

## Vergleich der Spezifität einfacher Methoden zur Bestimmung von Plasmacortisol

### 1. Mitteilung: PORTER-SILBER-Methode und fluorometrische Verfahren

Von K. M. PIRKE und D. STAMM

*Aus der Abteilung für Klinische Chemie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, München*

(Eingegangen am 17. Januar 1972)

Die Spezifität von 9 fluorometrischen Verfahren und der PORTER-SILBER-Methode zur Cortisolmessung im Plasma wurde untersucht. Mit den einzelnen Methoden wurden die Proben von 50 Blutspendern, deren Cortisolgehalt 8 bis 230  $\mu\text{g/l}$  betrug, analysiert. Die gleichen Proben wurden mit einer spezifischen Referenzmethode gemessen. Die Referenzmethode beinhaltet eine Auftrennung des Plasmaextraktes durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie. Vor der fluorometrischen Endpunktbestimmung werden die Verluste mit Hilfe von markiertem Cortisol korrigiert. Die Zuverlässigkeitskriterien aller untersuchten Methoden wurden ermittelt. Nur drei Methoden wiesen eine gute Spezifität auf: 1. Die Methode von CLARK und RUBIN, 2. Methode von GRAEF und STAUDINGER und 3. die Methode von MARTIN und MARTIN. Die drei genannten Methoden zeigen ausreichende Präzision und sind relativ einfach zu handhaben. Auf die besondere Bedeutung spezifischer Verfahren im Rahmen von Stressuntersuchungen wird hingewiesen.

#### *A comparison of the specificity of simple methods for the measurement of plasma cortisol*

##### *1. The PORTER-SILBER method and fluorometric methods*

The specificity of 9 fluorometric methods and the PORTER-SILBER method for the measurement of plasma cortisol was investigated. Each method was used to determine the cortisol concentration (8 to 230  $\mu\text{g/l}$ ) of the plasma from 50 blood donors. The same samples were analyzed by a specific reference method, which involved the two dimensional thin layer chromatography of the plasma extract. Losses in recovery were determined with labeled cortisol and the fluorometric determination was corrected accordingly. The criteria of reliability are reported for all the methods studied. Only three methods show high specificity: the methods of CLARK and RUBIN, GRAEF and STAUDINGER, and of MARTIN and MARTIN. These three methods show satisfactory precision and they are relatively simple to operate. Specific methods are important in the study of cortisol levels during stress.

Die Messung des Cortisols im Plasma hat über die Diagnostik der Nebennierenrinden-Erkrankungen hinaus Bedeutung erlangt. Aus der großen Zahl der Anwendungen seien nur die Untersuchungen zum circadianen Rhythmus und zum Stress erwähnt. Es wurden im wesentlichen drei Meßprinzipien angewandt: 1. Photometrie nach Derivatbildung (PORTER-SILBER-Reaktion), 2. Fluorometrie in konzentrierter Schwefelsäure und 3. Proteinbindungsverfahren. Alle drei Methoden sind wegen mangelnder Spezifität kritisiert worden. Die Messungen zur Spezifität der Proteinbindungsmethode werden Gegenstand einer zweiten Mitteilung sein (1).

Seit PORTER und SILBER (2) die nach ihnen benannte Farbreaktion von Phenylhydrazin mit 17,21-Dihydroxy-20-oxosteroiden beschrieben haben, ist eine Reihe von Methoden teils mit, teils ohne chromatographische Trennschritte beschrieben worden, die diese Reaktion als Endpunktbestimmung benutzen. Die Spezifität der PORTER-SILBER-Reaktion ist begrenzt. Während andere C-21-Steroide, wie etwa Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocortison und 11-Desoxycortisol, wegen ihrer normalerweise niederen Plasmakonzentrationen nicht nennenswert interferieren, geben mehrere Medikamente wie auch Plasmabestandteile (3—6) die Farbreaktion. Die Ansichten über den Anteil unspezifischer Chromogene im normalen Plasma weichen zum Teil erheblich

voneinander ab. Während MIGEON und Mitarbeiter (7) den Cortisolanteil an den PORTER-SILBER-Chromogenen in Plasmaextrakten auf nur 35 bis 50% schätzen, fanden PETERSON und Mitarbeiter (8) mit ihrer Modifikation der PORTER-SILBER-Methode ebenso niedrige Werte wie mit einer Isotopenverdünnungsmethode.

SWEAT (9) beschrieb 1954 eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Cortisol, die als Endpunktbestimmung die Fluoreszenz in konzentrierter Schwefelsäure benutzt. Diese Methode ist recht aufwendig, das Cortisol wird chromatographisch abgetrennt. Später wurde eine Reihe sehr einfacher fluorometrischer Verfahren beschrieben (10—14), die sich nur in Details unterscheiden und folgendes gemeinsame Schema haben:

1. Extraktion des Cortisols aus dem Plasma mit Dichlormethan.
2. Ausschütteln des Extraktes mit Schwefelsäure-Alkohol- bzw. Schwefelsäure-Wasser-Mischungen.
3. Messen der Fluoreszenz. Anregungsmaximum 475 nm, Emissionsmaximum 525 nm.

Die Methoden sind sehr empfindlich und gestatten die Analyse einer großen Zahl von Proben pro Tag. Ihr Nachteil liegt in ihrer zu geringen Spezifität. So geben TOWNSEND und JAMES (15) den unspezifischen Anteil mit 30 bis 50% des Meßwertes an. NIELSEN und

Mitarbeiter (16) messen doppelt so hohe Werte wie mit einem Doppelmarkierungsverfahren. Es wurde daher eine Reihe von Vorschlägen gemacht, die Spezifität mit geringem methodischem Aufwand zu verbessern.

So wurde versucht, das Plasma vor Extraktion des Cortisols durch Ausschütteln mit unpolaren Lösungsmitteln, wie etwa Petroläther, zu reinigen (17, 18).

Ein häufig benutzter Reinigungsschritt ist die Lösungsmittelverteilung nach Eindampfen des Plasmaextraktes. Verteilt wurde zwischen Tetrachlorkohlenstoff und Wasser (19–21), zwischen Benzol und Wasser (22) und zwischen Petroläther und Wasser (23, 24).

CLARK und RUBIN (25) setzen das Cortisol nach Extraktion aus dem Plasma mit Metaperjodat um. Die Fluoreszenz des entstehenden 4-Androsten-17 $\beta$ -carboxyl-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol-3on wird nach Extraktion bei verschiedenen pH-Werten gemessen.

MARTIN und MARTIN (26) setzen, in der Absicht, einen Plasmaleerwert zu gewinnen, einen aliquoten Teil des Extraktes mit Hydroxylamin um. Das entstehende

Oximderivat des Cortisols weist keine Fluoreszenz auf. Die verbleibende Fluoreszenz wird als unspezifisch angesehen.

Ausgehend von der Beobachtung, daß sich die Cortisolfluoreszenz zeitlich anders entwickelt als die Fluoreszenz der unspezifischen Fluorogene, wurde eine Reihe von Vorschlägen gemacht, die Spezifität durch Beobachten der Fluoreszenzentwicklung und rechnerische Korrektur zu verbessern (27–30).

MONCLOA und Mitarbeiter (31) nehmen an, daß die unspezifischen Fluorogene „nicht stöchiometrisch“ aus dem Plasma extrahiert werden. Sie versuchen, den Anteil der unspezifischen Fluoreszenz zu korrigieren, indem sie mehrere Volumina einer Plasmaprobe analysieren.

Diese Aufzählung ist keineswegs vollständig und enthält nur die wichtigsten Vorschläge. Häufig wurden Kombinationen der verschiedenen Reinigungsprozeduren angewandt (32, 33). Über die Wirksamkeit der aufgeführten Methoden zur Spezifitätsverbesserung liegen unserer Meinung nach keine ausreichenden Untersuchungen vor.

