

CHROM. 3588

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON TESTOSTERON UND Δ^4 -ANDROSTENDION(3,17) AUS TESTESGEWEBE VON RINDERFÖTEN

H. STRUCK, H. KARG UND H. JORK

Biochemische Abteilung an der II. Chirurgischen Universitätsklinik Köln**, Abteilung für Endokrinologie*** des Instituts für Tierphysiologie der Universität München† und Institut für Pharmakognosie und Analytische Phytochemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken†† (Deutschland-D.B.R.)*

(Eingegangen den 2. März 1968; modifiziert den 8. Mai 1968)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic determination of testosterone and Δ^4 -androstene-3,17-dione from bovine foetal testicular tissue

A procedure for the extraction of androgens from a few grams of bovine testes tissue is described. Δ^4 -Androstene-3,17-dione and testosterone were identified on the two-dimensional thin-layer chromatogram by means of their R_F -values, the KÖNIG-OERTEL-reaction, and their U.V.-spectra. Quantitative determination of these compounds was carried out directly on the thin-layer plate with the Zeiss chromatogram-spectrophotometer principally based on reflectance measurements.

With this method 0.2–0.5 μg of testosterone or Δ^4 -androstene,3,17-dione can be estimated with a standard deviation of $\pm 10\%$.

EINLEITUNG

In früheren Untersuchungen über Androgene in Hoden von Haus- und Wildtieren¹ wurde die 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie angewandt. Über entsprechende Untersuchungen an foetalen Rinderhoden, in denen wir Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) nachweisen konnten, wurde kurz berichtet^{2,3}. Nachstehend soll die verwendete Methodik und vor allem die direkte quantitative Bestimmung von Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) auf der Dünnschichtplatte mit Hilfe des Zeiss'schen Chromatogramm-Spektralphotometers wiedergegeben werden.

* Leiter :Priv.-Doz. Dr. H. STRUCK.

** Direktor: Prof. Dr. W. SCHINK.

*** Leiter: Prof. Dr. H. KARG.

† Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. BRÜGGEMANN.

†† Direktor: Prof. Dr. E. STAHL.

METHODIK

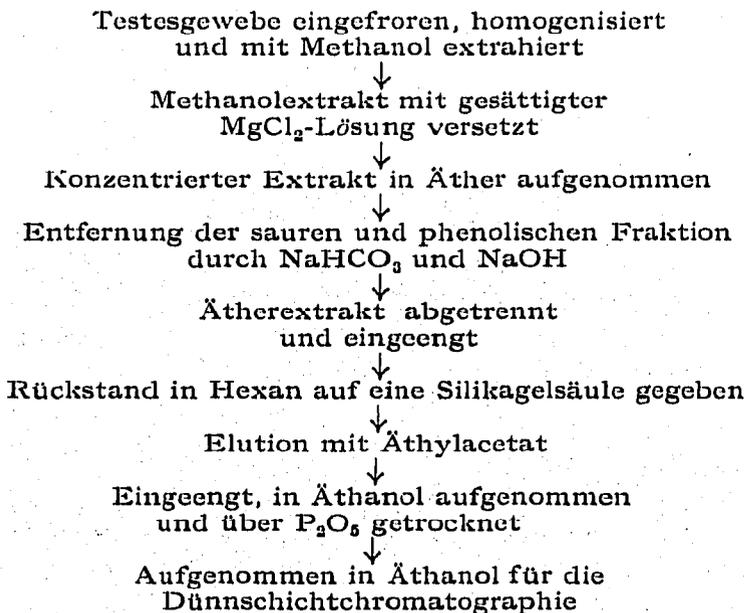
Aufarbeitungsgang

Da uns Fötenhoden nur beschränkt zur Verfügung standen, haben wir eine Aufarbeitungsmethode entwickelt, die es erlaubt, mit wenigen Gramm Ausgangsmaterial auszukommen. Die Hoden stammten von Schlachthofmaterial (bzw. bei den Geburtskälbern von Embryotomien), sie wurden bis zur Aufarbeitung eingefroren aufbewahrt. Es war bei den unteren Altersstufen erforderlich, Hoden von mehreren entsprechenden Föten zusammenzunehmen, um eine Ausgangsmenge von mindestens 4–7 g (nach Abpräparation von Fett und der äußeren Hodenhüllen) zu erhalten.

In Tabelle I wird der Aufarbeitungsgang schematisch dargestellt.

TABELLE I

TESTES-EXTRAKTION UND GEWINNUNG DER ANDROGENFRAKTION



Der so erhaltene Rückstand wird in insgesamt 16 ml absolutem Äthanol gelöst und durch ein Faltenfilter filtriert, dieses wird noch zweimal mit je 6 ml Äthanol gespült. Die vereinigten äthanolischen Lösungen werden im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird für die Dünnschichtchromatographie verwandt.

