

	Leerwert	Probe
0 Min. LDH/PK	0,916	0,940
10 Min.	0,887	0,874
15 Min. GK	0,885	0,872
25 Min.	0,879	0,759
30 Min.	0,877	0,757
$\Delta E_{\text{Glycerin}}$	0,008	0,115
$\Delta E_{\text{korrig.}}$		0,107

$$\frac{\Delta E \cdot 850 \cdot 2,13 \cdot 2,2 \cdot 100}{3,3 \cdot 0,5 \cdot 0,2 \cdot 1000} = \Delta E \cdot 1207 = 0,107 \cdot 1207 = 129 \text{ mg/100 ml}$$

## Literatur

1. WIELAND, O., Biochem. Z. 329, 313 (1957). — 2. KREUTZ, F., Klin. Wschr. 40, 362 (1962). — 3. EGGSTEIN, M. und F. KREUTZ, Klin. Wschr. 44, 262 (1966). — 4. SPERRY, W. M., Lipid Analysis, in: Methods of biochem. Analysis 2, 83, Interscience Publ., New York-London (1955). — FOLCH, J., J. biol. Chemistry 226, 497 (1957); siehe hierzu auch ZÖLLNER, N. und D. EBERHAGEN, Untersuchung und Bestimmung der Lipide im Blut, S. 36, Springer Berlin (1965). — 5. SCHMIDT, F. H. und K. v. DAHL, Klin. Wschr. im Druck. — 6. SCHMIDT, F. H., K. v. DAHL, W. SCHNELL und F. WILLIG, in Vorbereitung.

Dr. Felix H. Schmidt  
68 Mannheim-Waldhof  
Sandhofer Str. 112—132

## Eine fluorometrische Methode zur Testosteron-Bestimmung im Harn

Von V. GRAEF, P. JOBST<sup>1)</sup> und HJ. STAUDINGER

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger)

(Eingegangen am 31. Januar 1968)

Es wird eine neue Methode zur Bestimmung von Testosteron im Menschen-Harn beschrieben. Nach enzymatischer Hydrolyse und Solvolyse wird der Harnextrakt an einer Säule aus Aluminiumoxid gereinigt. Testosteron wird von Epitestosteron und anderen  $\Delta^4$ -3-Ketosteroiden durch Dünnschichtchromatographie getrennt. Es wird durch die empfindliche Fluoreszenz-Reaktion auf Lithiumhydroxid quantitativ bestimmt. Die Methode ist schnell auszuführen und erfordert kleine Harnmengen (4 ml für Männer und 10 ml für Frauen).

A new method is reported for the determination of testosterone in human urine. After enzymatic hydrolysis and solvolysis the urine extract is purified on a column of alumina. Testosterone is separated from epitestosterone and other  $\Delta^4$ -3-ketosteroids by thin-layer chromatography. It is measured by the sensitive fluorescence reaction on lithium hydroxide. The method is rapid and requires small urine samples (4 ml for men and 10 ml for women).

Seitdem SCHUBERT (1) 1960 erstmalig Testosteron aus menschlichem Harn isoliert und bestimmt hat, sind auch Methoden zur Bestimmung von Testosteron im Harn veröffentlicht worden. Da die Testosteron-Ausscheidung mit der Testosteron-Produktion korreliert, ist es sinnvoll, Testosteron im Harn zu bestimmen (2). Trotz Anwendung der verschiedensten Reinigungsverfahren gelang es nur wenigen Autoren (3—13), Testosteron von seinem  $17\alpha$ -Epimeren, Epitestosteron, sauber zu trennen. Aus den Untersuchungen von DE NICOLA (7), SCHUBERT (14) und KORENMAN (15) geht hervor, daß die ausgeschiedenen Mengen von Testosteron und Epitestosteron in etwa derselben Größenordnung liegen. Da aber Epitestosteron, verglichen mit Testosteron, nur eine ganz geringe androgene Aktivität besitzt, ist für eine genaue Bestimmung des Testosterons die Trennung der beiden Epimeren notwendig. Für die Endbestimmung bedienen sich einige Autoren der Gaschromatographie, andere benutzen isotope markiertes Testosteron. Diese Methoden erfordern also besondere Apparate, die nicht überall verfügbar sind. Andere Methoden, bei denen das Testosteron bzw. sein Oxydationsprodukt colorimetrisch oder fluorometrisch bestimmt wird, sind oft nicht sehr empfindlich und erfordern daher den Einsatz größerer Harnmengen. Die notwendigen Reinigungsverfahren sind meist sehr langwierig.