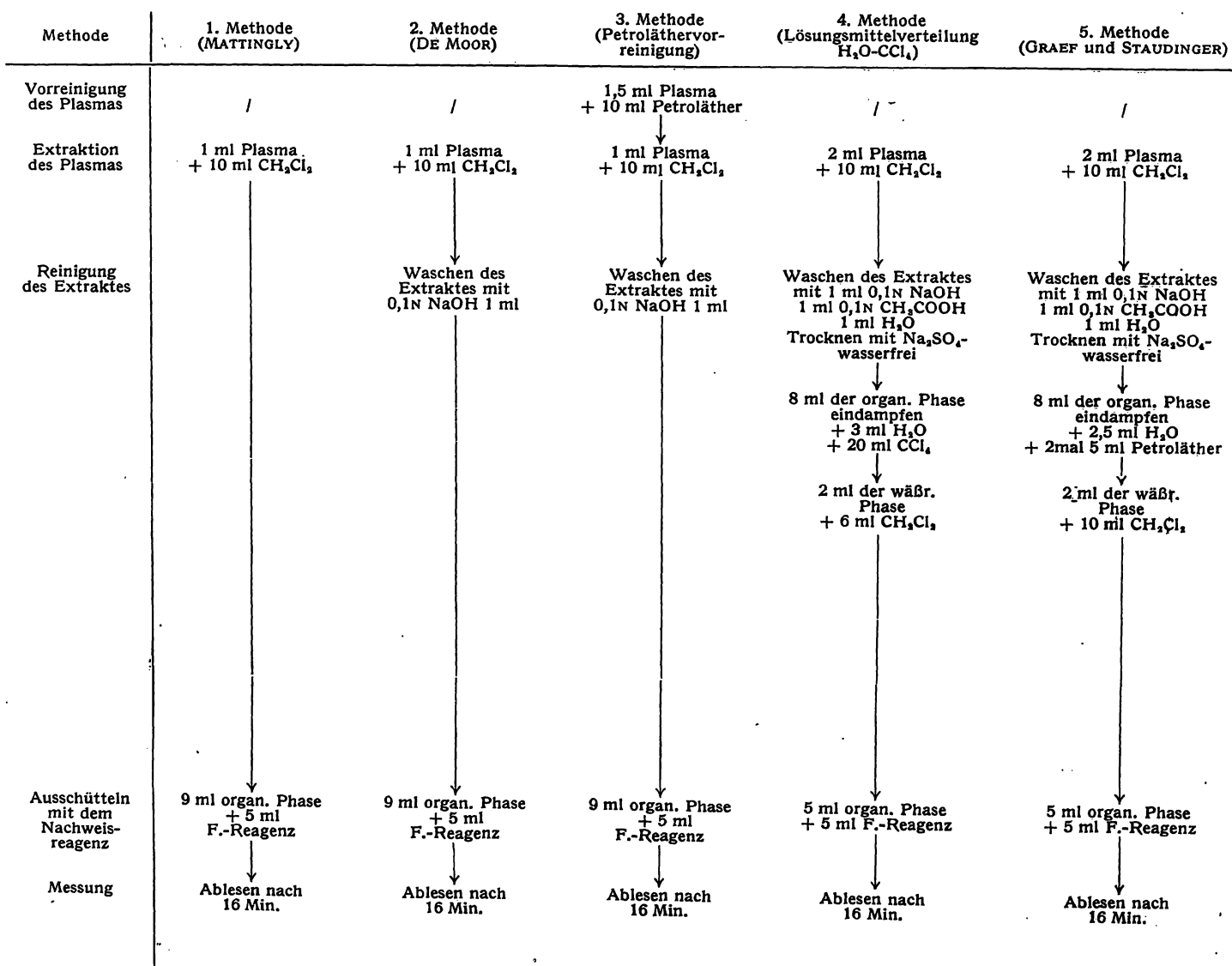


Abb. 1

1. Darstellung der fluorometrischen Verfahren und der PORTER-SILBER- Methode. F.-Reagenz = Fluoreszenzreagenz

Wir wählten 9 Methoden mit verschiedenen Vorschlägen zur Eliminierung un spez. Fluorogene aus. Daneben wurde die PORTER-SILBER-Methode in der Modifikation von PETERSON und Mitarbeitern (8) untersucht.

Mit allen Methoden und mit einer spezifischen Referenzmethode wurden Proben von 50 Blutspendern analysiert. Durch Vergleich mit der Referenzmethode wurde die Spezifität ermittelt.

**Methodik**

**Reagenzien und Geräte**

*Reagenzien*

Soweit nicht anders vermerkt, wurden p. a.-Produkte der Firma Merck verwendet.

1. Dichlormethan wurde mit 1/10 Vol. konz. Schwefelsäure versetzt. Nach dreitägigem Stehen wird das Lösungsmittel mit 1/10 Vol. konz. Schwefelsäure, 1/10 Vol. 2N Natronlauge und 2mal 1/10 Vol. demin. Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat, wasserfrei, wird destilliert.
2. Äthanol. Äthanol wird mit 4 g/l *m*-Phenylendiammoniumdichlorid versetzt. Nach einer Woche wird filtriert und destilliert.

3. Petroläther (Kp. 40 bis 60°). Die Reinigung erfolgt durch Destillation.
4. Folgende Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung benutzt: Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Methanol, Benzol und Aceton.
5. Konz. Schwefelsäure. Die Säure wurde vor Gebrauch getestet, da bei einigen Chargen sehr hohe Leerwerte und schlecht reproduzierbare Meßwerte beobachtet wurden.
6. Cortisol. Stammlösung: 10 mg/10 ml Äthanol.
7. Cortisol-[4-<sup>14</sup>C]. Spez. Aktivität 159 µCi/mg. Radiochemische Reinheit im System Chloroform: Äthanol = 92:8 auf der Dünnschichtplatte 97,8 Prozent<sup>1)</sup>.
8. 2proz. Natriummetaperjodatlösung.
9. 6proz. Natriumsulfitlösung.
10. 0,1N Natronlauge.
11. 0,1N Essigsäure.
12. 2N Schwefelsäure.
13. Natriumsulfat wasserfrei.
14. Hydroxylammoniumchloridlösung nach Angaben von MARTIN und MARTIN (26).
15. Silicagel-Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzzusatz. Die Platten wurden durch dreimalige Entwicklung in Methanol gereinigt.
16. Phenylhydrazin.

<sup>1)</sup> Firma: The Radiochemical Centre, Amersham.

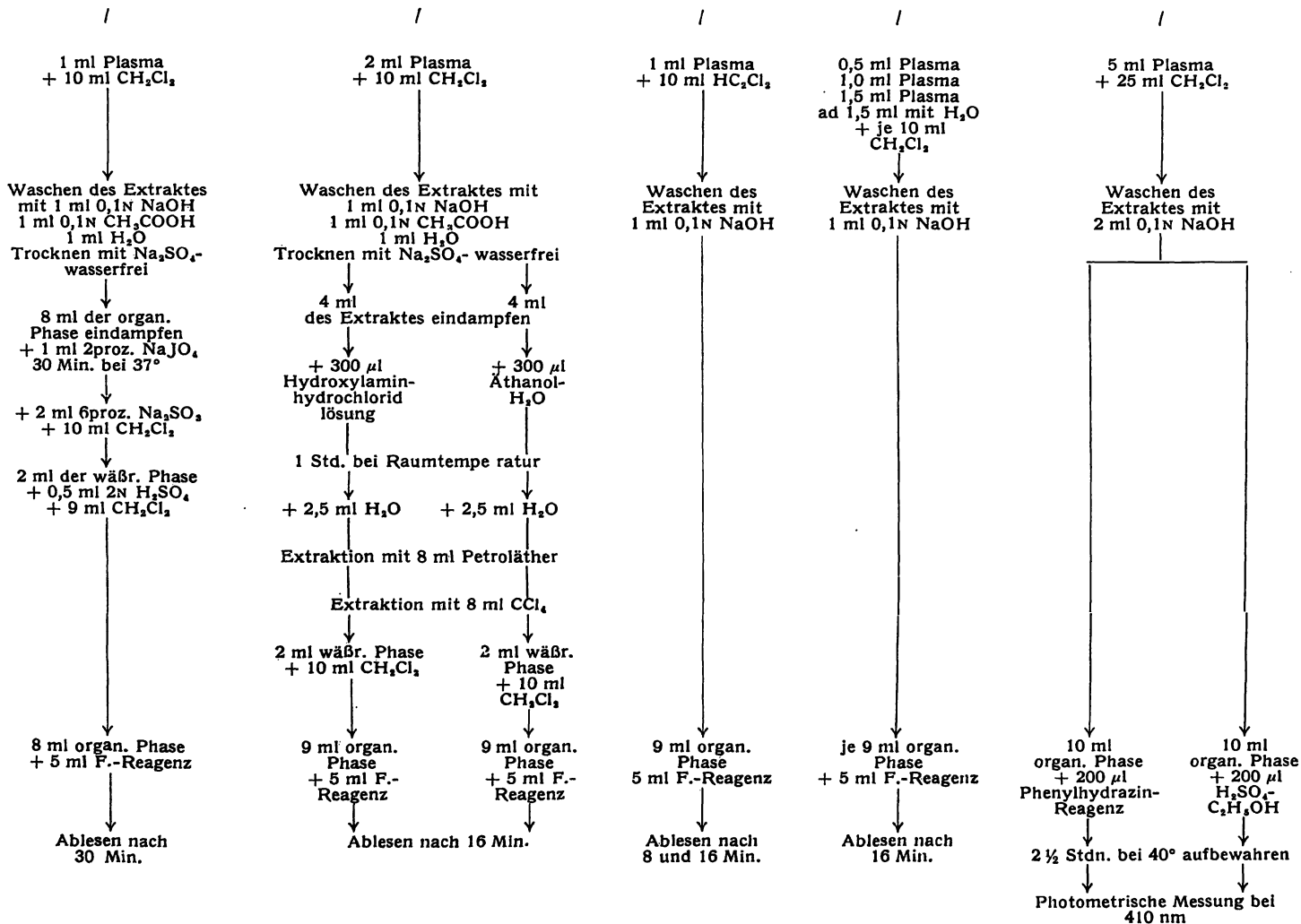
6. Methode (CLARK und RUBIN)

7. Methode (MARTIN und MARTIN)

8. Methode (SPENCER-PEET)

9. Methode (MONCLOA)

10. Methode (PETERSON)



## 17. Dünnschichtchromatographische Systeme.

1. Chloroform : Äthanol = 92:8 (v/v)
2. Benzol : Aceton : Wasser = 50:50:1 (v/v)
3. Benzol : Äthanol = 80:20 (v/v)
4. Äthylacetat : Chloroform = 90:10 (v/v).

## Geräte

1. Turner-Fluorometer Modell 111 mit Blaulampe Typ 110—853<sup>2)</sup>  
Primärfilter: Kodak-Wratten 47 und Kodak-Wratten 3. Sekundärfilter: Kodak-Wratten 16.
2. Dünnschicht-Scanner Typ LB 241 K<sup>3)</sup>.
3. Flüssigkeits-Szintillationszähler Tricarb Modell 3375<sup>4)</sup>.
4. UV-Lampe Typ TL-900<sup>5)</sup>.
5. Rotationsverdampfer<sup>6)</sup>.
6. Spektralphotometer PM 4<sup>7)</sup>.

## Beschreibung der Methoden

Die untersuchten fluorometrischen Verfahren und die PORTER-SILBER-Methode sind in einem Diagramm dargestellt (Abb. 1).

Um einheitliches Glasgerät sowie die bei uns vorhandenen Zentrifugen usw. benutzen zu können, mußten einige Änderungen an den Originalvorschriften vorgenommen werden, die in Abbildung 1 bei der Darstellung der Methoden berücksichtigt sind. Als Fluoreszenzreagenz diente eine Mischung Schwefelsäure: Alkohol wie 3:1 (v/v).

Es wurden 5 ml Fluoreszenzreagenz eingesetzt. Die Fluoreszenz wurde bei Raumtemperatur entwickelt. Die Ablesung erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, nach 16 Min. Die Konzentration des Standards wurde jeweils so gewählt, daß sie einer Plasmakonzentration von 160 µg/l entsprach.

## Referenzmethode

Zu 4 ml Plasma wird 5,15 nCi Cortisol-[4-<sup>14</sup>C] gegeben. Die Extraktion erfolgt mit 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Der Extrakt wird mit 2 ml 0,1N NaOH, 2 ml 0,1N CH<sub>3</sub>COOH und 2 ml demin. Wasser gereinigt. Nach dem Trocknen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, wasserfrei, wird der Extrakt überführt und im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Mit 3mal 100 µl 20proz. Methanol in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wird wieder aufgenommen. Das Auftragen auf die Dünnschichtplatte erfolgte mit einer 100 µl-Spritze<sup>8)</sup>.