(*Hinweise*: Alle Arbeitsgänge sollen möglichst unter Licht- und Wärmeausschluß durchgeführt werden. Alle Schiffe sind nur mit Graphit abgedichtet.)

Verlustbestimmung mit markierten Verbindungen

Um die Aufbereitungsverluste zu ermitteln, wurden in Parallelversuchen $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Testosteron und $\text{-}\Delta^4\text{-Androstendion}(3,17)$ dem Ausgangsgewebe zugesetzt (zu 20 g Ausgangsgewebe jeweils $4.4\ \mu\text{C}$ Testosteron bei einer spez. Akt. von $29.2\ \text{mC/mMol}$ bzw. $4.2\ \mu\text{C}$ $\Delta^4\text{-Androstendion}(3,17)$ bei einer spez. Akt. von $34.8\ \text{mC/mMol}$). Der Extrakt für die Dünnschichtchromatographie wurde in abs. Äthanol aufgenommen

und auf 10 ml aufgefüllt. Das 2 g Ausgangsgewebe entsprechende Volumen wurde bis auf kleinstes Volumen eingeeengt und mit Hilfe der Agla-Spritze (Fa. Burroughs Wellcome & Co., London) aufgetragen. Der dem Testosteron bzw. Δ^4 -Androstendion-(3,17) entsprechende Fleck wurde sorgfältig abgekratzt und mit 2,5 ml abs. Äthanol über Nacht eluiert. Anschließend wurde abzentrifugiert und der Überstand in ein Packardröhrchen gegeben. Der Rückstand wurde noch zweimal mit abs. Äthanol gewaschen. Der Überstand und die Waschlösungen wurden vereinigt, auf 10 ml aufgefüllt und mit 10 ml Szintillatorlösung⁴ versetzt. Die Messung der vorgekühlten Proben erfolgte im Szintillationsspektrometer (Fa. Packard).

TABELLE II

BEISPIELE FÜR WIEDERFINDUNG IN % NACH DER GEWEBEAUFARBEITUNG

Verbindung	Hodengewebe von		
	Föten (6 Monate)	Geburtskalb	Kalb (6 Wochen)
Δ^4 -Androstendion (3,17)	83.1	78.2	82.0
Testosteron	90.1	80.6	86.0

In weiteren Versuchen wurde der Verlust, der lediglich durch das Abkratzen von der Platte und die nachfolgende Extraktion entstand, bestimmt. Zu diesem Zweck wurden ¹⁴C-Testosteron und ¹⁴C- Δ^4 -Androstendion(3,17) unmittelbar auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, verfahren; in diesem Fall verwendeten wir die Szintillatorlösung nach BRAY⁵. Hierbei ergaben sich die folgenden Ausbeuten:

TABELLE III

WIEDERFINDUNG IN % VON TESTOSTERON UND Δ^4 -ANDROSTENDION(3,17) NACH ABKRATZEN UND ELUIEREN

	2 μ g	Mittelwert	4 μ g	Mittelwert
Δ^4 -Androstendion (3,17)	91.2 94.8 89.6	91.9	88.9 90.2 81.8	87.0
Testosteron	90.6 95.4 90.1	92.0	89.0 88.9 83.3	87.1

Es zeigte sich also, daß der überwiegende Teil der Aufarbeitungsverluste erst mit dem Abkratzen auftrat. Da die Hormonbestimmung direkt auf der Platte durchgeführt wurde, waren diese Verluste im Rahmen der Gesamt-Aufarbeitungsverluste nicht zu berücksichtigen. Wir konnten somit für unsere Aufarbeitungsmethode eine Wiederfindungsrate von 90–95% annehmen.

Dünnschichtchromatographie und Nachweismethoden

Für die Dünnschichtchromatographie benutzten wir ein 2-dimensionales Verfahren, das wir im wesentlichen schon früher beschrieben haben⁶. Als Trägermaterial

diente neuerdings Kieselgel GF (Fa. Merck, Darmstadt), als Laufmittel wurden verwendet:

- (1) Chloroform–Aceton (98:2), Laufzeit: 30 Min;
- (2) Chloroform–Aceton (80:20), Laufzeit: 35 Min.

Für die Direktmessung wird nicht mit Phosphorsäure besprüht. Im U.V.-Licht sind Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) bis zu $1 \mu\text{g}$ durch ihre Absorption gut erkennbar.

In Fig. 1 ist ein typisches Chromatogramm eines Fötenhoden-Extraktes dargestellt.

Zur Identifizierung von Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) benutzen wir:

- (1) die R_F -Werte
- (2) die König–Oertel-Reaktion und
- (3) das U.V.-Spektrum.

Die R_F -Werte unter den angegebenen Bedingungen sind in Tabelle IV angegeben.