Nach der von uns beschriebenen Methode läßt sich Testosteron von Epitestosteron durch Dünnschichtchromatographie trennen. Bei einer längeren Laufzeit des Dünnschichtchromatogramms kann man auch Epitestosteron von anderen störenden Steroiden trennen und für sich bestimmen. Zur quantitativen Bestimmung benutzen wir die Fluoreszenzmessung auf Lithiumhydroxid-Preßlingen (16).  $\Delta^4$ -3-Ketosteroiden geben auf der Oberfläche eines Lithiumhydroxid-Preßlings eine spezifische und sehr empfindliche Fluoreszenz (17). Diese Reaktion haben wir bereits zur Bestimmung des Aldosterons im Harn verwendet (18).

### Methodik

#### Reagenzien

Methanol p. a. (Fa. Riedel-de Haën) wird über eine Füllkörperkolonne destilliert.

Äthylacetat für Chromatographie (Fa. Riedel-de Haën), Chloroform p. a. (Fa. E. Merck, Darmstadt)

$\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Fa. C. F. Boehringer, Mannheim)

Aluminiumoxid: neutral, Akt. II (Fa. Gebr. Giulini, Ludwigshafen)

Aluminiumoxid GF<sub>254</sub> für die Dünnschichtchromatographie (Fa. E. Merck, Darmstadt)

Testosteron (Fa. E. Merck, Darmstadt)

Methylenchlorid: 2 l Methylenchlorid werden mit 200 ml 0,1proz. Kaliumpermanganat-Lösung, mit 200 ml N NaOH und dreimal mit je 400 ml Wasser ausgeschüttelt. Nach 24stdg. Trocknen über wasserfreiem Calciumchlorid wird das Lösungsmittel destilliert.

<sup>1)</sup> Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung.

Acetatpuffer pH 5,2: 32,4 g wasserfreies Natriumacetat und 7,15 ml Eisessig werden mit dest. Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

Benzol p. a. (Fa. E. Merck, Darmstadt)

Lithiumhydroxid: etwa 98% LiOH (Fa. E. Merck, Darmstadt)

Hydrolyse (nach BAULIEU und JAYLE (19)):

4 ml Männerharn oder 10 ml Frauenharn werden mit dest. Wasser auf 20 ml verdünnt. Es wird mit Eisessig auf pH 5,2 angesäuert, mit 50 µl Glucuronidase/Arylsulfatase und 1 ml Acetatpuffer pH 5,2 versetzt und 24 Stdn. bei 37° inkubiert. Zur Hydrolyse etwa noch vorhandenen Testosteron-Sulfats schließt sich die Solvolyse an. Dazu säuert man den Harn mit 50proz. Schwefelsäure auf pH 1 an, löst darin 4 g Natriumchlorid und extrahiert dreimal mit je 50 ml Äthylacetat. Die vereinigten Extrakte läßt man 24 Stdn. bei 37° stehen und schüttelt sie nach dem Abkühlen zweimal mit je 20 ml N NaOH und zweimal mit je 20 ml dest. Wasser aus. Nach Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat dampft man die Lösung im Vakuum ein.

Der Verdampfungsrückstand wird mit zweimal 2 ml Chloroform auf eine Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Akt. II) (1 × 5 cm) gebracht und mit 18 ml Chloroform nachgespült. Das Eluat dampft man im Vakuum ein. Der Rückstand wird quantitativ mit Methanol in ein spitzen Zentrifugenröhrchen überführt, das Lösungsmittel wird im Vakuum verdampft.

