

## Originalarbeiten

Zbl. Gynäk. 99 (1977) 821–829

Aus der Zentralen Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik  
(Leiter: Doz. Dr. rer. nat. habil. M. B ü c h n e r) und der Frauenklinik  
(Leiter: Doz. Dr. med. habil. M. W o r m)  
des Bezirkskrankenhauses Dresden-Friedrichstadt  
(Ärztlicher Direktor: OMR Prof. Dr. sc. med. O. G ü n t h e r)

### **Eine spezifische, radioimmunologische Bestimmung des Plasmaöstradiols ohne Chromatographie im Zyklus und in der Schwangerschaft und die Bestimmung des freien, nichtproteingebundenen Anteils mittels Dialyse**

Von E. Freymann, W. Hubl, M. Büchner und H. Belleé

Mit 4 Abbildungen

**Zusammenfassung:** Es wird eine einfache radioimmunologische Methode ohne Chromatographie zur Bestimmung des Östradiols im Plasma beschrieben. Das verwendete Antiserum gegen  $17\beta$ -Östradiol-6-(0-carboxy-methyloxim): Rinderserumalbumin wies eine ausreichend hohe Spezifität gegenüber Östradiol auf. Die Nachweisgrenze der Methode beträgt 2,6 pg Östradiol. Es wurde ein Variationskoeffizient von 5,9% und eine mittlere Wiederfindung von  $93,0 \pm 3,2\%$  ermittelt. Im Menstruationszyklus nimmt das Östradiol im Plasma Werte von 30 pg/ml bis 300 pg/ml an. Beim anovulatorischen Zyklus steigt die Östradiolkonzentration nicht über 70 pg/ml. Der freie, nichtproteingebundene Anteil erreicht Werte von 2,0 bis 2,5% im normalen und anovulatorischen Zyklus. Die Östradiolkonzentration steigt in der Schwangerschaft ständig bis zu durchschnittlich 16 ng/ml. Der prozentuale freie Anteil verringert sich (bis zur 24. Woche) von 2,3% auf 1,2%, so daß das biologisch wirksame Östradiol nur etwa halb so schnell ansteigt wie das Gesamtöstradiol.

**Summary:** The plasma concentrations of estradiol were measured by radioimmunoassay without chromatography. The antibody against estradiol was produced in rabbits immunized with  $17\beta$ -estra-diol-6-(0-carboxymethyloxime): bovine-serum-albumin. The lower limit of quantitation is 2.6 pg estradiol. A coefficient of variation of 5.9% was ascertained. The recovery of this method is 93% in the range of 89.8 to 95.2%. The concentrations of estradiol during the menstrual cycle are from 30 pg/ml to 300 pg/ml. Estradiol levels during the anovulatory cycle were found below 70 pg/ml. Similar values (2.0 to 2.5%) of percent of unbound estradiol in normal and anovulatory cycle were calculated. The concentrations of estradiol increase in pregnancy on an average of 16 ng/ml. The percentage of free estradiol decreases (up to the 24 weeks of pregnancy) from 2.3% to 1.2%.

Auf Grund der überaus hohen Empfindlichkeit, Spezifität und einfachen Handhabung wird heute der Radioimmunoassay als beste Methode zur Bestimmung des Östradiols im Plasma für Klinik und Forschung angesehen.

Die radioimmunologische Bestimmung des unkonjugierten Östradiols ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden [1, 3, 5 bis 7, 10, 15, 23].

Die meisten veröffentlichten Untersuchungen benötigen wegen der ungenügenden Spezifität ihrer Antiseren eine säulenchromatographische Isolierung des Östradiols.

Das durch die Immunisierung von Kaninchen mit  $17\beta$ -Östradiol-6-(0-carboxymethyl-oxim):RSA erzeugte relativ spezifische Antiserum ermöglicht im Frauenplasma eine un-

Zbl. Gynäk. 6'

mittelbare Bestimmung sofort nach der Extraktion, wie auch in neueren Arbeiten beschrieben wurde [8, 12, 14, 22]. D o e r r und Mitarb. [8] geben eine radioimmunologische Bestimmung des Östradiols im Plasma von Männern ohne Chromatographie an. Obwohl sie ein auf gleiche Weise gewonnenes, spezifisches Antiserum verwenden, müssen in diesem Fall Reinigungsschritte der Bestimmung vorgeschaltet werden.

97% bis 99% des unkonjugierten Östradiols ist an Protein gebunden. Unser besonderes Interesse galt dem freien, nichtproteingebundenen Östradiol im Zyklus und in der Schwangerschaft, da dieser Anteil die biologisch aktive Fraktion repräsentiert.