Die von OERTEL⁷ verbesserte KÖNIG-Reaktion, die als spezifische Farbreaktion für Testosteron gilt, wurde für die Chromatographie wie folgt ausgeführt:

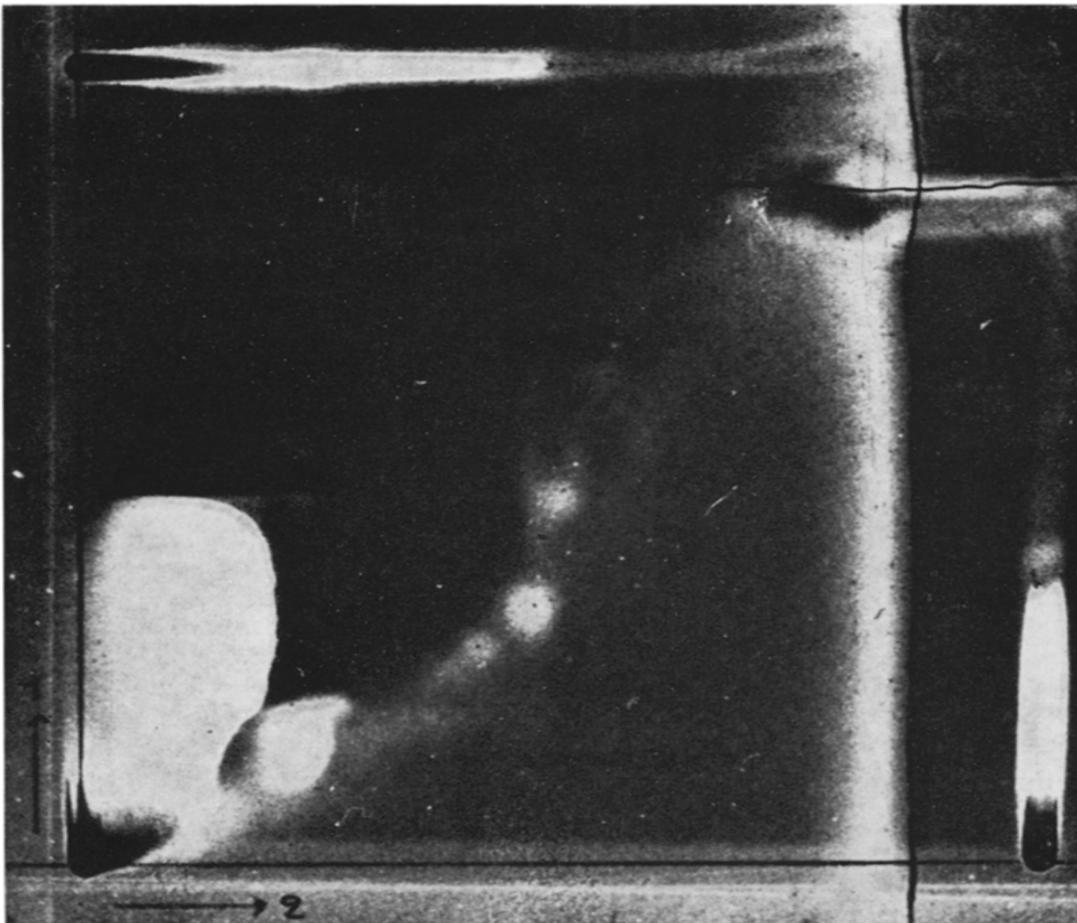


Fig. 1. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie eines Fötenhoden-Extraktes. Aufnahme im U.V.-Licht nach Besprühen mit Phosphorsäure.

TABELLE IV

 R_F -WERTE VON Δ^4 -ANDROSTENDION(3,17) UND TESTOSTERON

	Laufmittel	
	I	II
Δ^4 -Androstendion(3,17)	0.45	0.65
Testosteron	0.22	0.42

Die Platte wird mit einem Schwefelsäure-Äthanol Gemisch (1 Vol. abs. Äthanol, 3 Vol. konz. H_2SO_4) besprüht und anschließend für 20 Min bei 100° getrocknet. Nach dem Abkühlen wird die Platte mit einem Gemisch aus K-Sulfogujacolsäure und Cu-Sulfat (5 Vol. K-Sulfogujacolsäure 10% in aqua dest.) und 1 Vol. Cu-Sulfat (1% in aqua dest.) besprüht. Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) färben sich blaugrün an.

Als weiteres Charakteristikum wurde das U.V.-Spektrum von Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) direkt auf der Platte aufgenommen. Diese Identifizierungsmethode wird unten bei der Beschreibung der quantitativen Bestimmungsmethode näher erläutert. In den Chromatogrammen der Hodenextrakte wiesen die beiden nach den R_F -Werten und der KÖNIG-OERTEL-Reaktion dem Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) entsprechenden Flecken in den U.V.-Spektren übereinstimmende Werte wie die Standardsubstanzen dieser beiden Steroide auf.