#### Dünnschichtchromatographie

Glasplatten (20 × 20 cm), die mit einer 0,25 mm dicken Schicht Aluminiumoxid GF<sub>254</sub> versehen sind, werden 3 Stdn. bei 120° aktiviert. Dann schaltet man den Trockenschrank ab und läßt die Platten darin erkalten. Sie werden in einem Exsikkator ohne Trockenmittel aufbewahrt. Der Verdampfungsrückstand des Harnextraktes aus den spitzen Zentrifugenröhrchen wird mit 2mal 100 µl Aceton punktförmig 1,2 cm vom unteren Rand auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Am linken und am rechten Rand der Platte trägt man, ebenfalls 1,2 cm vom unteren Rand entfernt, 2 µg Testosteron in 25 µl Aceton auf. Die Dünnschichtplatte wird im System Benzol/Methylenchlorid/Äthylacetat (3:1:1 V/V) nach dem Durchlaufverfahren (20) 3 Stdn. entwickelt. Die Testosteron-Flecken an den Rändern der Platte sind unter der UV-Lampe sichtbar. Mit ihrer Hilfe wird die das Testosteron enthaltende Zone des Harnextraktes markiert und ausgekratzt. Das Aluminiumoxid überführt man in ein Zentrifugenröhrchen mit Schliff. Außerdem wird ein gleichgroßer Fleck in Höhe des Testosterons von einer Stelle der Platte ausgekratzt, wo kein Harnextrakt gelaufen war (Plattenleerwert). Man gibt zu allen Röhrchen je eine Glasperle und schüttelt 5 Min. mit je 2 ml Methanol in der Schüttelmaschine, zentrifugiert 5 Min. bei 3000 U./Min. und pipettiert den Überstand in spitze Zentrifugenröhrchen. Der Rückstand wird nochmal in der gleichen Weise mit 2 ml Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum zur Trockne eingedampft.

#### Quantitative Bestimmung

Die Herstellung der Lithiumhydroxid-Preßlinge und die Technik des Auftragens sind in einer früheren Arbeit (16) beschrieben. Der Rückstand in den Spitzröhrchen (Urin-Hauptwert und Plattenleerwert) wird in 100 µl Chloroform gelöst. Durch Einblasen von Stickstoff engt man die Lösung auf etwa 10 µl ein und trägt sie auf einen Lithiumhydroxid-Preßling auf. Das Spitzröhrchen wird noch zweimal mit je 100 µl Chloroform ausgespült. Die Spüllösungen werden nach Einengen auf 10 µl auf den gleichen Preßling aufgetragen. Zur Bestimmung eines Reagenzienleerwertes engt man in einem Spitzröhrchen 100 µl Chloroform im Stickstoffstrom auf 10 µl ein und trägt diese auf einen Preßling auf. Diesen Vorgang wiederholt man, wie beim Hauptwert, noch zweimal. Zur Bestimmung eines Standard-Wertes engt man im Spitzröhrchen eine Lösung von 0,2 µg Testosteron in 100 µl Chloroform auf 10 µl ein, trägt diese Lösung auf einen Preßling auf und spült das Spitzröhrchen noch zweimal mit je 100 µl Chloroform aus und trägt die Spüllösungen nach Einengen auf 10 µl auf einen Preßling auf. Die Fluoreszenz der Preßlinge wird vor und nach 20 Min. Erhitzen auf 100° in einem Photometer

„Eppendorf“ mit Fluoreszenzzusatz gemessen. Die Fluoreszenz für den Hauptwert wird in folgender Weise errechnet:

$$F_H = F_H(\text{nach}) - F_H(\text{vor}) \quad F = \text{relative Intensität der Fluoreszenz}$$

$$F_{PL} = F_{PL}(\text{nach}) - F_{PL}(\text{vor}) \quad (\text{vor}) = \text{vor dem Erhitzen}$$

$$F_{\text{Harn-TS}} = F_H - F_{PL} \quad (\text{nach}) = \text{nach dem Erhitzen}$$

H = Urin-Hauptwert

PL = Plattenleerwert

TS = Testosteron

Die Fluoreszenz für den Testosteron-Standard (S) wird in folgender Weise korrigiert:

$$F_S = F_S(\text{nach}) - F_S(\text{vor}) \quad RL = \text{Reagenzienleerwert}$$

$$F_{RL} = F_{RL}(\text{nach}) - F_{RL}(\text{vor})$$

$$F_{\text{Stand.-TS}} = F_S - F_{RL}$$

Bei der Berechnung wird die ermittelte Wiederfindung von 80% berücksichtigt. In der untersuchten Probe sind

$$\frac{0,2 \cdot F_{\text{Harn-TS}}}{F_{\text{Stand.-TS}}} \cdot \frac{100}{80} \mu\text{g Testosteron enthalten.}$$

