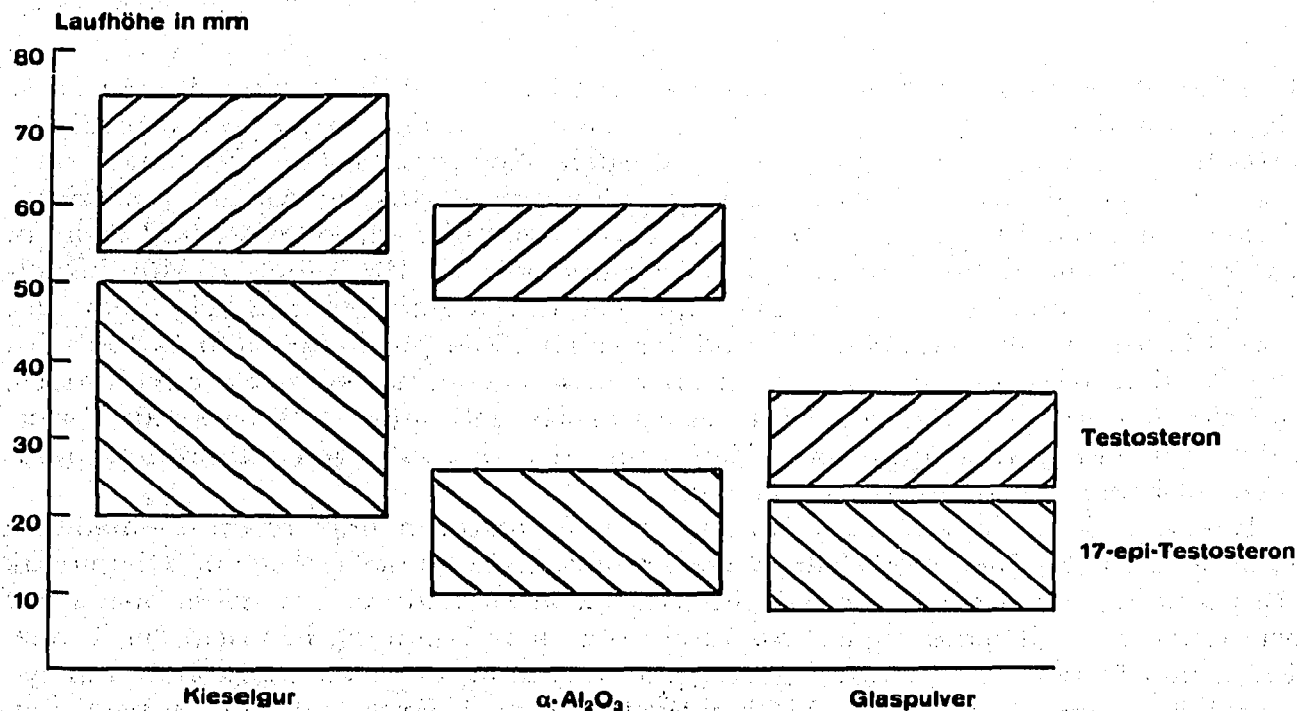


Fig. 3. Dünnschichtchromatographie von Testosteron und 17-*epi*-Testosteron an Sorptionsmitteln mit geringen spez. Oberflächen. Auftragsmenge: je 30 μ l einer Lösung von 10 mg Testosteron und 10 mg 17-*epi*-Testosteron in 10 ml Chloroform-Methanol (50:50), strichförmig auf 6 cm Länge aufgetragen. Fließmittel: Benzol, einmalige Entwicklung 10 cm.

einmaliger Entwicklung in Benzol-Äther 40:60 an den entsprechenden Mischoxiden der Versuchsreihe. Während an tiefer geglühten Aluminiumoxiden bis 550° keine Trennung erkennbar ist, wird diese an den höher geglühten Sorptionsmitteln entsprechend dem Anstieg der Glühtemperaturen deutlich besser. Allerdings steigen bei den höchst geglühten Präparaten auch die R_F -Werte an, das Adsorptionsvermögen nimmt ab und auch die Kapazität wird geringer. Diese rein adsorptionschromatographische Trennung lässt sich also nicht an einem hochaktiven Aluminiumoxid mit grosser spez. Oberfläche, sondern nur an weniger aktiven Aluminiumoxiden mit geringeren spez. Oberflächen durchführen, an denen die aktivsten Zentren fehlen. Für die Trennung ist übrigens die Gesamtstruktur des Sorptionsmittels wichtig, sie lässt sich nur an einheitlich höher geglühtem Material, nicht an einer Mischung eines hoch geglühten Materials mit einem tiefer geglühten erreichen¹⁵.