Apparatur zur quantitativen Bestimmung

Die quantitative Auswertung der Fötenhodenextrakte wurde direkt auf der DC-Platte mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer zur Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen nach STAHL* durchgeführt (Fig. 2). Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) lassen sich hiermit ohne Anfärben im ultravioletten Spektralbereich bei der Wellenlänge ihrer größten Absorption (Fig. 3a und 3b) in Remission messen. Als Grundgerät dient das einstrahlige Spektralphotometer PMQ II der Fa.

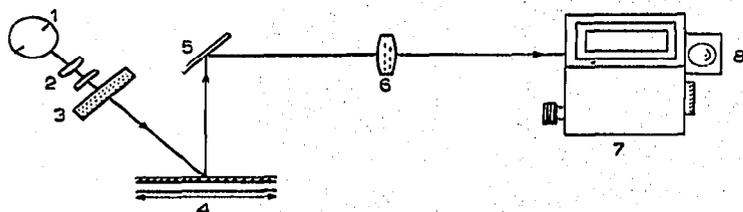


Fig. 2. Strahlengang des Chromatogramm-Spektralphotometers in Anordnung Pr-M zur Auswertung fluoreszierender Chromatogramme. 1 = Wasserstofflampe; 2 = Sammellinsensystem I; 3 = Filter gegen Streulicht; 4 = DC-Platte auf Koordinatentisch; 5 = Umlenkspiegel; 6 = Sammellinsensystem II; 7 = Monochromator M IV Q; 8 = Photomultiplier 1P28.

schicht-Chromatogrammen nach STAHL* durchgeführt (Fig. 2). Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) lassen sich hiermit ohne Anfärben im ultravioletten Spektralbereich bei der Wellenlänge ihrer größten Absorption (Fig. 3a und 3b) in Remission messen. Als Grundgerät dient das einstrahlige Spektralphotometer PMQ II der Fa.

* Das Gerät wird von der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, hergestellt. Herrn Prof. Dr. E. STAHL (Saarbrücken) sowie den Herren Dr. H. J. HÖFERT und Dr. W. TAUSCH (C. Zeiss, Oberkochen) gilt unser Dank für die Erlaubnis, die vorliegenden quantitativen Untersuchungen mit dem Prototyp des Gerätes am Institut für Pharmakognosie und Analytische Phytochemie in Saarbrücken durchführen zu dürfen.

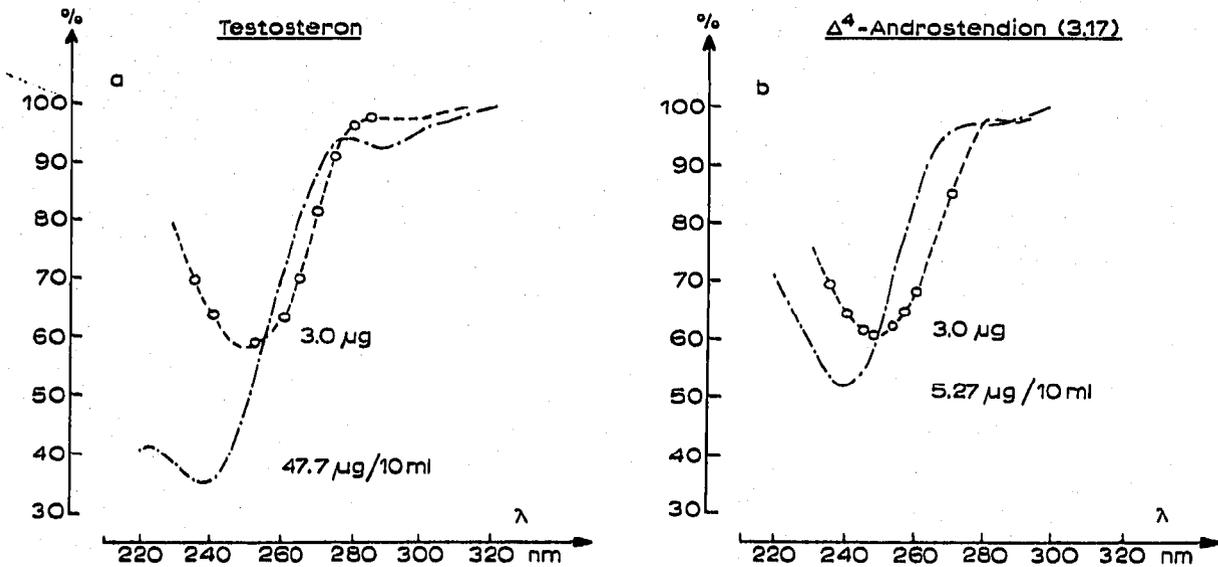


Fig. 3. Absorptions- bzw. Remissionspektrum von (a) Testosteron und (b) Δ^4 -Androstendion-(3,17). (○—○) Absorptionsspektrum; (---) Remissionspektrum.