## Ergebnisse

### Spezifität der Methode

ABRAHAM und STAUDINGER (17) konnten zeigen, daß die Fluoreszenzreaktion auf Lithiumhydroxid-Preßlingen spezifisch für  $\Delta^4$ -3-Ketosteroide ist. Dies konnten wir bestätigen, z. B. geben 10 µg Ätiocholanolon keine Fluoreszenz auf einem Preßling. In Tabelle 1 sind die Laufstrecken einiger  $\Delta^4$ -3-Ketosteroide in dem von uns verwendeten Laufmittelsystem Benzol/Methylenchlorid/Äthylacetat (3:1:1 V/V) aufgeführt. Daraus ist zu ersehen, daß Testosteron von anderen  $\Delta^4$ -3-Ketosteroiden sicher getrennt ist.

Tab. 1

Laufstrecken einiger  $\Delta^4$ -3-Ketosteroide im Durchlauf-Dünnschichtchromatogramm (System Benzol/Methylenchlorid/Äthylacetat 3:1:1 V/V)

$\Delta^4$ -3-Ketosteroid	Laufstrecke (cm)
Cortisol	0
Cortison	0
Corticosteron	0
11-Dehydrocorticosteron	0
6 $\beta$ -Hydroxy-cortisol	0
Aldosteron	0
Cortexolon	0
Desoxycorticosteron	2
Epitesteron	7
17 $\alpha$ -Hydroxy-progesteron	8
Testosteron	10
Androsteron	13,5
Androstendion	20 (Front)
Progesteron	20 (Front)

Das aus Harn nach Dünnschichtchromatographie isolierte Testosteron wurde nach VERMEULEN und VERPLANCKE (3) mit Chromtrioxid in Eisessig zu Androstendion oxydiert. Das Oxydationsprodukt sowie authentisches Androstendion wurden auf einer Aluminiumoxid-GF-Platte im System Benzol/Methylenchlorid/Äthylacetat (3:1:1 V/V) 30 Min. entwickelt. Das Oxydationsprodukt zeigte bei Betrachtung der Platte im UV-Licht nur einen Fleck mit gleichem  $R_F$ -Wert wie authentisches Androstendion. — Das aus Harn nach Dünnschichtchromatographie isolierte

Testosteron wurde ferner in den Systemen Äthylacetat/Methylenchlorid (1:9 V/V) und Butylacetat/Benzol (8:2 V/V) auf Aluminiumoxid-GF-Platten rechromatographiert. Das aus Harn isolierte Testosteron war bei Betrachtung unter der UV-Lampe einheitlich und hatte den gleichen  $R_F$ -Wert wie authentisches Testosteron. — Aus dem Harn gewonnenes Testosteron wurde mit konz. Schwefelsäure erhitzt (21), und es wurde das Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Es hatte das gleiche Fluoreszenzmaximum bei 538 nm wie authentisches Testosteron.

#### Richtigkeit der Methode

Einem zuvor analysierten Harnextrakt wurden 0,3 bzw. 0,6  $\mu\text{g}$  Testosteron zugesetzt, von denen 80 bzw. 82% wiedergefunden wurden. Die wiedergefundenen Mengen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tab. 2

Ergebnisse von Wiederfindungsversuchen mit verschiedenen dem Harnextrakt zugesetzten Testosteron-Mengen

Testosteron zugesetzt $\mu\text{g}$	wiedergef. $\mu\text{g}$	Wiederfindung in %
0,30	0,24	80
0,30	0,24	80
0,30	0,25	83
0,30	0,22	73
0,30	0,25	83
		80
-----		
0,60	0,50	83
0,60	0,39	65
0,60	0,54	90
0,60	0,50	83
0,60	0,44	73
0,60	0,58	97
		82

#### Genauigkeit der Methode

Ein Mischharn wurde zur Bestimmung der Streuung 7mal analysiert. Dabei wurde ein Mittelwert von 135  $\mu\text{g/l}$  gefunden. Die Standardabweichung  $s$  betrug  $\pm 7,4 \mu\text{g}$  ( $\pm 5\%$ ) (Tab. 3).