Es wurde je eine Probe auf einer Platte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte zweidimensional, zunächst in Chloroform: Äthanol (92:8 v/v), dann in Benzol: Aceton: Wasser (50:50:1 v/v). Die Laufstrecke betrug jeweils 10 cm. Nach dem Entwickeln wurde der Cortisolfleck unter der UV-Lampe (256 nm) aufgesucht. War das nicht zweifelsfrei möglich (bei Cortisolkonzentrationen unter 100 µg/l Plasma), so wurde die Lokalisation unter dem Dünnschichtscanner vorgenommen.

Die Elution erfolgte mit 15proz. Methanol in Wasser. Als Plattenleerwert wird ein entsprechendes Stück der Platte verwandt. Das Eluat wird mit 7 ml Dichlormethan extrahiert. 2mal 2 ml werden zur Fluoreszenz-Messung, 2 ml zur radioaktiven Messung eingesetzt. Gezählt wurde in einem Szintillator der folgenden Zusammensetzung: 1 l Dioxan, 100 g Naphthalin, 7 g PPO. Bei der Zählung wurden jeweils 10<sup>8</sup> Imp./Min. akkumuliert. Die Quenchkorrektur erfolgte nach der Methode des internen Standards.

Bei der fluorometrischen Messung werden 2 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> als Leerwerte eingesetzt. Der Standard wurde folgendermaßen angesetzt: Zu 2 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> werden 40 µl des 1:250 verd. Cortisolstandards gegeben. Es wird mit 5 ml Fluoreszenzreagenz ausgeschüttelt.

<sup>2)</sup> Hersteller: Turner Assoc., Palo Alto. USA-Vertretung Camag, Muttentz/Schweiz.

<sup>3)</sup> Firma Berthold, Friesecke u. Höpfner, Wildbad.

<sup>4)</sup> Packard Instruments, Chicago/USA.

<sup>5)</sup> Firma Camag, Muttentz/Schweiz.

<sup>6)</sup> Firma W. Büchi, Flawil/Schweiz.

<sup>7)</sup> Firma Carl Zeiss, Oberkochen.

<sup>8)</sup> Firma Scientific Glass Engineering PTY. Ltd., Melbourne/Australien.

Berechnung: Die Ausrechnung erfolgt nach der Formel

$$C_p = \frac{C_{St} + (F. I. p - F. I. LP) \times R}{(F. I. St - F. I. L)} - 0,81$$

C<sub>St</sub> = Cortisolgehalt des Standards

C<sub>p</sub> = Cortisolgehalt der Probe

F. I. p = Fluoreszenzintensität der Probe

F. I. LP = Fluoreszenzintensität des Plattenleerwertes

R = wiedergefundene Aktivität in Prozent der eingesetzten Aktivität

F. I. St = Fluoreszenzintensität des Standards

F. I. L = Fluoreszenzintensität des Leerwertes.

Die zugegebene Menge Cortisol-[4-<sup>14</sup>C] entspricht einer Konzentration von 8,1 µg/l.

## Auswahl des Kollektivs, Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

50 gesunden Blutspendern (49 Männern und einer Frau) im Alter von 21 bis 49 Jahren wurden je 200 ml Blut entnommen. Zur Gerinnungshemmung wurden 75 E Heparin pro ml Blut verwandt<sup>9)</sup>.

Um sowohl Proben mit hohen als auch mit niedrigen Cortisol-Konzentrationen zu gewinnen, wurde die Blutentnahme unter Ausnutzung der Tagesschwankungen zwischen 7.30 und 18.10 Uhr vorgenommen. Das Blut wurde unverzüglich zentrifugiert und das Plasma für die einzelnen Methoden aliquotiert. Die Proben wurden bei -30° eingefroren. Aus der Analyse mehrerer Plasmapools vor dem Einfrieren und nach mehrmonatiger Verwahrung bei der angegebenen Temperatur fanden wir keine Änderung der Cortisol-Konzentrationen. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur (22, 34, 35, 36). Die Proben wurden in Serien von etwa 20 unter Qualitätskontrolle analysiert. Zur Qualitätskontrolle dienten Pools aus den Plasmaproben mehrerer Blutspender.

## Methode der statistischen Auswertung

Die mit den einzelnen Methoden gewonnenen Meßwerte (i) wurden gegen die Werte der Referenzmethode (r) aufgetragen (Abb. 2a—i). Die Regressionsgeraden sind eingezeichnet. Zur besseren Orientierung ist auch die Idealgerade  $x^{(i)} = x^{(r)}$  dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten sowie Steigung und Ordinatenabschnitt sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Aus einer Reihe von Gründen, die von HANSERT (37) ausführlich diskutiert werden, halten wir den Korrelationskoeffizienten nicht für ein gutes Maß der Spezifität. Die folgenden Überlegungen gehen von den Differenzen der Einzelwerte — Methode (i) zu Referenzmethode (r) — aus. Als Ähnlichkeitskoeffizient wird eingeführt:

$$\tilde{S}^{(i)} = \sqrt{\frac{1}{2N} \sum_j (x_j^{(i)} - x_j^{(r)})^2} \quad \text{Gl. 1}$$

$x_j^{(i)}$  steht für den mit der Methode i,  $x_j^{(r)}$  für den mit der Referenzmethode r gewonnenen Meßwert für die Probe j. N ist die Anzahl der Proben. Je größer  $\tilde{S}$ , desto geringer ist die Ähnlichkeit.

In den Ähnlichkeitskoeffizienten gehen nun einerseits systematische Differenzen zwischen den Methoden, deren Ursache unterschiedliche Spezifität ist, und andererseits zufällige Fehler — die Streuung der verglichenen Methoden — ein. Dabei wird angenommen, daß systematische Fehler bei der Analyse durch entsprechende Vorsorge (Aufstockversuche, Qualitätskontrolle) bereits eliminiert sind. Unter der Annahme bestimmter Voraussetzungen läßt sich folgender Ausdruck für den Ähnlichkeitskoeffizienten herleiten:

$$\tilde{S}^{(i)} = \sqrt{L_1 + S_1 + S_2} \quad \text{Gl. 2}$$

Dabei steht  $L_1 = 1/2 (\bar{x}^{(i)} - \bar{x}^{(r)})^2$  für den Unterschied in der Lage der Werte beider Methoden.  $\bar{x}^{(i)}$  und  $\bar{x}^{(r)}$  sind jeweils die Mittelwerte über alle 50 Proben.

<sup>9)</sup> Liquemin Hoffmann La Roche AG, Grenzach/Baden.

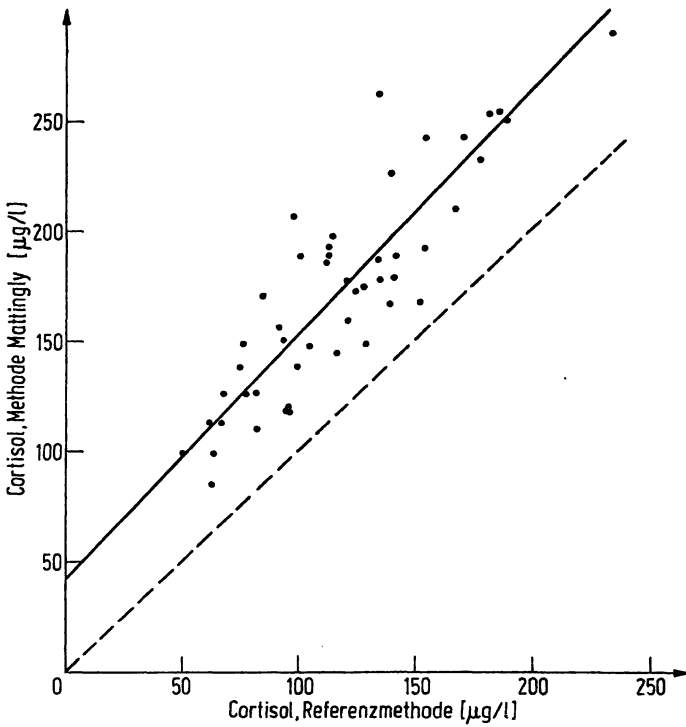


Abb. 2a

Meßwerte der 1. Methode (MATTINGLY) aufgetragen gegen die Werte der Referenzmethode (R). Neben der Regressionsgeraden — ist die Idealgerade  $x(i) = x(r)$  eingezeichnet - - -

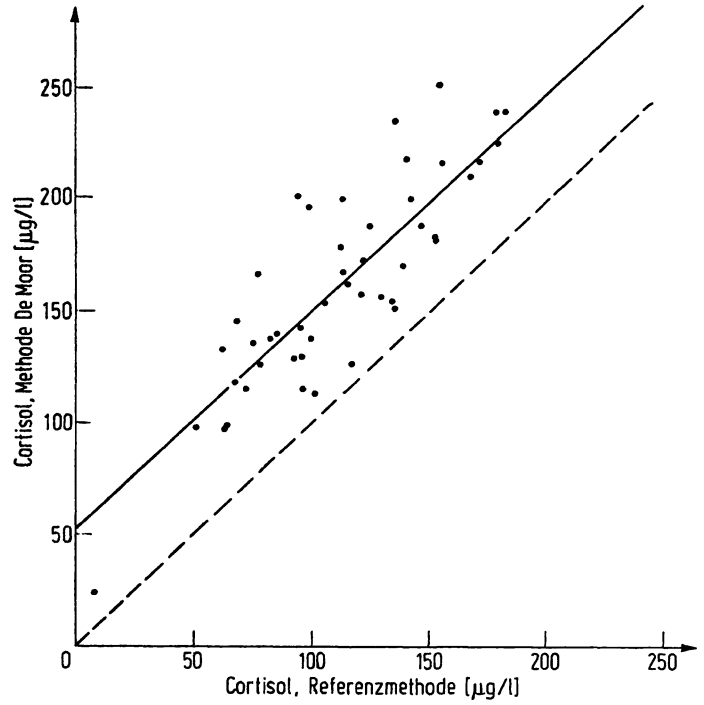


Abb. 2b

Meßwerte der 2. Methode (DE MOOR)