Reines $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ hat eine spez. Oberfläche von etwa 1 m²/g und liegt damit in der Grössenordnung anderer bekannter inaktiver Sorptionsmittel wie Kieselgur und Glaspulver. Fig. 3 zeigt, dass auch an diesen Sorptionsmitteln die Trennung der beiden epimeren Steroide unter gleichen Versuchsbedingungen, nämlich einmaligem Entwickeln in Benzol, möglich ist, allerdings weniger deutlich. Die geringe Kapazität des Kieselgurs im Vergleich zu $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ und Glaspulver ist auffällig.

Ein weiteres interessantes Beispiel für die Vorteile eines Aluminiumoxids mit geringerer spezifischer Oberfläche gibt die Trennung der beiden 17-Ketosteroide Dehydroepiandrosteron und Androsteron, die bei der Bestimmung der Harnmetaboliten von Bedeutung ist. GALLETTI²² berichtete 1965 über diese Trennung an ausgewählten, nicht aktivierten Aluminiumoxidchargen. Er wies übrigens darauf hin, dass man sich bei der Entscheidung für Kieselgel oder Aluminiumoxid als Sorptionsmittel allein von dem betr. analytischen Problem leiten lassen sollte. Wie man aus Fig. 4 ersieht, ist die Trennung bei einmaliger Entwicklung weder an Kieselgel noch an

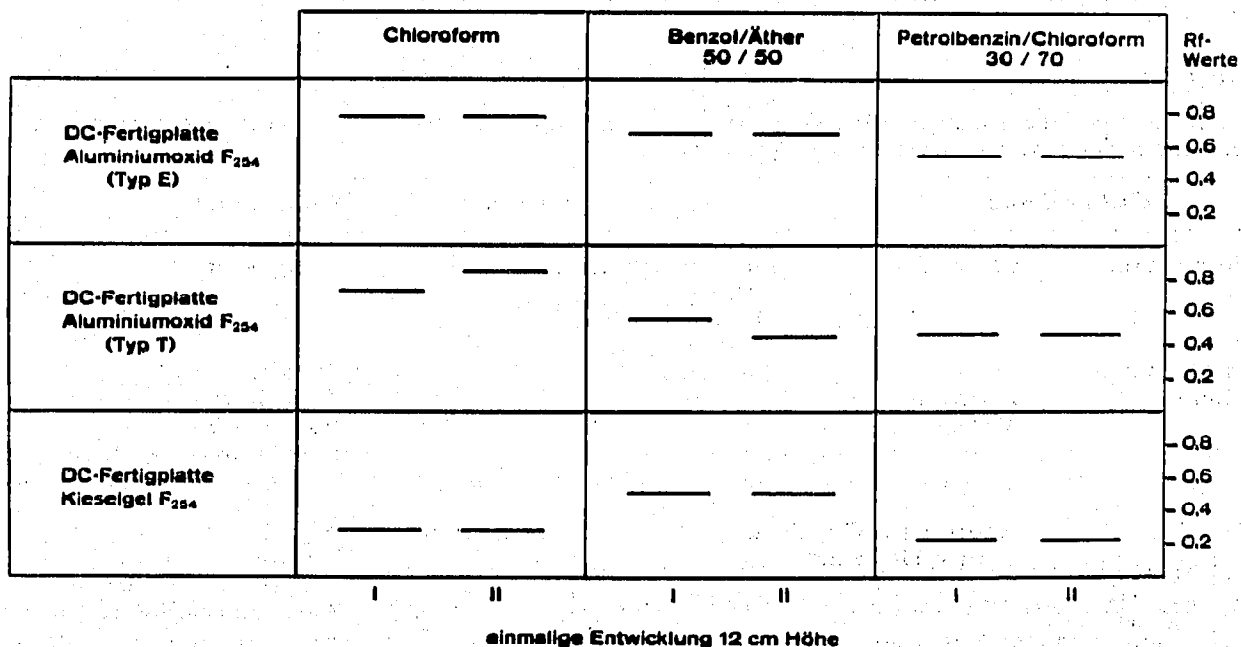


Fig. 4. Dünnschichtchromatographie von Dehydroepiandrosteron und Androsteron. I = Dehydroepiandrosteron; II = Androsteron.