#### Methodik

17 $\beta$ -Östradiol-6-(0-carboxymethyloxim):RSA (Steraloids, Inc.) wurde mit Freund-schem Adjuvans emulgiert und über 6 Wochen einmal wöchentlich und anschließend 2mal 14tägig eine Injektion intragluteal jeweils 3 Kaninchen appliziert. Nach insgesamt 11 Wochen wurden die Kaninchen entblutet und das gewonnene Antiserum in 0,2 ml Portionen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### Reagentien

Äther. p. a.: destilliert;

(2, 4, 6, 7- $^3\text{H}$ )-Östradiol 114 Ci/mMol (New England Nuclear): 60 nCi/ml.

Puffer: 9 g NaCl, 1 g  $\text{NaN}_3$ , 1 g bzw. 5 g Gelatine, 5,34 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  und 10,86 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  in 1000 ml destilliertem Wasser lösen und pH 7 einstellen.

Aktivkohle-Dextran-Suspension: 500 mg Aktivkohle (BDH-England) und 50 mg Dextran (BDH-England) in 100 ml Phosphatpuffer suspendieren.

Szintillator: 6 g PPO und 0,4 g POPOP in 10 ml Äthanol und 1000 ml Toluol lösen.

#### Bestimmungsmethode

Das Fließschema der Östradiolbestimmung im Plasma ist in Abbildung 1 dargestellt.

Die Menge des zu untersuchenden Plasmavolumens richtet sich nach der zu erwartenden Östradiolkonzentration. So verringert sich gegen Ende der Schwangerschaft das erforderliche Plasmavolumen für eine Dreifachbestimmung auf 0,05 ml.

Zur Kontrolle der Bestimmung werden folgende Werte mitgeführt:

Wert der 100% - Bindung: 0,1 ml Östradiol-Tracerlösung (60 nCi/ml) werden unmittelbar in die Szintillationsküvette pipettiert.

Leerwert: Wasser wird anstelle des Plasmas wie im Analysengang beschrieben behandelt.

Wert der Adsorptionseffektivität (WAE): Anstelle der Antiserumverdünnung wird 0,1 ml Phosphatpuffer verwendet und wie im Analysengang beschrieben behandelt. Der WAE gibt Auskunft über die Adsorptionsfähigkeit der Tierkohle-Dextran-Suspension und ist somit ein Maß für die Vollständigkeit der Trennung frei/gebunden beim RIA.

#### Referenzmethode

Die Referenzmethode unterscheidet sich von der beschriebenen Östradiolbestimmung durch die vorgeschaltete Isolierung des Östradiols mit Hilfe einer Sephadex-LH-20-Säule [10].

#### Gleichgewichtsdialyse und die Bestimmung des freien, nicht-eiweißgebundenen Östradiols

Das nicht an Eiweiß gebundene Östradiol ist als der biologisch wirksame Anteil des Hormons für klinische Fragestellungen besonders interessant. Es wurde mit Hilfe der Dialyse nach Angaben von R i v a r o l a [16] bestimmt.