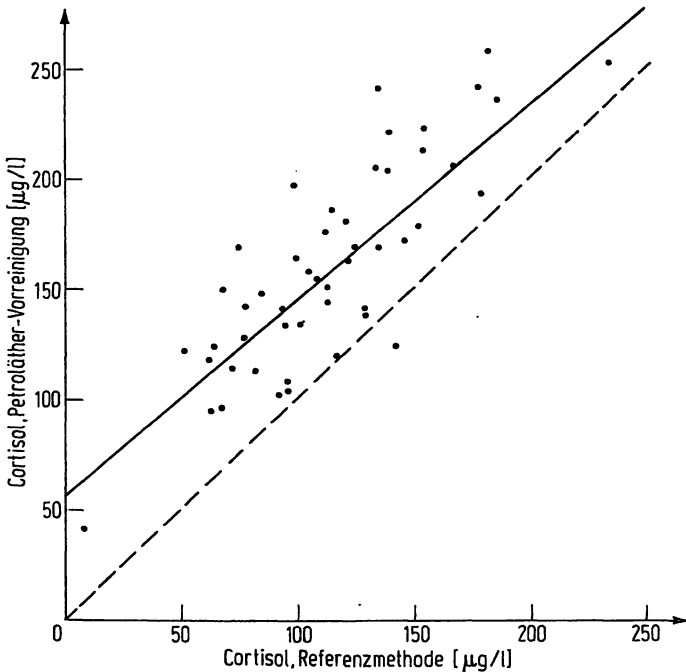


Abb. 2c

Meßwerte der 3. Methode (Petroläther-Vorreinigung)

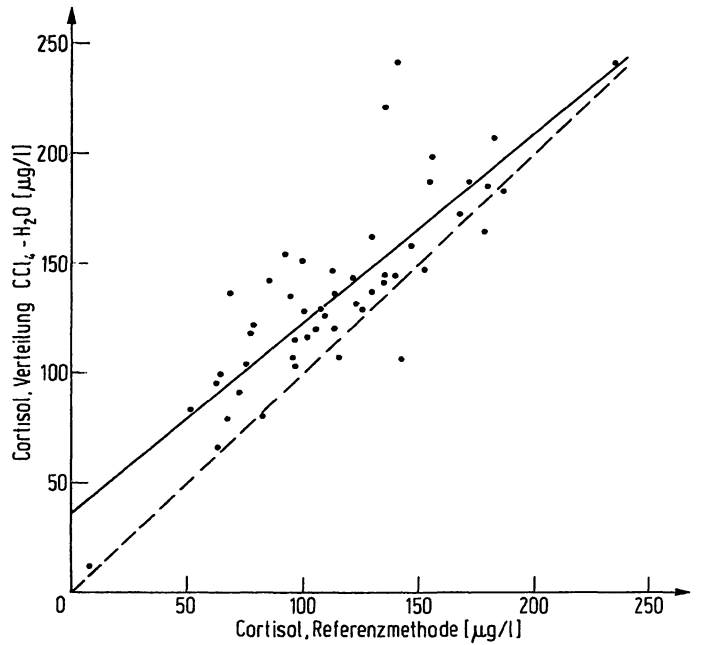


Abb. 2d

Meßwerte der 4. Methode (Lösungsmittelverteilung  $\text{CCl}_4\text{—H}_2\text{O}$ )

In  $S_1 = 1/2 (s^2(x^{(i)}) + s^2(x^{(r)}) - 2s(x^{(i)}, x^{(r)}))$  gehen die Standardabweichungen  $s$  über alle 50 mit einer Methode  $i$  bzw.  $r$  ermittelten Werte ein.  $S_2 = 1/2 (s^2(e^{(i)}) + s^2(e^{(r)}))$  steht für den Anteil der zufälligen Streuung.

Als Schätzwert für  $s(e^{(i)})$  und  $s(e^{(r)})$  scheint es uns zulässig, die Streuung von Tag zu Tag einzusetzen, die bei der Qualitätskontrolle ermittelt wurde, da die Cortisolkonzentrationen der Qualitätskontrollpools etwa den Mittelwerten aus allen 50 Proben entsprechen.

Die Kenntnis des empirisch ermittelten Ähnlichkeitskoeffizienten  $\tilde{R}$  und des Streuungsanteiles  $S_2$  erlaubt uns einen Schätzwert von  $L_1 + S_1$  nach Gleichung 2 herzuleiten.

Wir halten folgende Einteilung in Spezifitätsklassen für sinnvoll:

- $L_1 + S_1 \leq S_2$  gute bis ausreichende Spezifität
- $L_1 + S_1 > S_2$  ungenügende Spezifität.

Weiter wurde die Frage geprüft, ob die mangelhafte Spezifität einzelner Methoden durch einfache rechnerische Korrektur ver-

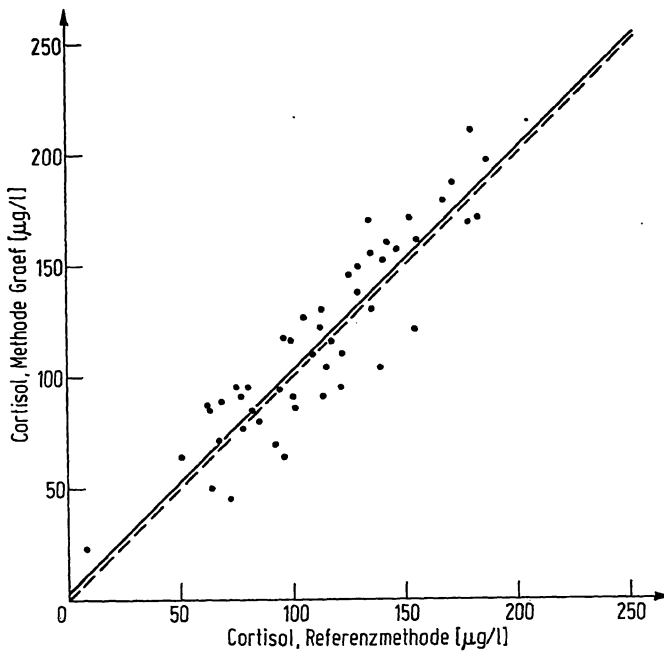


Abb. 2e  
Meßwerte der 5. Methode (GRAEF und STAUDINGER)

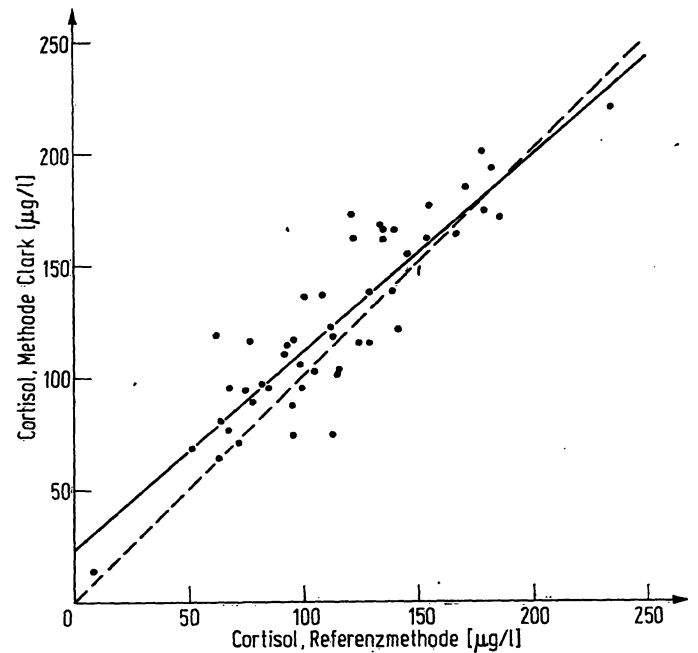


Abb. 2f  
Meßwerte der 6. Methode (CLARK und RUBIN)

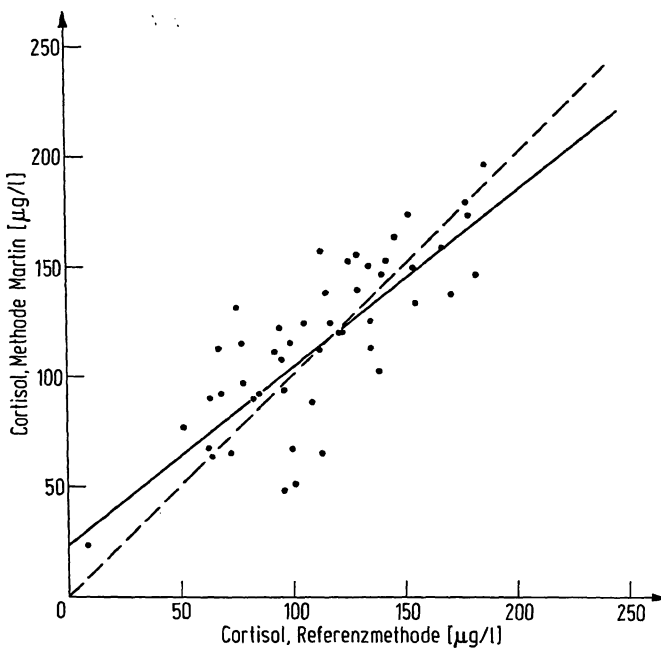


Abb. 2g  
Meßwerte der 7. Methode (MARTIN und MARTIN)

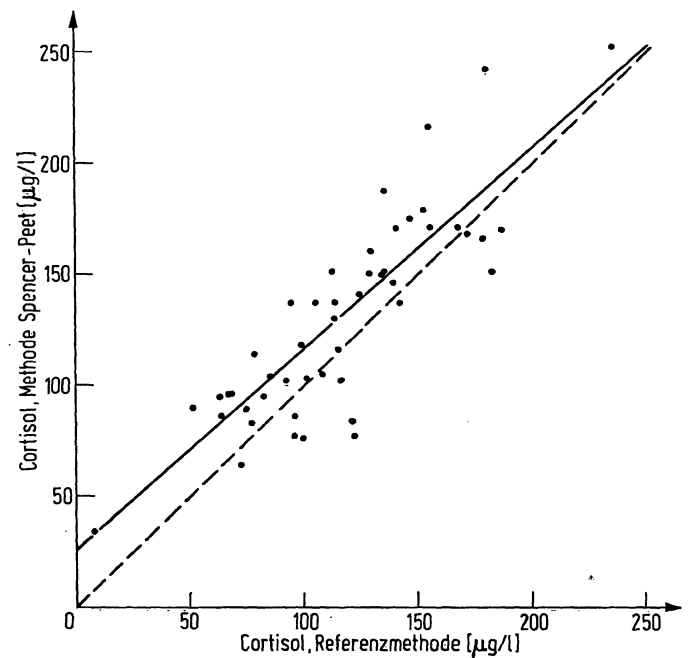


Abb. 2h  
Meßwerte der 8. Methode (SPENCER-PEET)

bessert werden kann. Es wurde eine lineare Transformation über die Regressionsgerade durchgeführt. Dann ergeben sich durch lineare Transformation optimal erreichbare Ähnlichkeitskoeffizienten, deren Wert bei vollständiger Korrektur mit  $\tilde{S}_2$  übereinstimmen sollte.