Tab. 3  
Genauigkeit der Methode  
Mehrfachbestimmung bei einem Mischharn

Testosteron im Harn $\mu\text{g/l}$	
136	
140	
142	
142	
136	
122	
129	
-----	
$\bar{x} = 135$	
$s = \pm 7,4 (\pm 5\%)$	

#### Empfindlichkeit

Nach der vorliegenden Methode lassen sich noch 0,05  $\mu\text{g}$  Testosteron in der Probe sicher bestimmen. Diese Menge gibt eine relative Fluoreszenz von 10 Skalenteilen (Hauptwert abzüglich Leerwert).

#### Normalwerte

Die bei 15 männlichen und 8 weiblichen normalen Versuchspersonen gefundenen Werte sind in Tabelle 4

zusammengefaßt. Da die Testosteron-Ausscheidung bei Männern vom Lebensalter abhängig ist, wurden die Männer in Gruppen von je einer Lebensdekade zusammengefaßt.

Tab. 4  
Testosteron-Ausscheidung bei gesunden Personen

Männer Altersgruppe	Alter	Testosteron $\mu\text{g}/24$ Stdn.
21—30 Jahre	21	118
	22	104
	23	57
	27	100
	28	71
	29	49
	30	77
		$\bar{x} = 82 \quad s = \pm 26$
31—40 Jahre	31	85
	31	60
	32	58
	32	60
	36	69
	36	42
		$\bar{x} = 62 \quad s = \pm 14$
41—50 Jahre	42	59
	45	43
		$\bar{x} = 51$
Frauen	21	9
	22	5
	23	11
	25	11
	25	12
	28	12
	35	4
	40	9

#### Pathologische Harne

Tabelle 5 enthält die ausgeschiedenen Mengen Testosteron bei einigen Patienten. Bei einem Knaben von 8 Jahren mit Kryptorchismus fanden wir 8  $\mu\text{g}$  Testosteron pro 24 Stdn., ein Wert, der wahrscheinlich für dieses Alter als normal angesehen werden darf (22). Bei zwei Frauen mit Virilismus bzw. adrenogenitalem Syndrom wurden erwartungsgemäß erhöhte Werte gefunden.

Tab. 5  
Bestimmung des Testosteron-Gehaltes pathologischer Harne

Diagnose	Alter	Geschlecht	Testo- steron $\mu\text{g}/24$ Stdn.	17-Keto- steroid mg/ 24 Stdn.
Virilismus	57	weibl.	44	6,5
Klitorishypertrophie	9	weibl.	15	3,0
Adrenogenitales Syn- drom	10	weibl.	30	52
Kryptorchismus	8	männl.	8	1,7
Hypogonadismus	17	männl.	26	5,8
Nebennierenrinden- Tumor	11	weibl.	163	520

#### Diskussion

Die von uns beschriebene Methode zeichnet sich dadurch aus, daß sich Testosteron aus dem Harn nach enzymatischer Hydrolyse und Solvolyse sowie nach einer Vorreinigung an einer Aluminiumoxid-Säule durch einmalige eindimensionale Dünnschichtchromatographie von anderen Steroiden mit der  $\Delta^4$ -3-Keto-Gruppierung, insbesondere von Epitestosteron, trennen läßt. Der Arbeitsaufwand ist dabei geringer als bei

anderen Methoden. Das aus Harn isolierte Testosteron wurde auf seine Reinheit geprüft. Bei der Rechromatographie in zwei anderen Dünnschichtsystemen erwies es sich als rein. Bei der Oxydation wurde nur Androstendion gefunden. Das Schwefelsäure-Fluoreszenzspektrum stimmt mit demjenigen von reinem Testosteron überein. Nur  $\Delta^4$ -3-Ketosteroide geben eine Fluoreszenz auf der Oberfläche von Lithiumhydroxid-Preßlingen. Keines der bekannteren  $\Delta^4$ -3-Ketosteroide wandert in dem Bereich der Dünnschichtplatte, wo man Testosteron antrifft. Die Methode ist somit für Testosteron spezifisch.

Die Fluoreszenzreaktion ist sehr empfindlich. Noch  $0,05 \mu\text{g}$  Testosteron lassen sich in einer Probe bestimmen, so daß diese Reaktion für die Bestimmung des Testosterons im Plasma aussichtsreich erscheint. Wir fanden im Plasma von zwei Männern  $0,60$  und  $0,47 \mu\text{g}$  Testosteron pro  $100 \text{ ml}$ .