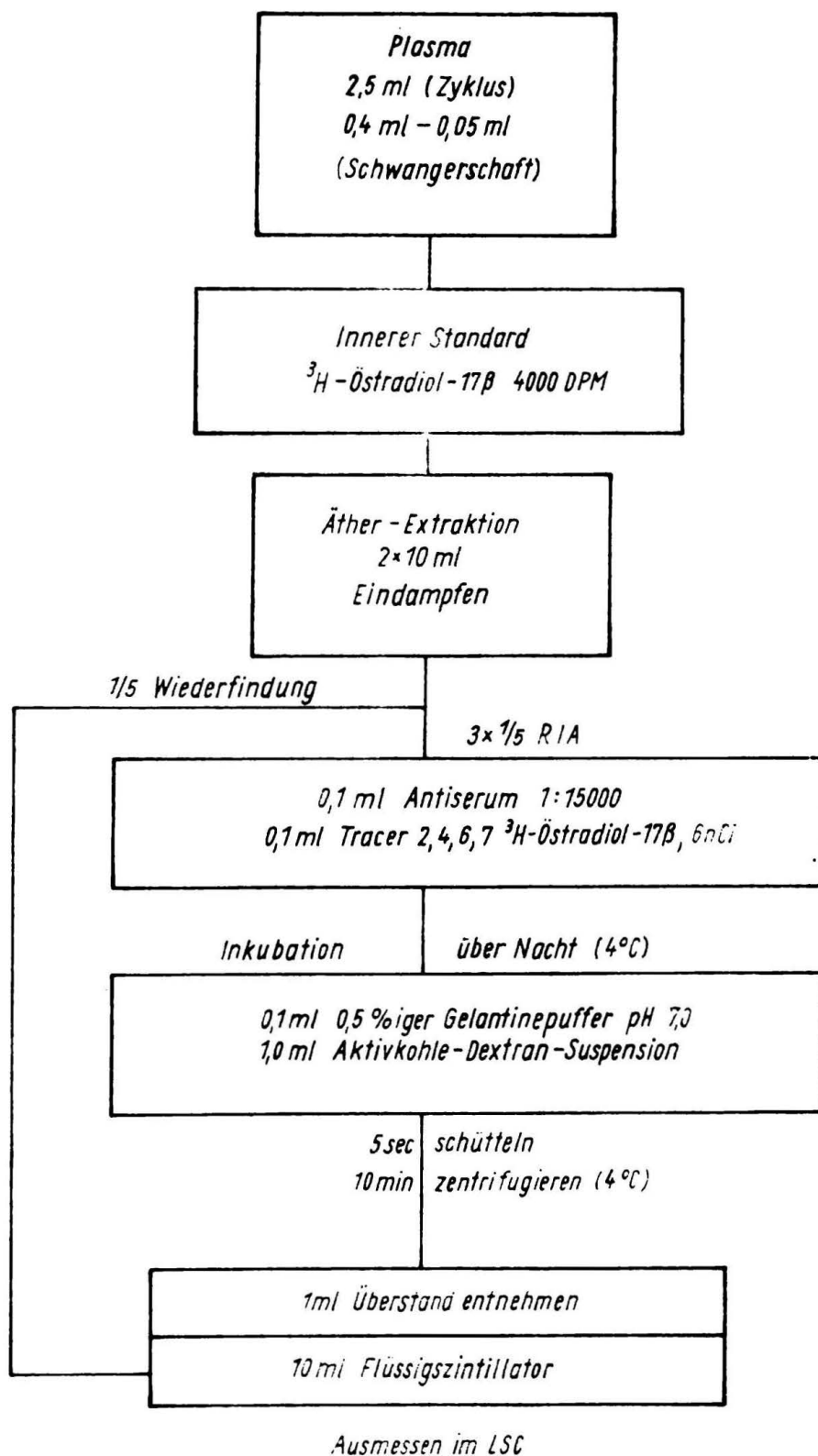


Abb. 1. Fließschema der Methode

2 ml eines 1 : 5 mit Puffer verdünnten Plasmas werden unter ständigem Schütteln über Nacht bei 37 °C gegen 20 ml Puffer dialysiert, dem 50 nCi <sup>3</sup>H-Östradiol und ein Tropfen Merthiolat (20 mg/ml) hinzugegeben wurden. Nach 20 Stunden werden aus der Plasmaverdünnung und der äußeren Phase je 1 ml entnommen, diese mit 10 ml Szin-

tillator versetzt und die Impulse im Flüssigkeitsszintillationsmeßplatz ausgemessen. Das freie Hormon wird berechnet nach der Formel:

$$\frac{\text{DPM}_{\text{äußere Phase}} \cdot \text{Vol}_{\text{innen}}}{\text{DPM}_{\text{innere Phase}} \cdot \text{Vol}_{\text{außen}}} \cdot 100 \% [16].$$

### Ergebnisse

#### Charakterisierung des Antiserums

Es wurde der Titer der 3 Antisera bestimmt, der bei gleichen Immunisierungsbedingungen für die einzelnen Kaninchensera erhebliche Unterschiede aufweist.

Er beträgt für Kaninchen I  $AS_I = 1 : 4500$ ,  
 Kaninchen II  $AS_{II} = 1 : 2600$  und  
 Kaninchen III  $AS_{III} = 1 : 9000$ .

#### Affinität

Die Affinität eines Hormons zu seinem Bindungsprotein wird charakterisiert durch die Affinitätskonstante, die nach Abraham und Odell [2] bestimmt wurde.

Bei einer Antiserumverdünnung von 1 : 4500 ( $AS_I$ ), 1 : 2600 ( $AS_{II}$ ) bzw. 1 : 9000 ( $AS_{III}$ ), einer Tracerkonzentration von 10 nCi vierfachmarkierten Östradiols und 4 °C Inkubationstemperatur ergeben sich Affinitätskonstanten für

$$\begin{aligned} AS_I : K_A &= 1,89 \cdot 10^9 \text{ l/Mol} \\ AS_{II} : K_A &= 1,20 \cdot 10^9 \text{ l/Mol} \\ AS_{III} : K_A &= 2,24 \cdot 10^9 \text{ l/Mol}. \end{aligned}$$

Auf Grund des hohen Titers und der höchsten Affinitätskonstanten wurde das Antiserum  $AS_{III}$  für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.

#### Spezifität des Antiserums

Die Spezifität des Antiserums  $AS_{III}$  wurde durch Kreuzreaktionen zu den Östrogenen und einigen anderen Steroiden getestet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle I dargestellt.