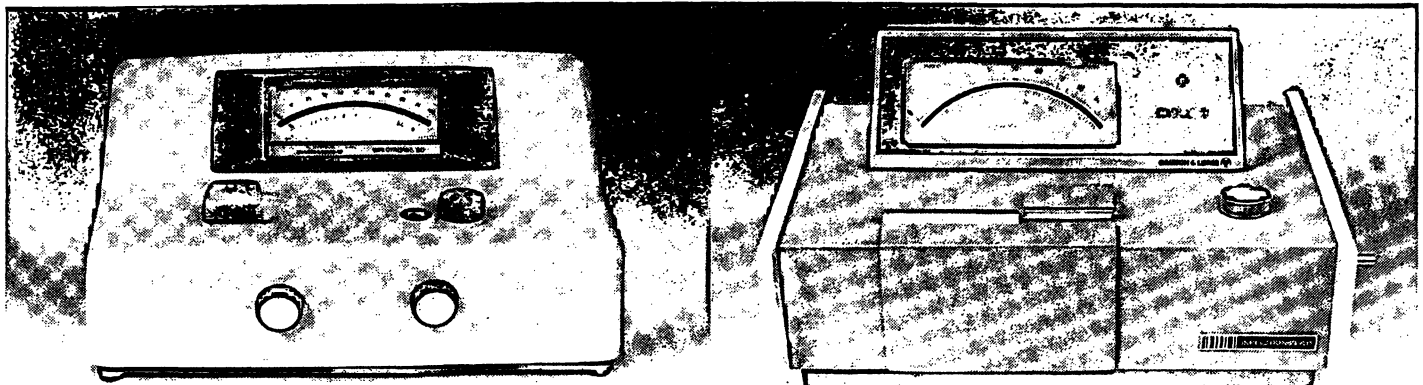
## Ergebnisse und Diskussion

### Untersuchung der Referenzmethode

Da sich in der Literatur Hinweise auf die Instabilität des Cortisols bei der Dünnschichtchromatographie finden (38), registrierten wir die Verteilung der Radioaktivität auf der Platte mit dem Dünnschicht-Scanner.

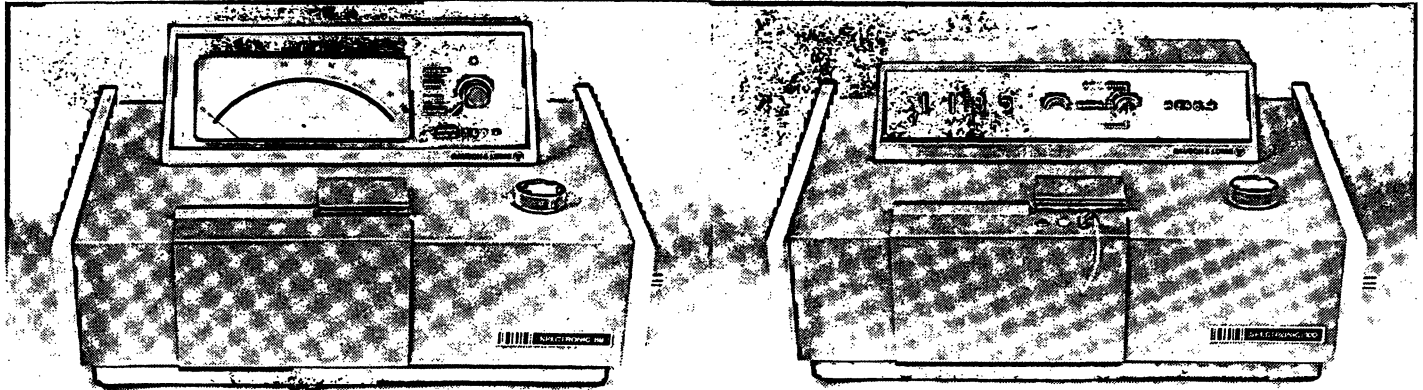
Plasmaproben wurden in der unter „Referenzmethode“ beschriebenen Weise aufgearbeitet. Weder nach der ersten noch nach der zweiten Chromatographie wurden Artefakte beobachtet.

Weiter untersuchten wir die spezifische Aktivität wäßr. Lösungen vor und nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie. Zu 1 ml Wasser wurden 800 ng kaltes und 74,8 ng markiertes Cortisol gegeben. Dann wurde mit 7 ml Dichlormethan extrahiert. Je 2 ml des Extraktes wurden zur radioaktiven und zur fluorometrischen Messung verwandt. Der Quotient aus gemessenen Imp./Min. und der Fluoreszenzintensität



**Spectronic 20**

**Spectronic 70**



**Spectronic 88**

**Spectronic 100**

## BAUSCH & LOMB hat die Spektralphotometer Ihrer Vorstellung zu Preisen die Sie akzeptieren werden.

Wie immer auch Ihre Aufgabenstellung lautet—Bausch & Lomb bietet Ihnen für jede Anwendung das optimal konzipierte und preiswerte Gerät.

### **Spectronic 20**

Gitter-Spektralphotometer mit grosser Anzeigeskala. Wellenlängenbereich 340-950nm bei 20nm Bandbreite. Das in der Welt meist verwendete Spektralphotometer. Nahezu 100.000 Stück verkauft.

### **Spectronic 70**

Einfach bedienbares Gitter-Spektralphotometer. Wellenlängenbereich 325-925nm bei 8nm

Bandbreite. Wenn Sie auf Flexibilität in der Probenraum-Gestaltung Wert legen, so wählen Sie dieses Gerät. Das Gerät ist mit allen Standard-Küvetten einschliesslich Mikro-Küvetten ausrüstbar. Einzel- oder Mehrfach-Probenhalter stehen zur Verfügung.

### **Spectronic 88**

Das Spectronic 88 erlaubt Direkt-ablesung von Extinktion, Transmission oder Konzentration auf einer 20cm langen Spiegelskala. Wellenlängenbereich 325-925nm. Extinktionsbereiche 0-1.0 E, 1.0-2.0 E, damit grösstmögliche Ablesegenauigkeit. Zum Gerät ist

eine steuerbare Mikro-Durchflussküvette lieferbar.

### **Spectronic 100**

Digitalanzeigendes Spektralphotometer, linear in E, T oder C. Höchstmöglicher Bedienungs-komfort. Überschreitungen des Arbeitsbereiches werden automa-tisch angezeigt. Zur Messwert-verarbeitung stehen Analog- und BCD-Ausgänge serienmässig zur Verfügung. Die zum Gerät lieferbare elektronisch gesteuerte Mikro-Durchflussküvette und die Drucker-anchlussmöglichkeit machen das Spectronic 100 zum Baustein eines automatischen Messplatzes.

Verkauf und Service durch die technischen Büros der Bausch & Lomb Organisation und den autorisierten Laborfachhandel.

**BAUSCH & LOMB**  **GMBH**  
ANALYSENSYSTEME

8043 Unterföhring b. München • Postfach 1128 • Telefon (0811) 971673/74





## Um von etwas anderem zu reden..

Wir nehmen an Charles River COBS®-Ratten alle chirurgischen Veränderungen vor, die Ihren Laborzwecken entsprechen.

Wir führen Thyroidektomien, Hypophysektomien und vier weitere Endokrinektomien aus, auch Thymektomien an neugeborenen Rattenjungen. Wir können jede einzelne dieser verschiedenen chirurgischen Veränderungen, oder auch jede beliebige Kombination an jedem von Ihnen bestimmten Tier vornehmen.

Alle Mitglieder des chirurgischen Teams bei Charles River France sind Biologen, die die erforderlichen Eingriffe in schonenden Verfahren so umfassend und vollständig durchführen verstehen, daß die Tiere für Versuche optimal geeignet sind.

Wenn Sie chirurgisch veränderte Tiere benötigen, teilen Sie uns bitte Ihre entsprechenden Wünsche mit.

Was an Charles River Ratten zu machen ist, können Sie uns anvertrauen.