TABELLE III

VERWENDETE FLIESSMITTEL ZUR DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON TESTOSTERON UND 17-*epi*-TESTOSTERON AN Al_2O_3 (TYP T)^a

	<i>Gut geeignet</i>	<i>Geeignet</i>	<i>Ungeeignet</i>
Reine Fließmittel	Chloroform Dichlormethan	Äther	Essigester
Benzol im Gemisch mit	Dioxan Äther	Tetrahydrofuran Essigester Aceton	Essigsäure <i>n</i> -Propanol Methanol
Aceton im Gemisch mit		Xylol Toluol Tetrachlorkohlenstoff	Hexan Heptan Schwefelkohlenstoff

^a In allen zur Trennung geeigneten Fließmitteln ist 17-*epi*-Testosteron stärker polar als Testosteron.

Aluminiumoxid des Typs E, der bisher üblichen Sorte mit grösserer spez. Oberfläche, zu erreichen. An Aluminiumoxid des Typs T mit geringerer spez. Oberfläche lassen sich dagegen die beiden in ihren Strukturen ähnlichen Steroide leicht trennen. Beachtenswert ist hierbei, dass bei Verwendung von Benzol-Äther (50:50) das Androsteron, bei Verwendung von Chloroform das Dehydro*epi*androsteron stärker adsorbiert wird.

Tabellen III und IV zeigen, dass bei Verwendung von Aluminiumoxid Typ T die Trennungen der beiden Steroidpaare von der Art des Fließmittels besonders beeinflusst werden. Dadurch wird bestätigt, worauf bereits PROCHAZKA²⁴ hinwies, dass bei der Chromatographie wenigstens drei Wechselwirkungen zu beachten sind, nämlich die zwischen der Substanz und dem Adsorbens, zwischen der Substanz und dem

TABELLE IV

VERWENDETE FLIESSMITTEL ZUR DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON DEHYDRO-*epi*ANDROSTERON UND ANDROSTERON AN Al_2O_3 (TYP T)

	<i>Gut geeignet</i>	<i>Geeignet</i>	<i>Ungeeignet</i>
Reine Fließmittel	Chloroform ^b	Diisopropyläther ^a Äther ^a Dichlormethan ^a	Essigester
Benzol im Gemisch mit Äther ^a	<i>n</i> -Propanol ^b Methanol ^b	Diisopropyläther ^a	Dioxan Tetrahydrofuran Essigester Essigsäure Aceton
	Aceton im Gemisch mit Heptan ^b	Hexan ^b	Xylol Toluol Schwefelkohlenstoff Tetrachlorkohlenstoff

^a In diesem Fließmittel ist Androsteron stärker polar als Dehydro*epi*androsteron.

^b In diesem Fließmittel ist Dehydro*epi*androsteron stärker polar als Androsteron.

Fließmittel und zwischen dem Adsorbens und dem Fließmittel. Für beide Trennbeispiele eignen sich mehrere reine Fließmittel und auch Fließmittelkombinationen, an reinen Fließmitteln vor allem Chloroform, Dichlormethan, Äther und Diisopropyläther, während Essigester ungeeignet ist. Bemerkenswert ist, dass bei der Trennung von Testosteron und 17-*epi*-Testosteron stets das 17-*epi*-Testosteron mit seiner α -ständigen sekundären Alkoholgruppe stärker adsorbiert wird, während bei der Trennung von Dehydro*epi*androsteron und Androsteron je nach Wahl des Fließmittels Unterschiede auftreten. Diese Erscheinung tritt sehr deutlich hervor zwischen Chloroform einerseits und Dichlormethan, Äther und Diisopropyläther andererseits. Eine Erklärung dafür ist sicherlich in den unterschiedlichen Protonendonator- und Protonenakzeptoreigenschaften der miteinander in Wechselwirkung stehenden Gruppen von Fließmittel und Substanz zu suchen, worauf PROCHAZKA²⁴ und BUSH²⁵ hingen.