Tabelle I. Spezifität: Kreuzreaktion von verschiedenen Steroiden mit dem Anti-17 $\beta$ -Östradiol-6-(0-carboxymethyloxim): RSA; Serum III

| Steroid                                | Kreuzreaktion |
|--|---------------|
| Östradiol-17 $\beta$ .....             | 100,0%        |
| Östron .....                           | 6,2%          |
| Östradiol-17 $\alpha$ .....            | 2,6%          |
| Äthinyl-Östradiol-17 $\beta$ .....     | 1,1%          |
| Östriol .....                          | 0,5%          |
| Östriol-16 $\alpha$ -17 $\alpha$ ..... | 0,5%          |
| Testosteron .....                      | < 0,1%        |
| Progesteron .....                      | < 0,1%        |
| Cortisol .....                         | < 0,1%        |

Die nichtöstrogenen Steroide stören den Östradiolradioimmunoassay erst in einem über 1000fachen Überschuß.

Östron zeigt die stärkste Kreuzreaktion und weist eine vergleichbar hohe Konzentration wie das Östradiol im Plasma während Zyklus und Schwangerschaft auf.

#### Vergleich der Methoden mit und ohne Chromatographie

Bei 16 Proben wurde mit der Referenzmethode das Östradiol im Plasma von schwangeren Frauen parallel zur Bestimmung ohne Chromatographie bestimmt. Das Ergebnis wurde in Tabelle II zusammengefaßt.

Tabelle II. Vergleich der Mittelwerte „mit“ und „ohne“ Chromatographie

|           | Referenzmethode mit Chromatographie | Methode ohne Chromatographie |
|-----------|-------------------------------------|------------------------------|
| $\bar{x}$ | 13,9 ng/ml                          | 14,8 ng/ml                   |
| s         | $\pm 0,68$ ng/ml                    | $\pm 0,91$ ng/ml             |
| VK        | 4,9 %                               | 6,2 %                        |
| n         | 16                                  | 16                           |

Zuverlässigkeitskriterien

Präzision

Die Präzision wurde aus 22 3fach-Bestimmungen einer Serie ermittelt. Im Konzentrationsbereich zwischen 2,9 ng/ml und 21,8 ng/ml ergab sich eine Standardabweichung von 0,71 ng/ml und ein mittlerer Variationskoeffizient von 5,9% ( $\bar{x} = 12,1$  ng/ml).

Wiederfindung

Zu Beginn der Östradiolbestimmung wird im Plasma eine relativ geringe Menge tritiummarkiertes Östradiol zugegeben, woraus nach der Extraktion der Verlust berechnet und in jedem Fall der aus der Eichkurve erhaltene Wert auf 100% korrigiert werden kann.

Der Verlust nach 2maliger Extraktion mit je 10 ml Äther beträgt  $7,0 \pm 3,2\%$ .

Nachweisgrenze

Als kleinste nachweisbare Konzentration wurde ein Wert von 2,6 pg Östradiol berechnet [13].

Freies und proteingebundenes Östradiol während des Menstruationszyklus

Im Rahmen der Zyklusdiagnostik wurde die Östradiolkonzentration bei biphasischen ( $n = 8$ ) und anovulatorischen ( $n = 3$ ) Zyklen bestimmt, und in Abbildung 2 wurden die Mittelwerte gegenübergestellt.

Parallel wurde LH (RIA-mat®-LH, Byk Mallinckrodt) bestimmt, das präovulatorisch um das 4fache durchschnittlich auf 40 mIE/ml steil ansteigt. Bereits 2 Tage vor der Ovulation steigt die Konzentration des Östradiols auf Werte um  $260 \pm 30$  pg/ml, um dann im Verlauf von 4 Tagen wieder auf Werte um  $90 \pm 18$  pg/ml abzusinken. In der lutealen Phase erreicht die Östradiolkonzentration noch einmal ein Maximum mit Werten um  $140 \pm 20$  pg/ml.

Die im anovulatorischen Zyklus auftretenden Konzentrationsschwankungen des Östradiols sind wesentlich geringer als im ovulatorischen Zyklus. Es fehlt ebenfalls der scharf ausgeprägte LH-Peak im mittleren Teil des Zyklus. Während das gesamte Östradiol im normalen Zyklus Werte von 30 pg/ml bis 300 pg/ml erreichte, stieg die Östradiolkonzentration im anovulatorischen Zyklus nicht über 70 pg/ml.

Der freie Anteil des Östradiols schwankt sowohl während des ovulatorischen als auch anovulatorischen Zyklus zwischen 1,8% und 2,8%.

Der prozentuale Anteil des freien Östradiols beim anovulatorischen Zyklus erscheint etwas höher als beim ovulatorischen Zyklus. Ebenso ist eine Tendenz in der Veränderung des freien Östradiolanteils im Verlauf des Zyklus erkennbar (Tab. III).