Carl Zeiss (Oberkochen). Zu diesem Photometer wurde nun ein Remissionsansatz mit horizontal stehendem Koordinatentisch konstruiert, mit dem man Dünnschicht-Chromatogramme im Standardformat sowohl in Remission als auch in Transmission direkt auswerten kann (Beschreibung des Prototyps siehe Lit. 8). Als Meßöffnung kann wahlweise ein Spalt oder eine mit Hilfe einer Irisblende begrenzte Kreisfläche gewählt werden. Da Durchlichtmessungen mit gewissen Einschränkungen nur in sichtbarem Spektralbereich vorgenommen werden können, wurde in Remission gearbeitet. Fig. 4 zeigt das neue, im Handel befindliche Gerät in der Anordnung: Monochromator-Probe. Diese Meßanordnung wird immer dann gewählt, wenn außer der remittierenden Strahlung keine weitere Energie auf den Photomultiplier fallen kann. Regt die in das

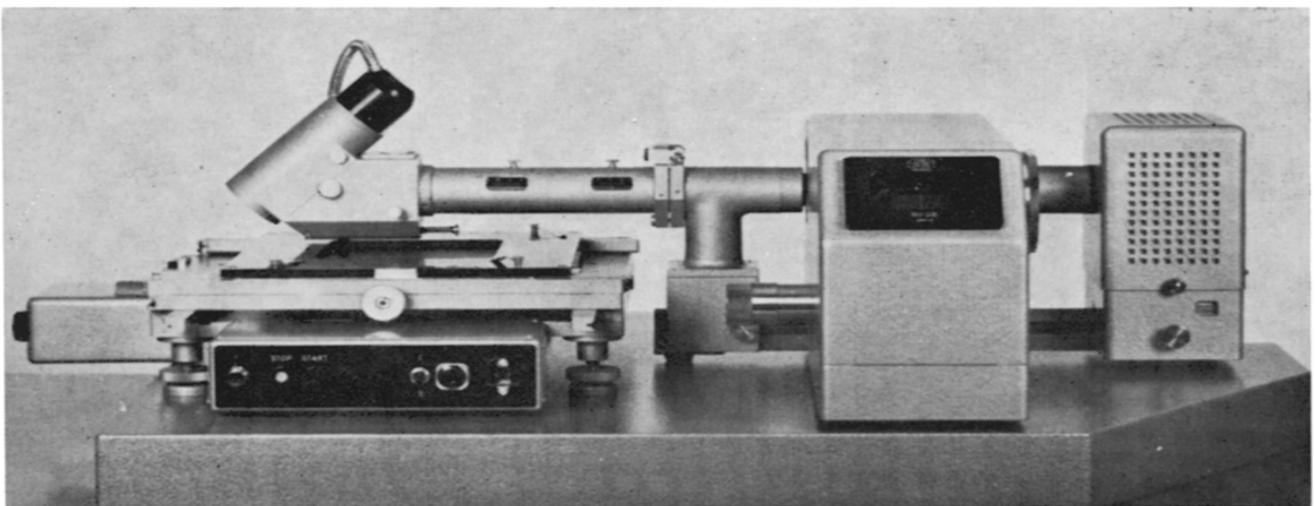


Fig. 4. Chromatogramm-Spektralphotometer zur quantitativen Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen nach STAHL. Die Aufstellung des Prototypes entspricht der Messanordnung M.-Pr. Einzelheiten siehe Text (Werkphoto C. Zeiss).

Chromatogramm eintretende Energie jedoch die Substanz selber oder den Platten- grund (Verwendung von fluoreszierenden Sorbentien) zur Fluoreszenz oder Phos- phoreszenz an, so sollte die Chromatogramm-Auswertung durch Umkehr des Strahlen- ganges erfolgen (Meßanordnung: Leuchte \rightarrow Probe \rightarrow Monochromator) (Fig. 2), Meßgeometrie $45^\circ/0^\circ$. Der Monochromator dient als selektives Filter, sodaß nur Energie der gewünschten, vorgewählten Wellenlänge auf den Empfänger fallen kann und zur Anzeige gelangt.

Absorptions- und Zersetzungskurven

Zur Aufstellung der Eichkurven von Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) wurde die Wellenlänge der maximalen Absorption der Hormone auf der DC-Platte gewählt, die sich aus den Remissionsspektren der beiden Verbindungen ergibt. Auf- genommen wurden diese auf fließmittelfreien Kieselgel HF₂₅₄-Schichten. Gegenüber den Absorptionsspektren in Lösung tritt eine bathochrome Verschiebung der Wellen- längenmaxima ein, die auf Mediumeffekten beruht. Verbindungen mit Carbonyl- gruppen zeigen die stärkste Verschiebung ($\Delta\lambda = 5-8$ Nanometer, siehe Lit. 9). Ein Vergleich der Spektren wird in Fig. 3a und 3b durchgeführt. Bei diesen Messungen werden nun die auf dem Sorbens fein verteilten Hormone nicht nur dem Einfluß des Luftsauerstoffes ausgesetzt, sondern zusätzlich mit energiereichem kurzwelligem Licht bestrahlt. Es muß also eventuell mit einer chemischen Veränderung der Meßsubstanz gerechnet werden. Um dies zu prüfen, wurden $4.11 \mu\text{g}$ Testosteron bzw. $3.35 \mu\text{g}$ Δ^4 - Androstendion(3,17) der vollen Strahlungsenergie der H₃₀-Lampe ausgesetzt (Meß- anordnung: Probe-Monochromator). Als Wellenlänge wurde diejenige der stärksten Absorption gewählt ($\lambda_{\text{max}} = 249 \text{ nm}$). Eine graphische Darstellung der Absorptions- abnahme in Abhängigkeit von der Zeit zeigen die Fig. 5a und 5b. Danach beginnt die Substanzveränderung erst nach 2-3 Min evident zu werden. Der Testosteronwert geht in 26 Min auf die Hälfte zurück. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Δ^4 -Androsten- dion(3,17). Da die Auswertung einer Substanzzone bei der quantitativen Bestimmung