Fig. 5 demonstriert die chromatographische Bewertung der bisher erwähnten sowie weiterer Aluminiumoxidtypen mit unterschiedlichen spez. Oberflächen. Man

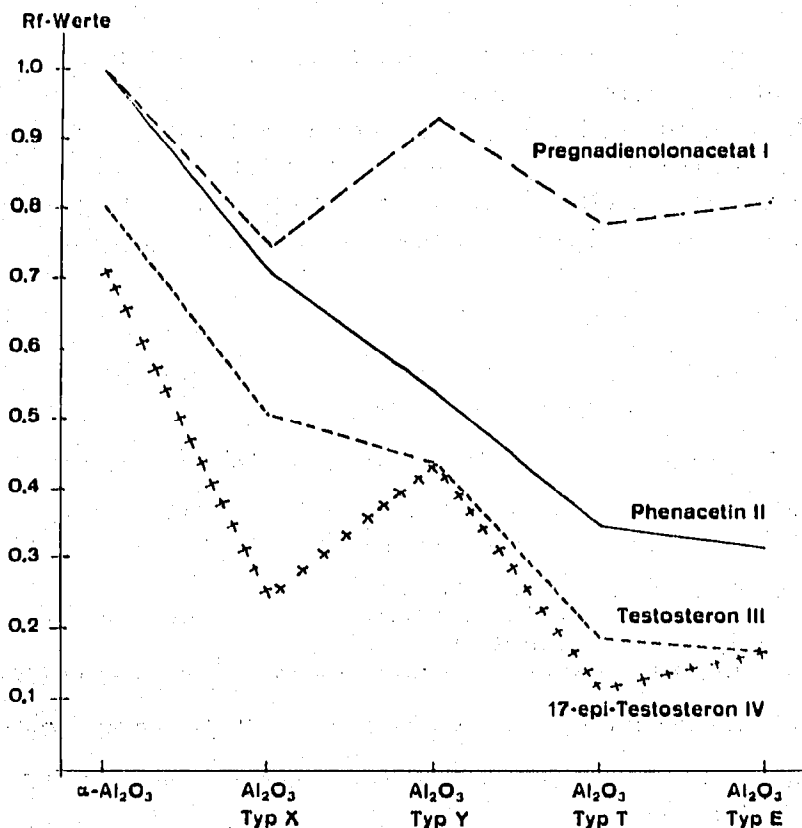


Fig. 5. Dünnschichtchromatographische Bewertung einiger Aluminiumoxid-Typen. Fließmittel für I und II: Chloroform; Fließmittel für III und IV: Benzol-Äther (50:50).

erkennt, dass die Trennung der beiden epimeren Testosterone nicht in jedem Falle an Aluminiumoxiden von geringer Oberfläche durchführbar ist und dass die Trennung anderer Substanzpaare sich gerade an Aluminiumoxiden mit höherer spec. Oberfläche als günstiger erweisen kann.

Aus den Versuchen ist zu entnehmen, dass es je nach Herstellungsverfahren

eine Reihe von Aluminiumoxiden unterschiedlicher Struktur und demnach unterschiedlichen chromatographischen Verhaltens von hoher bis zu geringer Aktivität gibt. Man sollte daher um eine Normung ausgewählter Aluminiumoxidtypen nach physikalischen und chromatographischen Eigenschaften bemüht sein. Die bisherige Standardisierung der Aluminiumoxide nach Brockmann-Stufen hat sich für die DC nicht bewährt und bezieht sich nur auf einen bestimmten Aluminiumoxidtyp mit grösserer spez. Oberfläche. Dagegen bieten Aluminiumoxide mit geringerer Oberfläche selbst über die chromatographischen Eigenschaften des Kieselgels hinaus neue spezielle Trennmöglichkeiten.