Freies und proteingebundenes Östradiol in der Schwangerschaft

Die in Abbildung 3 dargestellten Werte von der 7. bis 37. Woche für normale Schwangerschaften zeigen besonders gegen Ende der Schwangerschaft eine relativ große Schwankungsbreite.

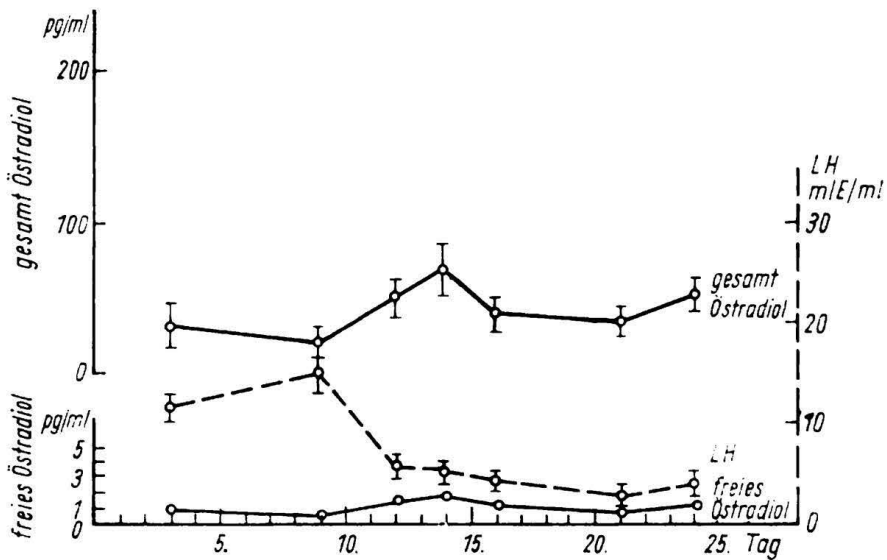
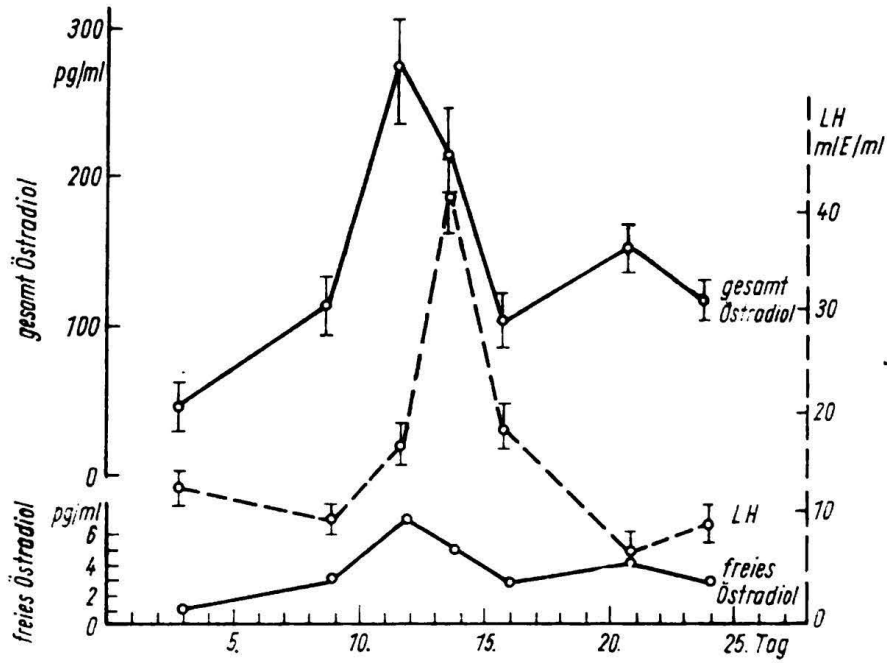


Abb. 2. Östradiol- und LH-Werte von Frauen mit normalen (n = 8; oben) und anovulatorischen (n = 3) Zyklen

Tabelle III. Gegenüberstellung des prozentualen Anteils des freien nichtproteingebundenen Östradiols im ovulatorischen und anovulatorischen Zyklus

| Zyklustag | Ovulatorisch<br>%-frei | Anovulatorisch<br>%-frei |
|-----------|------------------------|--------------------------|
| 2 bis 8   | 2,4 ± 0,4              | 2,3 ± 0,2                |
| 9 bis 15  | 2,3 ± 0,3              | 2,5 ± 0,3                |
| 16 bis 20 | 2,2 ± 0,3              | 2,3 ± 0,2                |
| 21 bis 24 | 2,0 ± 0,2              | 2,1 ± 0,2                |
|           | n = 8                  | n = 3                    |