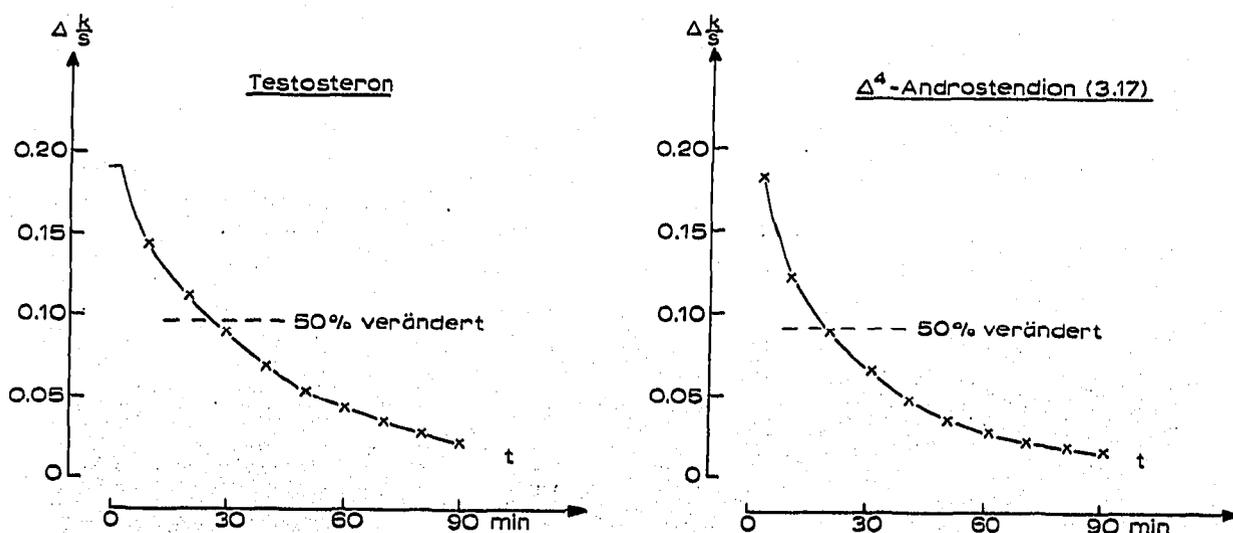


Fig. 5. Änderung der Absorption im Messfleck in Abhängigkeit von der Zeit beim Bestrahlen mit der Wasserstofflampe H₃₀. Zersetzungskurve von (a) Testosteron und (b) Δ^4 -Androstendion-(3,17).

maximal 45 sec beträgt, hat die Hormonveränderung in diesem Fall keinen Einfluß auf den Meßwert.

Zum Aufstellen der Eichgeraden wurden steigende und bekannte Mengen Testosteron und Δ^4 -Androstendion(3,17) jeweils auf 3 DC-Platten mit einer Agla-Spritze aufgetragen und mit den zwei angegebenen Fließmitteln (siehe Seite 77) in zweidimensionaler Arbeitsweise entwickelt. Die Laufstrecke betrug in beiden Richtungen 13 cm. Gearbeitet wurde bei Kammersättigung und einer Temperatur von $20^\circ \pm 0.5^\circ$ in der thermostatisierten Trogkammer "Kryobox"¹⁰. Die fließmittelfreien DC-Platten wurden dann photometrisch ausgewertet (Fig. 6). Aufgetragen sind die