**Charles River France**   
76 Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, France



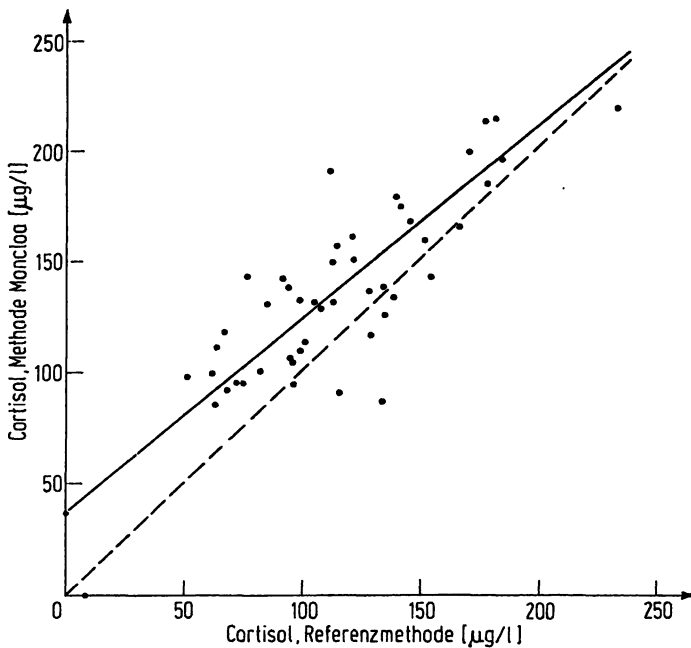


Abb. 2i  
Meßwerte der 9. Methode (MONCLOA)

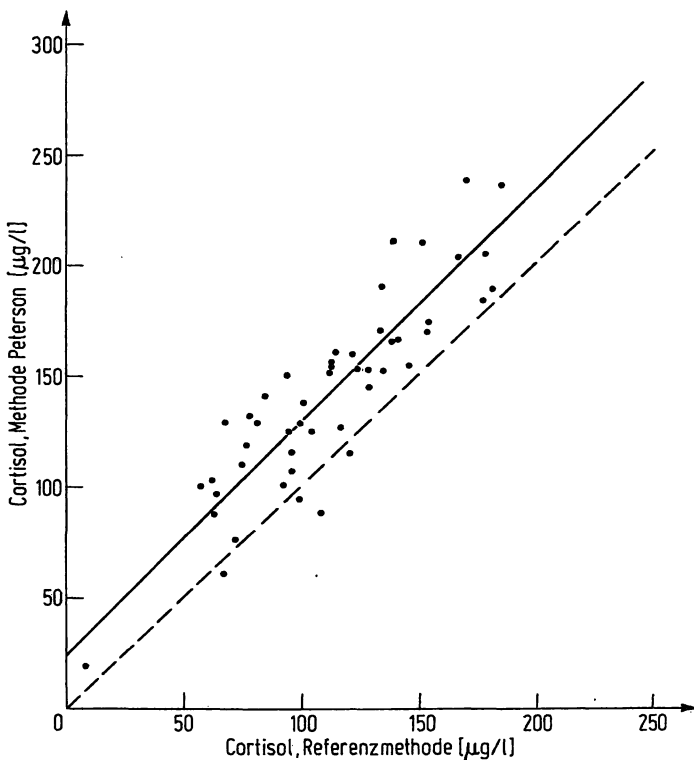


Abb. 2j  
Meßwerte der 10. Methode (PETERSON)

(in willkürlichen Einheiten) betrug  $196,5 \pm 6,6$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9$ ). Standards gleicher Zusammensetzung wurden entsprechend der Vorschrift „Referenzmethode“ behandelt. Es wurde ein Quotient von  $196,9 \pm 9,3$  ( $n = 9$ ) errechnet. Das berechtigt zu der Schlußfolgerung, daß weder fluoreszierende noch quenchende Substanzen aus den für Chromatographie und Elution benutzten Reagenzien und Glasgeräten eingeschleppt wurden. Wir überprüften die Verluste bei den Teilschritten der Referenzmethode. Die Wiederfindungsrate bis zum

Eindampfen betrug 59,38% (Mittelwert aus Fünffachbestimmung.) Berücksichtigt man die Verluste, die beim Absaugen der Oberphase entstanden, und korrigiert rechnerisch, so wurden bis zum Eindampfen 86,22% wiedergefunden. Das Wiederaufnehmen nach dem Eindampfen mit 3mal 100 µl 20proz. Methanol in Dichlormethan erfolgte mit 77,8% Ausbeute (Mittelwert aus Dreifachbestimmung). Die Wiederauffindungsrate für die Elution mit 3 und 2 ml 15proz. Methanol in Wasser betrug 91,8%. Die aus den angegebenen Werten errechnete Gesamtwiederauffindungsrate beträgt 42,4%. Der gemessene Wert betrug  $42,83 \pm 3,64\%$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ ).

Die Spezifität wurde durch Anwendung zusätzlicher Dünnschichtchromatographien geprüft. Je 4 ml eines Plasmapools wurden in der beschriebenen Weise aufgearbeitet. Das Eluat von der Dünnschichtplatte wurde mit 7 ml Dichlormethan extrahiert. Der Extrakt wurde aliquotiert. 3 ml davon wurden zur radioaktiven und zur fluorometrischen Messung aufgeteilt. Der Rest wurde erneut eingedampft und mit 3mal 100 µl 20proz. Methanol in Dichlormethan auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte einmal im System 3 (Benzol : Äthanol = 80:20 v/v) und einmal im System 4 (Äthylacetat : Chloroform = 90:10 v/v). Die Laufstrecke betrug jeweils 10 cm. Die Cortisol-Zone wurde unter dem Scanner aufgesucht und eluiert. Die Berechnung erfolgte in gleicher Weise wie bei der Referenzmethode. Tabelle 1 zeigt das Ergebnis. Die Meßwerte nehmen nach der zweiten Chromatographie nicht mehr ab, das heißt, die Referenzmethode kann als hinreichend spezifisch gelten.

Tab. 1  
Meßwerte mit der Referenzmethode und nach zusätzlicher Chromatographie im System 3 (Benzol : Äthanol = 80 : 20 v/v) bzw. im System 4 (Äthylacetat : Chloroform = 90 : 10 v/v)

Meßwerte Referenzmethode [µg/l]	Meßwerte nach zusätzlicher Chromatographie [µg/l]
	im System 1
267	241
254	271
262	278
251	254
259	257
$\bar{x}$ 258	$\bar{x}$ 260
	im System 2
234	268
257	263
247	212
226	236
234	264
$\bar{x}$ 240	$\bar{x}$ 249

Zuverlässigkeitskriterien der untersuchten Methoden

Wir untersuchten die Zuverlässigkeitskriterien, um neben der Spezifität Beurteilungsgrundlagen für die einzelnen Methoden zu gewinnen. Auf eine Ermittlung der Nachweisgrenze wurde verzichtet, da diese sehr von der Art des verwandten Fluorometers und der Filter abhängig ist.

Tab. 2  
Präzision der untersuchten Methoden

Methoden	Streuung von Tag zu Tag (n = 12)			Streuung in der Serie aus Doppelbestimmungen (n = 12)	
	$\bar{x}$ [ $\mu\text{g/l}$ ]	s [ $\mu\text{g/l}$ ]	VK [%]	s [ $\mu\text{g/l}$ ]	VK [%]
1. Methode (MATTINGLY)	162,9	8,0	4,89	7,3	4,40
2. Methode (DE MOOR)	157,7	9,4	5,99	8,3	5,23
3. Methode (Petroläthervorreinigung)	155,4	10,9	7,00	7,4	4,79
4. Methode (Lösungsmittelverteilung $\text{H}_2\text{O}-\text{CCl}_4$ )	125,0	11,6	9,29	5,4	4,36
5. Methode (GRAEF und STAUDINGER)	120,5	8,8	7,34	4,9	3,93
6. Methode (CLARK und RUBIN)	147,4	14,7	9,98	11,1	7,42
7. Methode (MARTIN und MARTIN)	154,4	14,5	9,40	6,2	3,99
8. Methode (SPENCER-PEET)	125,1	11,4	9,15	4,9	3,83
9. Methode (MONCLOA)	133,2	9,9	7,45	7,1	5,31
10. Methode (PETERSON)	216,0	13,0	6,10	9,0	4,10
11. Referenzmethode	165,1	12,7	7,69	8,2	4,94

### Präzision

Die Streuung von Tag zu Tag sowie die Streuung in der Serie aus Doppelbestimmungen wurde ermittelt. Die Werte ergaben sich aus der Qualitätskontrolle, die jeweils bei der Analyse der Proben mitgeführt wurde. Dabei wurden verschiedene Plasmapools benutzt, so daß ein Vergleich der in Tabelle 2 aufgeführten Mittelwerte nicht möglich ist. Wie zu erwarten, zeigen die einfachsten Methoden (MATTINGLY, DE MOOR) die besten Präzisionen. Die größten Standardabweichungen fanden sich bei den Methoden 8 (CLARK und RUBIN) und 9 (MARTIN und MARTIN).

### Aufstockversuche

Zu einer Reihe verschiedener Plasmaproben von Blutspendern wurden jeweils 100  $\mu\text{g/l}$  Cortisol aufgestockt. Bei Methode 8 (SPENCER-PEET) und Methode 9 (MONCLOA) wurde auf Aufstockversuche verzichtet, da diese keine weiteren Aufschlüsse erwarten ließen als die Versuche mit Methode 2 (DE MOOR). Bei allen Methoden wurden im Mittel etwa 100% der eingesetzten Menge wiedergefunden (Tab. 3). Danach ist mit Quencheffekten im Plasma gesunder Personen bei keiner der angewandten Methoden zu rechnen.

### Spezifität

1. Methode (nach MATTINGLY). Mit der Methode von MATTINGLY wurden Werte zwischen 24 und 288  $\mu\text{g/l}$  gefunden. Der Mittelwert von 168  $\mu\text{g}$  liegt um 53  $\mu\text{g}$  oder 46% über dem der Referenzmethode. Damit war der unspezifische Anteil in den von uns analysierten Proben etwas niedriger als es den Beobachtungen von JAMES und Mitarbeitern (15) und von ALSFELD und NIELSEN (16) entspricht. Die schlechte Spezifität kommt in dem großen Wert des Ähnlichkeitskoeffizienten  $\bar{S}$

Tab. 3  
n verschiedene Plasmaproben wurden mit je 100  $\mu\text{g/l}$  Cortisol aufgestockt

Methoden	Mittlere Wiederfindungsrate [%]	Bereich [%]	Anzahl der Versuche n
1. Methode (MATTINGLY)	100,6	80,4—123,9	8
2. Methode (DE MOOR)	98,5	84,3—111,7	8
3. Methode (Petroläthervorreinigung)	98,7	80,0—110,0	10
4. Methode (Lösungsmittelverteilung)	102,7	83,3—119,0	10
5. Methode (GRAEF und STAUDINGER)	101,4	85,0—113,6	10
6. Methode (CLARK und RUBIN)	101,6	93,3—111,7	8
7. Methode (MARTIN und MARTIN)	100,5	85,0—111,5	10
10. Methode (PETERSON)	98,6	87,0—110,1	8

zum Ausdruck. Durch lineare Transformation der Werte über die Regressionsgerade kann  $\bar{S}$  auf 1,33 verbessert werden. Der Vergleich mit dem zugehörigen Erwartungswert zeigt, daß die rechnerische Korrektur nicht vollständig ist. Das heißt, daß der unspezifische Anteil an der Fluoreszenz eine von Probe zu Probe variable Größe ist.