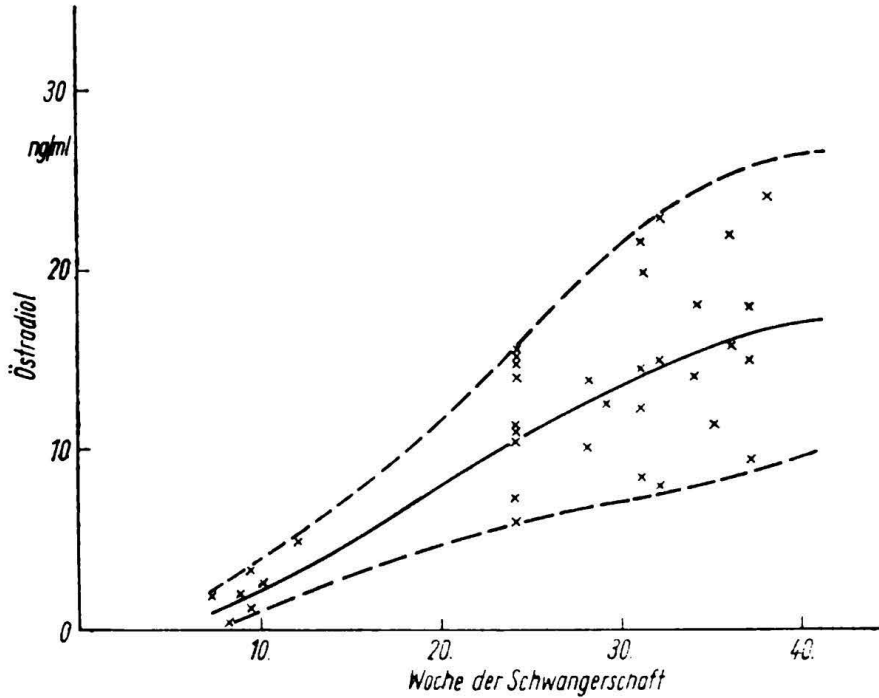


Abb. 3. Plasma-Östradiolwerte in der Schwangerschaft (n = 36)

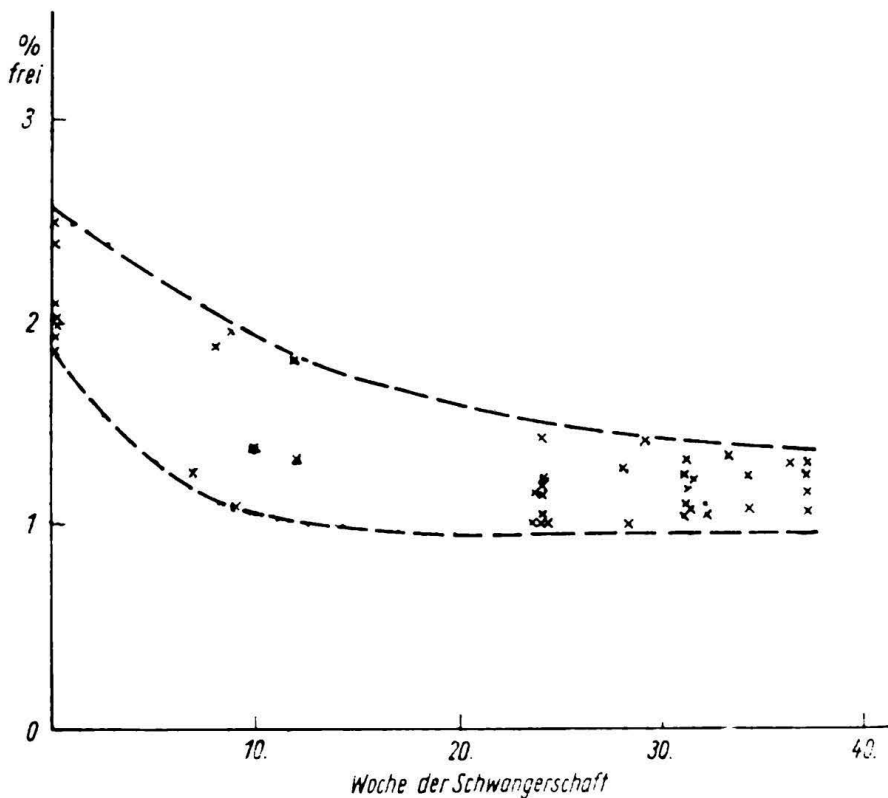


Abb. 4. Der freie, nichteiweißgebundene Östradiolanteil in der Schwangerschaft (n = 43)

In der 7. bis 9. Schwangerschaftswoche wurden Östradiolwerte von 0,2 ng/ml bis 2,5 ng pro ml gefunden. Gegen Ende der Schwangerschaft (32. bis 37. Woche) lagen die Östradiolkonzentrationen im Mittel bei  $16 \pm 7$  ng/ml. Der freie Anteil des Östradiols (Abb. 4) fällt von durchschnittlich 2,3% während des Zyklus bis zu 1,2% in der 24. Schwangerschaftswoche ab, um dann konstant bei 1,2% bis zum Geburtstermin zu bleiben.