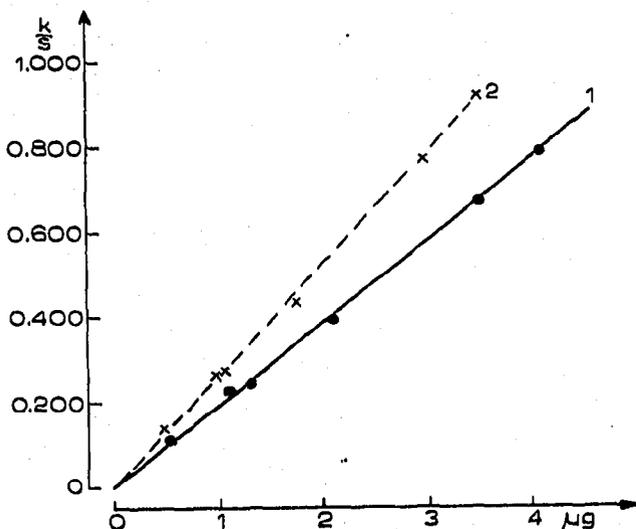


Fig. 6. Eichgeraden des Testosterons (1) und Androstendions (2) bei der Verwendung der Kubelka-Munk-Funktion.

gemessenen k/s -Werte aus der Kubelka-Munk-Funktion* in Abhängigkeit von der Substanzmenge. Für diese Funktion benötigt man die absolute Remission der Sorptionsschicht. Sie läßt sich über den gerätemäßig eingebauten Hilfsstandard ermitteln.

Beurteilung der Meßwerte

Die gereinigten und zur Trockne eingeeengten Extrakte werden für die quantitative Bestimmung in 1 ml abs. Äthanol gelöst. Man trägt aliquote Mengen auf die zuvor markierten Startpunkte auf. Hierbei lassen sich Volumen- und Dosierfehler nicht vermeiden. Sie betragen insgesamt $\pm 1\%$, wenn zum Auftragen eine nachgeeichte Agla-Spritze (Reproduzierbarkeit = Richtigkeit: 0.75%) verwandt wird¹¹. Temperaturfehler sind vernachlässigbar klein, sofern die Differenz zwischen der Eich- und Arbeitstemperatur nicht mehr als $\pm 3^\circ$ beträgt¹². Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse gilt die relative Standardabweichung s . Sie beträgt im vorliegenden Fall für die direkte Auswertung bei Testosteron $\pm 11.4\%$ und bei

$$* \frac{k}{s} = \frac{(1 - R_{abs})^2}{2 R_{abs}}$$

k = Produkt aus dem molaren Extinktionskoeffizienten und der Auftragsmenge.

s = Streukoeffizient.

R_{abs} = Absolute Remission der Chromatogrammzonen.

Δ^4 -Androstendion(3,17) $\pm 10.6\%$. Diese "Fehler" sind bei der angewandten zweidimensionalen Technik vor allem auf chromatographische Einflußfaktoren zurückzuführen. Unterschiedliche Schichtdicken der verwendeten DC-Platten machen sich bemerkbar, wenn die Werte der Eichgeraden mit denen der Extrakte nicht auf einem Chromatogramm ermittelt werden.

Außerdem liegen verschiedene Substanzverteilungen in den jeweiligen Meßflecken der einzelnen DC-Platten vor. Die Ungenauigkeit der eigentlichen photometrischen Messung fällt dagegen nicht ins Gewicht (etwa $\pm 1\%$).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengestellt. Auf ihre physiologische Bedeutung wurde in anderem Zusammenhang schon eingegangen⁸. Sie soll hier nicht mehr weiter diskutiert werden. Wir wollen uns im wesentlichen auf das verwendete Verfahren beschränken.

TABELLE V

TESTOSTERON- UND Δ^4 -ANDROSTENDION(3,17)KONZENTRATION IN FÖTENHODEN

Probe	Scheitel- Steisslänge (cm)	Alter (Monate)	Testosteron ($\mu\text{g}/10\text{ g}$ Frischgewebe)	Δ^4 -Androsten- dion(3,17) ($\mu\text{g}/10\text{ g}$ Frischgewebe)	Quotient Testosteron : Δ^4 -Androstendion- (3,17)
Föten	<26	3	12.2	0	—
Föten	26-36	4	15.7	1.1	14.3
Föten	37-47	5	15.8	2.4	6.6
Föten	48-59	6	25.0	5.5	4.5
Föten	60-73	7	7.1	1.9	3.7
Geburtskälber	—	0	1.4	0.5	2.8
Kalb	—	2	11.3	9.5	1.2