2. Methode (nach DE MOOR). Diese Methode enthält gegenüber der ersten als zusätzlichen Reinigungsschritt eine Alkaliwäsche des Plasmaextraktes. Eine Verbesserung der Spezifität wird dadurch jedoch nicht erzielt, wie der hohe Mittelwert und der hohe Wert des Ähnlichkeitskoeffizienten zeigen. Auch bei dieser Methode führt die lineare Transformation nicht zu vollständiger Korrektur der Werte. Die Spezifität der Methode konnte von TOWNSEND und Mitarbeitern (39) und von DE MOOR und Mitarbeitern (13) durch frühes Ablesen nach 3 bzw. 5 Min. gesteigert werden. Das dabei erforderliche sehr exakte Timing ist allerdings nur in einer automatischen Meßanordnung zu realisieren (39).

3. Methode (Vorreinigung mit Petroläther). BRAUNSBURG und JAMES (22) konnten aufgrund säulenchromatographischer Trennungen zeigen, daß es sich bei den unspezifischen Fluorogenen um recht unpolare Substanzen handelt. Es lag daher nahe, sie durch Extraktion mit einem unpolaren Lösungsmittel zu entfernen. Wie der hohe Wert des Ähnlichkeitskoeffizienten von 3,73 zeigt, führt dieser Reinigungsschritt nicht zu einer Verbesserung der Spezifität gegenüber der MATTINGLY-Methode. Wir können damit die Beobachtung von DE MOOR (13), VERMEULEN (19) und MONCLOA (31) bestätigen, die die Wirksamkeit dieses Schrittes bezweifeln haben.

4. Methode (Lösungsmittelverteilung: Tetrachlorkohlenstoff-Wasser). Die Verteilung dient der Eliminierung von Corticosteron und von unspezifischen Fluorogenen. Die Fluoreszenzintensität des Corticosteron ist unter den hier benutzten Bedingungen etwa doppelt so groß wie die des Cortisol. Corticosteron erreicht im peripheren Plasma etwa 1/20 bis 1/30 der Cortisolkonzentration.

tration. Eine Zusammenfassung der entsprechenden Literatur findet sich bei BRORSON (40). Es sind also nur etwa 8 von 52,9 µg/l, das sind 15% der mittleren Differenz MATTINGLY-Methode — Referenzmethode, durch Corticosteron bedingt. Die Methode weist keine ausreichende Spezifität auf.

5. *Methode* (GRAEF und STAUDINGER). RUDD und Mitarbeiter (41) wiesen darauf hin, daß es sich bei den unspezifischen Fluorogenen um Di- und Triglyceride handeln könnte. DE MOOR (13) beobachtete, daß bei Extraktion des Cortisols mit Dichlormethan gleichzeitig Cholesterin extrahiert wird. STENLAKE und Mitarbeiter (42) sowie GRAEF und STAUDINGER (23) konnten zeigen, daß Cholesterin, Cholesterinester und eine Reihe von Lipiden für die unspezifische Fluoreszenz verantwortlich sind. Die von GRAEF und STAUDINGER vorgeschlagene Verteilung Wasser — Petroläther eliminiert die unspezifischen Fluorogene des menschlichen Plasmas weitgehend. Der Wert des Ähnlichkeitskoeffizienten von 1,29 ist sehr niedrig und überwiegend durch die Streuung der Methode und der Referenzmethode bedingt.

Tab. 4  
Korrelationskoeffizienten und Regressionsgeraden Methode — Referenzmethode

Methoden	Korrelationskoeffizient r	Regressionsgerade y = a + bx
1. Methode (MATTINGLY)	0,894	y = 40,56 + 1,107 x
2. Methode (DE MOOR)	0,870	y = 51,20 + 0,996 x
3. Methode (Petroläthervorreinigung)	0,808	y = 56,62 + 0,899 x
4. Methode (Lösungsmittelverteilung H <sub>2</sub> O-CCl <sub>4</sub> )	0,836	y = 36,62 + 0,871 x
5. Methode (GRAEF und STAUDINGER)	0,918	y = 3,79 + 0,997 x
6. Methode (CLARK und RUBIN)	0,857	y = 23,73 + 0,857 x
7. Methode (MARTIN und MARTIN)	0,830	y = 24,72 + 0,806 x
8. Methode (SPENCER-PEET)	0,865	y = 25,57 + 0,906 x
9. Methode (MONCLOA)	0,820	y = 36,79 + 0,864 x
10. Methode (PETERSON)	0,904	y = 23,80 + 1,05 x

6. *Methode* (nach CLARK und RUBIN). Mit dieser Methode fanden wir im Mittel 123 µg/l. Wie auch der Ähnlichkeitskoeffizient zeigt, weist die Methode eine gute Spezifität auf.

7. *Methode* (nach MARTIN und MARTIN). Diese Methode ist unter den hier untersuchten die zeitaufwendigste. Es können nur etwa 10 bis 15 Proben pro Tag von einer Person analysiert werden. Die Spezifität ist hoch, wie der niedrige Wert des Ähnlichkeitskoeffizienten zeigt. Die Methode enthält zwei Ansätze zur Spezifitätssteigerung. Durch Umsetzen des Cortisols mit Hydroxylaminhydrochlorid wird ein Plasmaleerwert gewonnen. Zusätzlich wird eine Lösungsmittelverteilung Wasser-Petroläther bzw. Tetrachlorkohlenstoff durchgeführt.

Errechnet man die Werte ohne Berücksichtigung des Plasmaleerwertes, so erhält man einen Mittelwert von 117,8 µg/l und einen Ähnlichkeitskoeffizienten von 1,597. Das heißt, die Einführung des Plasmaleerwertes bringt keine Spezifitätssteigerung. Sie kann, was die Analyse von Plasmaproben gesunder Personen angeht, als überflüssig angesehen werden.

8. *Methode* (nach SPENCER-PEET). Bei der rechnerischen Korrektur ihrer Meßwerte gehen SPENCER-PEET und Mitarbeiter davon aus, daß die zeitliche Fluoreszenzentwicklung geradlinig verläuft (Abb. 3b, Kurve 1). Den Anstieg dieser Geraden ermitteln sie durch Ableitung nach 8 und 16 Min. Wir überprüften diese Annahme an Plasmaproben von Blutspendern. Der Dichlormethanextrakt von 10 ml Plasma wurde auf der Dünnschichtplatte im System Chloroform : Äthanol = 92:8 (v/v) aufgetrennt. Die Cortisol- und Corticosteron-Zonen wurden breit abgekratzt und verworfen. Der Rest der Bahn wurde mit Methanol eluiert. Abbildung 3b zeigt die zeitliche Entwicklung der unspezifischen Fluorogene in 4 verschiedenen Proben. Zum Vergleich sind in Abbildung 3a die Entwicklung der Cortisol- und der Corticosteronfluoreszenz aufgezeichnet. Wendet

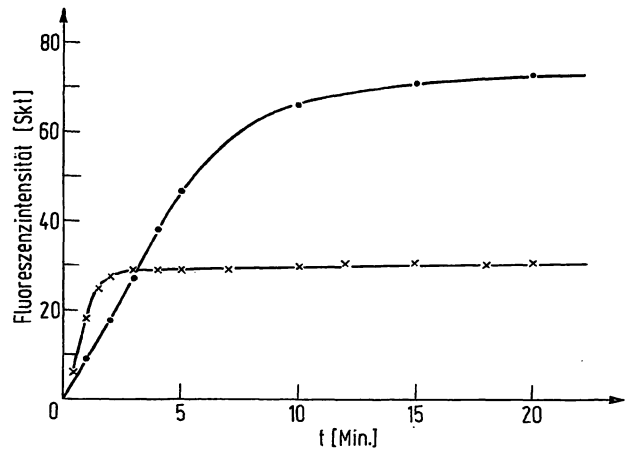


Abb. 3a  
Fluoreszenzentwicklung von 1 µg Cortisol und von 1 µg Corticosteron

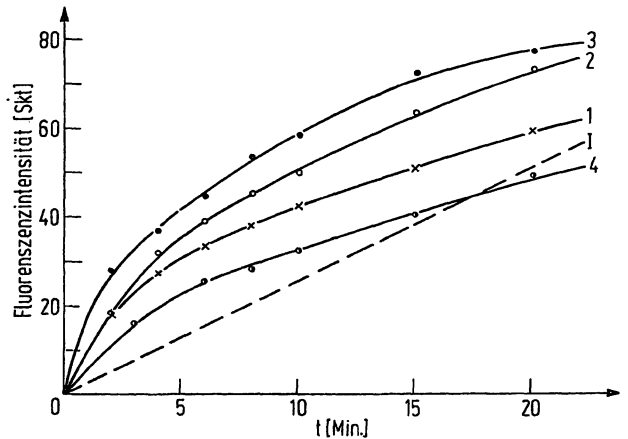


Abb. 3b  
Zeitliche Entwicklung der unspezifischen Fluorogene in vier verschiedenen Plasmaproben (Kurve 1 bis 4). Kurve 1 zeigt den von SPENCER-PEET vermuteten Verlauf der Fluoreszenzentwicklung

Tab. 5  
 Statistische Maßzahlen für die Spezifität der Methoden.  $\tilde{S}^2 = L_1 + S_1 + S_2$

Methoden	Mittelw. aus 50 Proben $\bar{x}$	Ähnlichkeits- koeffiz. $\tilde{S}$	$\tilde{S}^2$	$L_1 + S_1$	$S_2$	Ähnlichkeits- koeffizient nach linearer Transforma- tion	Erwartungs- wert des Ähn- lichkeitskoeffi- zienten nach Transforma- tion
	[ $\mu\text{g/l}$ ]						
1. Methode (MATTINGLY)	168	4,09	16,73	15,63	1,13	1,33	1,06
2. Methode (DE MOOR)	166	3,95	15,60	14,32	1,24	1,46	1,11
3. Methode (Petroläthervorreinigung)	160	3,73	13,91	12,48	1,40	1,75	1,18
4. Methode (Lösungsmittelverteilung)	137	2,32	5,38	3,89	1,48	1,63	1,22
5. Methode (GRAEF und STAUDINGER)	119	1,29	1,66	0,47	1,19	—	—
6. Methode (CLARK und RUBIN)	123	1,68	2,80	0,90	1,89	—	—
7. Methode (MARTIN und MARTIN)	118	1,70	2,89	1,02	1,86	—	—
8. Methode (SPENCER-PEET)	129	1,91	3,65	2,19	1,46	1,53	1,21
9. Methode (MONCLOA)	136	2,35	5,52	4,22	1,30	1,70	1,14
10. Methode (PETERSON)	145	2,59	6,71	5,06	1,65	—	—

man die Korrektur von SPENCER-PEET an, so ist mit einer erheblichen Unterkorrektur zu rechnen, da die Zunahme der unspezifischen Fluoreszenz bis zur 8. Minute wesentlich größer ist als zwischen der 8. und 16. Minute.