Die Östradiolkonzentration steigt vom Beginn bis zum Ende der Schwangerschaft um ungefähr das 100fache an. Der freie Anteil verringert sich nur etwa um die Hälfte, so daß das biologisch wirksame Östradiol um etwa das 50fache ansteigt.

#### Diskussion

Mit dem beschriebenen Verfahren kann Östradiol relativ spezifisch, einfach und mit wenig Probematerial im Zyklus und in der Schwangerschaft bestimmt werden.

Einige veröffentlichte Östradiol-RIA [1, 3, 5 bis 7, 10, 15, 23] schließen einen chromatographischen Schritt ein, der auf Grund der nicht genügenden Spezifität des Antiserums gegenüber Östron und anderen Östrogenen erforderlich ist. Das im Kaninchen durch Immunisierung mit 17- $\beta$ -Östradiol-6-(0-carboxymethyloxim):RSA gewonnene Antiserum weist eine ausreichend hohe Spezifität auf, so daß auf eine chromatographische Isolierung des Östradiols verzichtet werden kann.

Die in neueren Arbeiten [5, 8, 11, 12, 14, 22] mit dem gleichen Antigen präparierten Antisera weisen in ihrer Spezifität und in ihrem Titer vergleichbare Eigenschaften auf.

Der durch Dialyse in vitro bestimmte freie Anteil des Östradiols ist als eine Näherungsgröße aufzufassen.

Die Resultate des gesamten Östradiols im Plasma im Menstruationszyklus sind mit den Angaben anderer Autoren in Einklang zu bringen [3, 7, 17, 18].

Für die Beschreibung des Menstruationszyklus wurde das LH als Bezugsgröße für den Zeitpunkt der Ovulation gesetzt. Baird und Guevara [4] äußern die Vermutung, daß eine bestimmte kritische Östradiolkonzentration den LH-Peak und somit die Ovulation auslöst. Somit wäre auch zu erklären, daß eine gehemmte Östradiolproduktion bei einem anovulatorischen Zyklus für das Ausbleiben der Ovulation verantwortlich ist. Von den Östrogenen ist bekannt, daß sie die Bildung des Sexualhormon bindenden Globulins (SHBG) stimulieren. Auf Grund der relativ großen physiologischen Streuungen des prozentual freien Östradiols konnten keine statistischen Unterschiede errechnet werden. Bei der Betrachtung der Mittelwerte jedoch sind Unterschiede der Proteinbindung während des normalen Zyklus und im Vergleich zum anovulatorischen Zyklus erkennbar.

Tulchinsky [19] untersuchte den prozentualen Anteil des freien Östradiols nur in der Lutealphase und fand geringfügig niedrigere Werte.

Die ermittelten Analyseergebnisse für das gesamte Östradiol im Plasma in der Schwangerschaft stimmen mit denen von Tulchinsky und Korenman [21] sehr gut überein.

De Hertogh und Mitarb. [9] sowie Cohen und Cohen [6] fanden gegen Ende der Schwangerschaft etwa 10 ng/ml höhere Werte. Die große Schwankungsbreite der Östradiolkonzentration im Plasma am Ende der Schwangerschaft wurde von allen Autoren in gleicher Weise bestätigt.

Tulchinsky und Chopra [20] beobachteten zu Beginn der Schwangerschaft bei der Verdoppelung der Östradiolkonzentration auch eine Verdoppelung der SHBG-Konzentration im Plasma. Eine weitere Erhöhung des Serumöstradiols war mit einer geringeren SHBG-Zunahme begleitet.

Bis zum Ende der Schwangerschaft erhöht sich das gesamte Östradiol auf etwa das 100fache, die SHBG-Konzentration dagegen nur um etwa das 6fache.

Die maximale SHBG-Konzentration wird bereits nach dem I. Trimester erreicht, während das Östradiol bis zum Ende der Schwangerschaft kontinuierlich ansteigt. Das stimmt mit den von uns gefundenen Ergebnissen des freien Östradiols in der Schwangerschaft überein. Es zeigte sich ein signifikanter Abfall des prozentualen Anteils des freien Östradiols im Verlauf des I. Trimesters der Schwangerschaft. Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft blieb der prozentuale freie Anteil konstant.

Die dargestellten Ergebnisse bestätigen, daß das relativ einfache und spezifische Verfahren zur Bestimmung des freien und unkonjugierten Östradiols für das klinisch-chemische Laboratorium geeignet ist.