Die von uns ermittelten Normalwerte sind mit den in der Literatur angegebenen vergleichbar. Wir teilten das Kollektiv der Männer in Gruppen von je einer Lebensdekade auf und fanden bei der Gruppe von 21–30 Jahren die höchsten Werte. Mit zunehmendem Alter nimmt die Testosteronausscheidung beim Manne langsam ab. Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungen von MORER-FARGAS und NOWAKOWSKI (2).

Wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, passen die im Harn gefundenen Testosteron-Mengen besser zum klinischen Bild als die Mengen der ausgeschiedenen 17-Ketosteroide. Unsere Methode ist daher für die klinische Diagnostik wertvoll, zumal der Arbeitsaufwand gering ist und die Methode spezifisch und sehr empfindlich ist.

Wir danken Herrn ALBERT BRÜSTLE für gewissenhafte Mitarbeit. Der eine von uns, P. JOBST, dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Stipendium.

### Literatur

- SCHUBERT, K. und K. WEHRBERGER, *Naturwissenschaften* 47, 281 (1960). — 2. MORER-FARGAS, F. M. und H. NOWAKOWSKI, *Acta endocr., K'hvn* 49, 443 (1965). — 3. VERMEULEN, A. und J. C. M. VERPLANCKE, *Steroids* 2, 453 (1963). — 4. KORENMAN, S. G., H. WILSON und M. B. LIPSETT, *J. Clin. Invest.* 42, 1753 (1963). — 5. SANDBERG, D. H., N. AHMAD, W. W. CLEVELAND und K. SAVARD, *Steroids* 4, 557 (1964). — 6. SCHUBERT, K. und G. FRANKENBERG, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 336, 91 (1964). — 7. DE NICOLA, A., R. I. und E. FORCHIELLI, *Pan-American Congr. Endocrinol.*, 6th, Mexico 1965, zit. nach: S. Bernstein, E. W. Cantrall, J. P. Dusza und J. P. Joseph: *Steroid Conjugates*, Nr. 2120, published by the Chemical Abstracts Service, American Chemical Society, Washington (1966). — 8. ROSNER, J. M., N. F. CONTE, J. H. BRIGGS, D. Y. CHAO, E. M. SUDMAN und P. H. FORSHAM, *J. Clin. Endocr. Metab.*, Springfield 25, 95 (1965). — 9. LIM, N. Y. und J. F. DINGMAN, *J. Clin. Endocr. Metab.*, Springfield 25, 563 (1965). — 10. ISMAIL, A. A. A. und R. A. HARKNESS, *Biochem. J.* 99, 717 (1966). — 11. TAMM, J. M. APOSTOLAKIS und K. D. VOIGT, *Acta endocr., K'hvn* 53, 61 (1966). — 12. WEGIENKA, L. C., B. F. BOWER, J. SHINSAKO, T. M. ELATTAR, S. HANE, N. MIMICA, E. DEMERTZE, J. E. STUTHEIT und P. H. FORSHAM, *Analyt. Biochem.* 18, 203 (1967). — 13. BROOKS, R. V., *Steroids* 4, 117 (1964). — 14. SCHUBERT, K., K. WEHRBERGER und G. FRANKENBERG, *Naturwissenschaften* 51, 638 (1964). — 15. KORENMAN, S. G., H. WILSON und M. B. LIPSETT, *J. biol. Chemistry* 239, 1004 (1964). — 16. NOWOTNY, E., R. ABRAHAM und HJ. STAUDINGER, *diese Z.* 3, 8 (1965). — 17. ABRAHAM, R. und HJ. STAUDINGER, *Z. Naturforsch.* 18b, 421 (1963). — 18. NOWOTNY, E. und HJ. STAUDINGER, *diese Z.* 4, 203 (1966). — 19. BAULIEU, E. E. und M. F. JAYLE, *Analyse des Steroides Hormonaux*, Tome I, S. 73, Masson et Cie., Paris (1961). — 20. GRAEF, V. und HJ. STAUDINGER, *diese Z.* 5, 314 (1967). — 21. ABRAHAM, R. und HJ. STAUDINGER, *diese Z.* 2, 16 (1964). — 22. KNORR, D., *Acta endocr., K'hvn* 54, 215 (1967).

Prof. Dr. Hj. Staudinger  
63 Gießen  
Friedrichstr. 24