Die sehr zahlreichen Methoden vor allem zur Bestimmung des Testosteron werden fast alle auf Harn¹⁸⁻²¹ oder Plasma^{6,22-24} angewandt. Nur vereinzelt ist bisher über die quantitative Bestimmung von Testosteron oder Δ^4 -Androstendion(3,17) im Gewebe berichtet worden²⁵⁻²⁸. Aber auch in diesen Fällen stand eine verhältnismäßig große Ausgangsmenge zur Verfügung²⁶. Nach unserem Verfahren genügen aber 5-10 g Gewebe (Frischgewicht). Die KÖNIG-OERTEL-Reaktion zum Nachweis von Testosteron fällt auch mit Δ^4 -Androstendion(3,17) positiv aus. *epi*-Testosteron wird chromatographisch von Testosteron abgetrennt und somit nicht mitbestimmt. Bei der absoluten Bestimmung von 0.2-0.5 μg Testosteron oder Δ^4 -Androstendion(3,17) erreichen wir eine Genauigkeit von ca. 10%. Gegenüber gaschromatographischen oder Isotopenverdünnungs-Methoden ist der apparative Aufwand verhältnismäßig gering. Im Vergleich zu den Elutionsmethoden ist das Verfahren deutlich empfindlicher, wie die Verluste nach dem Abkratzen von der DC-Platte gezeigt haben. Das Verfahren der direkten quantitativen Bestimmung auf der DC-Platte mit Hilfe des Chromatogramm-Spektralphotometers ist auch auf andere Substanzklassen d.h. ganz allgemein anwendbar wie frühere Untersuchungen aus dem Arbeitskreis von STAHL^{8,9} gezeigt haben.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Verfahren der Extraktion von Androgenen aus wenigen Gramm Hodengewebe beschrieben. Δ^4 -Androstendion(3,17) und Testosteron wurden auf dem 2-dimensionalen Dünnschichtchromatogramm anhand der R_F -Werte, der KÖNIG-OERTEL-Reaktion und des U.V.-Spektrums identifiziert. Die quantitative Bestimmung dieser Verbindungen erfolgte in Remission mit dem Spektralphotometer direkt auf der Dünnschichtplatte.

Mit der Methode lassen sich 0.2–0.5 μg Testosteron oder Δ^4 -Androstendion(3,17) mit einem Fehler von ca. $\pm 10\%$ bestimmen.

DANK

Diese Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt, wofür auch hier bestens gedankt sei.

Fräulein LANGEN, Frau SCHAMS und Fräulein HÖGL danken wir für die hervorragende technische Assistenz.

LITERATUR

- 1 J. BRÜGGEMANN, H. KARG UND H. STRUCK, *Ber. 5. Intern. Kongr. für tier. Fortpfl. u. künstl. Besamung, Trient*, 3 (1964) 387.
- 2 H. KARG UND H. STRUCK, *Excerpta Med. Found., Intern. Congr. Ser., No. III* (1966) 288.
- 3 H. STRUCK UND H. KARG, *Ber. 13. Symp. der Deut. Ges. für Endokrinologie, Würzburg*, 1967, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- 4 F. KALBERER UND J. RUTSCHMANN, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 1956.
- 5 G. A. BRAY, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 279.
- 6 W. SCHINK UND H. STRUCK, *Med. Welt*, (1964) 1525.
- 7 G. W. OERTEL, *Acta Endocrinol.*, 37 (1961) 237.
- 8 H. JORK, *III. Intern. Symp. für Chromatographie, Brüssel*, 1964, S. 295.
- 9 H. JORK, *IV. Intern. Symp. für Chromatographie, Brüssel*, 1966.
- 10 E. STAHL, *Chem. Ingr.-Tech.*, 36 (1964) 941.
- 11 E. STAHL UND H. JORK, Unveröffentlichte Ergebnisse.
- 12 K. DOERFFEL, *Beurteilung von Analyseverfahren und -ergebnissen*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962.
- 13 K. D. VOIGT, U. VOLKWEIN UND J. TAMM, *Klin. Wochschr.*, 42 (1964) 642.
- 14 ST. G. KORENMAN, TH. E. DAVIS, H. WILSON UND M. B. LIPSETT, *Steroids*, 3 (1964) 2.
- 15 R. P. ZURBRÜGG, R. D. B. JACOBS UND L. I. GARDNER, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25 (1965) 315.
- 16 Z. SZEREDAY UND L. SACHS, *Experientia*, 21 (1965) 166.
- 17 L. SACHS UND Z. SZEREDAY, *Endokrinologie*, 47 (1965) 277.
- 18 A. ISMAIL UND R. A. HARKNESS, *Acta Endocrinol. Suppl.*, 100 (1965) 47.
- 19 H. HORN, M. STATTER UND M. FINKELSTEIN, *Steroids*, 7 (1966) 118.
- 20 P. VESTERGAARD, E. RAABO UND S. VEDSØ, *Clin. Chim. Acta*, 14 (1966) 540.
- 21 W. HÜBNER UND W. STAIB, *Klin. Wochschr.*, 45 (1967) 674.
- 22 A. C. BROWNIE, H. J. VAN DER MOLEN, E. E. NISHIZAWA UND K. B. EIK-NES, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 24 (1964) 1091.
- 23 F. DRAY, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 2145.
- 24 C. W. BARDIN UND M. B. LIPSETT, *Steroids*, 9 (1967) 71.
- 25 H. R. LINDNER, *Nature*, 183 (1959) 1605.
- 26 R. NEHER UND A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 43 (1960) 1628.
- 27 H. L. LINDNER UND T. MANN, *J. Endocrinol.*, 21 (1960) 341.
- 28 J. W. GOLDZIEHER, R. A. BAKER UND E. C. RIHA, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21 (1961) 62.