Die Autoren möchten Herrn Dr. W. Rohde (Institut für experimentelle Endokrinologie der Charité Berlin) für die Herstellung der Antisera vielmals danken.



## S c h r i f t t u m

1. Abraham, G. E.: Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 $\beta$ . *J. clin. Endocr.* 29 (1969) 866 bis 870.
2. Abraham, G. E., und W. D. Odell: Solid-phase radioimmunoassay of serum estradiol-17 $\beta$  a semi-automated approach. In: F. G. Peron und B. V. Caldwell, *Immunologic methods in steroid-determination*. Copyright C 1970 by Meredith Corporation, pp. 87–112.
3. Abraham, G. E., E. D. Odell, R. S. Swerdloff und K. Hopper: Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 $\beta$  during the menstrual cycle. *J. clin. Endocr.* 34 (1972) 312–318.
4. Baird, D. T., und A. Guevara: *J. clin. Endocr.* 29 (1969) 149.
5. Cameron, E. H. D., und D. A. Jones: Some observations on the measurement of estradiol-17 $\beta$  in human plasma by radioimmunoassay. *Steroids* 20 (1972) 737–759.
6. Cohen, M., und H. Cohen: A radioimmunoassay for plasma unconjugated estrogens in normal pregnancy. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 118 (1974) 200–209.
7. De Hertogh, R.: Radioimmunoassay of estrone and estradiol-17 $\beta$  in peripheral plasma of pregnant and nonpregnant women. *J. Steroid Biochem.* 4 (1973) 75–84.
8. Doerr, P., R. Goebel und E. Kuss: Specific radioimmunological determination without chromatography plasma estradiol in males. *Acta endocr. (Kbh.)* 73 (1973) 314–320.
9. De Hertogh, R., K. Thomas, Y. Bietlot, I. Vanderheyden und J. Ferin: Plasma levels of unconjugated estrone, estradiol and estriol and of HCS throughout pregnancy normal women. *J. clin. Endocr.* 40 (1975) 93–101.
10. Emmert, L., W. P. Collins und L. F. Sommerville: Radioimmunoassay of oestrone and oestradiol in human plasma. *Acta endocr. (Kbh.)* 69 (1972) 567–582.
11. Jeffcoate, S. L., und J. E. Searle: Estradiol-17 $\beta$  coupled to protein through the B-ring. *Steroids* 19 (1972) 181–187.
12. Jurjens, H., J. J. Pratt und M. G. Woldring: Radioimmunoassay of plasma estradiol without extraction and chromatography. *J. clin. Endocr.* 40 (1975) 19–25.
13. Kaiser, H.: *Z. analyt. Chem.* 206 (1965) 1.
14. Kushinsky, S., und M. Anderson: A non-chromatographic radioimmunoassay of estrone and estradiol-17 $\beta$  in Serum. *Steroids* 23 (1974) 535–548.
15. Mikhail, G., C. H. Wu, M. Ferin und R. L. Van de Wiele: Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol. *Steroids* 15 (1970) 333–352.
16. Rivarola, M. A., M. G. Forest und C. J. Migeon: *J. clin. Endocr.* 28 (1968) 34.
17. Sherman, B. M., und S. G. Korenman: Measurement of plasma LH, FSH, estradiol and progesterone in disorders of the human menstrual cycle: the short luteal phase. *J. clin. Endocr.* 38 (1974) 89–93.
18. Sommerville, B. W.: Daily variation in plasma levels of progesterone and estradiol through the menstrual cycle. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 3 (1971) 419–426.
19. Tulchinsky, D.: Placental secretion of unconjugated estrone, estradiol and estriol into the maternal and the fetal circulation. *J. clin. Endocr.* 36 (1973) 1079–1087.
20. Tulchinsky, D., und I. J. Chopra: Competitive ligand-binding assay for measurement of sex-hormone-binding-globulin (SHBG). *J. clin. Endocr.* 37 (1973) 873–881.
21. Tulchinsky, D., und S. G. Korenman: The plasma estradiol as an index of fetoplacental function. *J. clin. Invest.* 50 (1971) 1490–1497.
22. Verdonck, L., und A. Vermeulen: Comparison of quick method for the estimation of estradiol in plasma by radioimmunoassay. *J. Steroid Biochem.* 5 (1974) 471–479.
23. Wu, C.-H., und L. E. Lundy: Radioimmunoassay of plasma estrogens. *Steroids* 18 (1971) 91–111.

Anschr. d. Verf.: Dipl.-Chem. E. Freymann, Zentrallaboratorium des Bezirkskrankenhauses Friedrichstadt, DDR-801 Dresden, Friedrichstr. 41

## S c h l ü s s e l w ö r t e r :

Endokrinologische Gynäkologie. — Radioimmunologische Diagnostik. — Plasmaöstradiolbestimmung.