Diese Beobachtungen werden durch das Ergebnis des Methoden-Vergleiches bestätigt. Der Mittelwert aller 50 Proben ist mit 129  $\mu\text{g/l}$  gegenüber der MATTINGLY-Methode deutlich niedriger. Die Korrektur ist jedoch nicht ausreichend. Der auf mangelnder Spezifität beruhende Anteil ( $L_1 + S_1$ ) am Ähnlichkeitskoeffizienten ist noch größer als der Anteil der zufälligen Streuung der Methoden  $S_2$ .

9. *Methode* (nach MONCLOA). Auch wir fanden bei Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen das eingesetzte Plasmavolumen bei nahezu allen Proben einen positiven Ordinatenabschnitt. Die Annahme von MONCLOA und Mitarbeitern (31), daß dieser Abschnitt der unspezifischen Fluoreszenz entspricht, wurde bereits von DALY und Mitarbeitern (43) kritisiert. Die Größe des Ähnlichkeitskoeffizienten zeigt, daß diese Korrektur nicht zu einer deutlichen Spezifitätsverbesserung führt. Wie auch immer der positive Ordinatenabschnitt zustande kommen mag, ein Maß für die unspezifische Fluoreszenz stellt er nicht dar.

10. *Methode* (PETERSON und Mitarbeiter). Die mit dieser Modifikation der PORTER-SILBER-Methode gewonnenen Meßwerte liegen im Mittel um 30  $\mu\text{g/l}$  oder 26% zu hoch. Obwohl der Anteil unspezifischer Chromogene niedriger ist als der Anteil unspezifischer Fluorogene bei den einfachen fluorometrischen Verfahren (MATTINGLY, DE MOOR), ist der Ähnlichkeitskoeffizient noch groß. Der Anteil der Unspezifität übersteigt den Anteil der Methodenstreuung. Damit können wir die Beobachtungen (7, 44, 45, 46) bestätigen, daß der Anteil unspezifischer Chromogene keineswegs vernachlässigbar klein ist.

### Folgerungen

Von den 10 untersuchten Methoden wiesen 7 eine nach unserer Ansicht ungenügende Spezifität auf (Methode 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10). Die Variabilität des unspezifischen Anteils an der Fluoreszenz läßt eine ausreichende Korrektur der Meßwerte über die Regressionsgerade (Methode-Referenzmethode) nicht zu.

Drei Methoden, nämlich die von GRAEF und STAUDINGER (23), die von CLARK und RUBIN (25) und die von MARTIN und MARTIN (26) haben eine gute Spezifität. Unter ihnen ist die erste unserer Ansicht nach am leichtesten durchzuführen. Sie beinhaltet keine Derivatbildung und weist in dieser Gruppe die beste Präzision auf (Tab. 2). Alle hier untersuchten Methoden können ohne großen technischen Aufwand durchgeführt werden und erfordern keine überdurchschnittliche Geschicklichkeit. Mit den Methoden von CLARK und RUBIN bzw. von GRAEF und STAUDINGER können etwa 20 bis 30 Proben pro Tag analysiert werden.

Besondere Bedeutung kommt der Verwendung spezifischer Methoden im Rahmen von Stressuntersuchungen zu. Hier kommt es zu einem Anstieg verschiedener Lipide im Plasma (47), also gerade der Stoffe, die für die unspezifische Fluoreszenz verantwortlich sind. ALSFELD und NIELSEN (16) sowie GRAEF und STAUDINGER (23) konnten zeigen, daß der unspezifische Anteil unter ACTH-Gabe prozentual stärker zunimmt als die Cortisolkonzentration.

Die Interferenz einiger Medikamente bei der fluorometrischen Cortisolmessung wurde beschrieben (19, 22, 48). Unsere Feststellungen zur Spezifität gelten nur für Proben, in denen nicht mit der Anwesenheit solcher interferierender Medikamente zu rechnen ist. Kommen solche Stoffe vor, so muß geprüft werden, ob die Reinigungsschritte der angewandten Methode diese eliminieren.

## Literatur

1. PIRKE, K. M. und D. STAMM, diese Z. 10, 254 (1972). — 2. PORTER, C. C. und R. H. SILBER, J. biol Chemistry. 185, 201 (1950). — 3. SILBER, R. H. und R. D. BUSH, J. Clin. Endocr., Springfield 15, 505 (1955). — 4. MARKS, L. J. und J. H. LEFTIN, J. Clin. Endocr., Springfield 14, 1263 (1954). — 5. BIERICH, J. R., Endocrinologie, Leipzig 37, 25 (1959). — 6. WIELAND, R. G., St. H. SCHACHNER, F. A. KRUGER, D. E. MAYNARD und G. J. HAMWI, Diabetes 14, 744 (1965). — 7. MIGEON, C. J., A. A. SANDBERG, E. L. BLISS und A. R. KELLER, J. clin. Endocr., Springfield 16, 253 (1956). — 8. PETERSON, R. E., A. KARRER und S. L. GUERRA, Analytic. Chem. 29, 144 (1957). — 9. SWEAT, M. L., Analytic. Chem. 26, 773 (1954). — 10. ZENKER, N. und D. E. BERNSTEIN, J. biol. Chemistry 231, 965 (1958). — 11. SILBER, R. H., R. D. BUSH und R. OSLAPAS, Clin. Chem. (New York) 4, 278 (1958). — 12. GUILLEMIN, R., G. W. CLAYTON, J. D. SMITH und H. S. LIPSCOMB, Endocrinology 63, 349 (1958). — 13. DE MOOR, P., O. STEENO, M. RASKIN und A. HENDRIKX, Acta endocr., K'hvn. 33, 297 (1960). — 14. MATTINGLY, D., J. clin. Path. London 15, 374 (1962). — 15. JAMES, V. H. T., J. TOWNSEND und R. FRASER, J. Endocr. 37, xxviii (1965). — 16. NIELSEN, E. und V. H. ASFELDT, Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 20, 185 (1967). — 17. VAN DER VIES, J., R. F. M. BAKKER und D. DE WIED, Acta endocr., K'hvn. 34, 513 (1960). — 18. HEDNER, P., Acta pharmacol. (K'hvn.) 18, 65 (1961). — 19. VERMEULEN, A. und M. VAN DER STRAETEN, J. Clin. Endocr., Springfield 24, 1188 (1964). — 20. J. VAN DER VIES, J., Acta endocr., K'hvn. 38, 399 (1961). — 21. SMITH, E. K. und C. A. MUEHLBAECHER, Clin. Chem. (New York) 15, 961 (1969). — 22. BRAUNSBURG, H. und V. H. T. JAMES, J. Endocr. 21, 327 (1960). — 23. GRAEF, V. und H. J. STAUDINGER, diese Z. 8, 368 (1970). — 24. FRANKEL, A. I., B. COOK, J. W. GRABER und A. V. NALBANDOV, Endocrinology 80, 181 (1967). — 25. CLARK, B. R. und R. T. RUBIN, Analyt. Biochem. 29, 31 (1969). — 26. MARTIN, M. M. und A. L. A. MARTIN, J. Clin. Endocr., Springfield 28, 137 (1968). — 27. SPENCER-PEET, J., J. R. DALY und V. SMITH, J. Endocr. 31, 235 (1965). — 28. STEWART, C. P., F. ALBERT-RECHT und L. M. OSMAN, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 6, 696 (1961). — 29. STAHL, F. und G. DÖRNER, Acta biol. med. german. 13, 424 (1964). — 30. SPAETHE, R., CH. MINNECKER und H. OTTO, diese Z. 5, 168 (1967). — 31. MONCLOA, F., F. D. PERON und R. I. DORFMAN, Endocrinology 65, 717 (1959). — 32. MATSUMARA, M., A. KUROSAWA und Y. OGAWA, Steroids 9, 537 (1967). — 33. KLUGE, F., A. C. GERB, N. BOSS, R. FAHLBUSCH und P. C. SCRIBA, Klin. Wschr. 48, 929 (1970). — 34. PURVES, H. D. und N. A. SIRETT, Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 47, 589 (1969). — 35. PICHLER, E. Clin. chim. Acta (Amsterdam) 24, 283 (1969). — 36. RUDD, B. T., PH. SAMPSON und B. N. BROOK, J. Endocr. 27, 377 (1963). — 37. HANSERT, E., in Vorbereitung. — 38. IDLER, D. R., N. R. KIMBALL und B. TRUSCOTT, Steroids 8, 865 (1966). — 39. TOWNSEND, J. und V. H. T. JAMES, Steroids 11, 497 (1968). — 40. BRORSON, I., Acta endocr., K'hvn. 58, 445 (1968). — 41. RUDD, B. T., J. M. COWPER und N. CRAWFORD, Clin. chim. Acta, Amsterdam 6, 686 (1961). — 42. STENLAKE, J. B., A. G. DAVIDSON, W. D. WILLIAMS und W. W. DOWNIE, J. Endocrinology 46, 209 (1970). — 43. DAYLY, J. R. und J. SPENCER-PEET, J. Endocr. 30, 255 (1964). — 44. BEITINS, J. Z., M. H. SHAW, A. KOWARSKI und C. J. MIGEON, Steroids 15, 765 (1970). — 45. BAYLISS, R. I. S. und A. W. STEINBECK, Biochem. J. 54, 523 (1953). — 46. BOWMAN, R. E. und R. F. DE LUNA, Analyt. Biochem. 26, 465 (1968). — 47. CARLSON, L. A., L. LEVI und L. ORÖ in L. LEVI „Emotional Stress“ S. Karger, Basel-New York (1967).

Dr. K. M. Pirke  
8000 München 23  
Kraepelinstr. 10