Herrn Dr. IRMSCHER danken wir für anregende Diskussion, Herrn Dipl.-Chem. ESSELBORN für physikalische Messungen und Herrn H. BAUSCH für chromatographische Mitarbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Glühen von Hydrargillit auf Temperaturen bis 1150° wird eine Reihe von Misch-Aluminiumoxiden hergestellt, deren Strukturen nach Debye-Scherrer-Aufnahmen und deren spez. Oberflächen nach der BET-Methode bestimmt werden. Es treten deutliche Unterschiede im chromatographischen Verhalten auf, die sich besonders bei isomeren Verbindungen zeigen. Die Verwendung eines neuen Aluminiumoxidtyps mit geringerer spez. Oberfläche wird für die Chromatographie empfohlen.

LITERATUR

- 1 H. BROCKMANN UND H. SCHODDER, *Ber.*, 74 (1941) 73
- 2 G. HESSE, I. DANIEL UND G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.*, 64 (1952) 103.
- 3 O. GLEMSEK UND G. RIECK, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 652.
- 4 J. H. DE BOER, J. M. H. FORTUIN, B. C. LIPPENS UND W. H. MEIJS, *J. Catalysis*, 2 (1963) 1.
- 5 E. STAHL, *Chemiker-Ztg.*, 85 (1961) 371.
- 6 G. HESSE, *Kursus über chromatographische Trennverfahren in Erlangen*, 4.-14. Oktober 1965.
- 7 H. RÖSSLER, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl., Springer, Berlin, 1967, S. 23-32.
- 8 H. BÖHME, H. J. BOHN UND J. ROEHR, *Arch. Pharm.*, 299 (1966) 282.
- 9 J. W. NEWSOME, H. W. HEISER, A. S. RUSSELL UND H. C. STUMPF, *Alumina Properties*, ALCOA Technical Paper No. 10, 2nd Revision, Pittsburgh, Pa., 1960.
- 10 H. GINSBERG, W. HÜTTIG UND G. STRUNK-LICHTENBERG, *Z. Anorg. Allgem. Chem.*, 293 (1957) 33.
- 11 J. H. DE BOER, J. J. STEGGERDA UND P. ZWIETERING, *Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc., Ser. B*, 59 (1956) 435.
- 12 J. H. DE BOER, J. J. STEGGERDA, J. M. H. FORTUIN UND P. ZWIETERING, *Proc. Intern. Congr. Surface Activity*, 2nd, London, 1957, 2 (1957) 93.
- 13 J. B. PERI, *J. Phys. Chem.*, 69 (1965) 211, 220, 231.
- 14 S. BRUNAUER, P. H. EMMETT UND E. TELLER, *J. Am. Chem. Soc.*, 60 (1938) 309.
- 15 K. IRMSCHER, Referat anlässlich, *Workshop Conference on Testosterone*, Tremsbüttel, 20. April 1967, veröffentlicht in J. TAMM, *Testosterone*, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1967, S. 16-19.
- 16 D. H. SANDBERG, N. AHMAD, W. W. CLEVELAND UND K. SAVARD, *Steroids*, 4 (1964) 557.
- 17 M. SPARANGANA, *Steroids*, 5 (1965) 773.
- 18 K. SCHUBERT, K. WEHRBERGER UND G. FRANKENBERG, *Naturwiss.*, 51 (1964) 638.
- 19 S. G. KORENMAN, H. WILSON UND M. B. LIPSETT, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1004.
- 20 N. Y. LIM UND J. F. DINGMAN, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25 (1965) 563.
- 21 J. TAMM, M. APOSTOLAKIS UND K. D. VOIGT, *Acta Endocrinol.*, 53 (1966) 61.
- 22 F. GALLETTI, *Transactions Meeting Intern. Study Group Steroid Hormones*, 2nd, Rome, December, 1965, Il Pensiero Scientifico, Rome, 1966, S. 189-222.

- 23 W. HÜBNER UND W. STAIB, *Klin. Wochschr.*, 45 (1967) 674.
- 24 Z. PROHAZKA, in K. MACEK UND I. M. HAJŠ (Herausgeber), *Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1965, S. 328-331.
- 25 I. E. BUSH, Diskussionsbeitrag, *Workshop Conference on Testosterone, Trensbüttel. 20. April 1967*, veröffentlicht in J. TAMM, *Testosterone*, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1967, S. 19.

J. Chromatog., 33 (1968) 70-79