

Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie

5. Jahrgang

Juli 1967

Heft 4 (S. 153—220)

Das Muster der neutralen 17-Ketosteroide des Harns aufgrund der Dünnschichtchromatographie

Herrn Professor Dr. med. J. KÜHNAU zum 65. Geburtstag gewidmet

Von F. DETTER, W. KOLLMEIER und V. KLINGMÜLLER

Aus dem Klinisch-chemischen Institut, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. V. Klingmüller)

(Eingegangen am 25. Juli 1966)

Zur Bestimmung der neutralen 17-Ketosteroide des Harnes wurde eine semiquantitative Dünnschichtchromatographie entwickelt. Der Harn wurde nach heißer Säurehydrolyse mit Äther extrahiert und mit Methylenechlorid/Äthylacetat (100 : 5 v/v) auf Kieselgel G siebenmal rechromatographiert. Dabei konnten bis zu 8 einzelne Verbindungen identifiziert werden. In Recovery-Versuchen war der Verlust an 17-Ketosteroiden gering. Das Ausscheidungsmuster verschiedener klinischer Fälle war diagnostisch gut verwertbar und entsprach den Erfahrungen mit anderen Fraktionierungsverfahren.

A semiquantitative thin layer chromatographic method has been developed for the neutral 17-ketosteroids of human urine. The urine is acidified, hydrolysed by heating, extracted with ethyl ether, and rechromatographed seven times on Kieselgel G with methylene chloride/ethyl acetate (100 : 5 v/v). In this way, 8 single compounds could be identified. The loss of 17-ketosteroids in recovery tests was low. The excretion patterns of different clinical cases were suitable for diagnosis, and in good agreement with those found with other fractionation methods.

Während bislang die Meinung überwog, daß die neutralen 17-Ketosteroide des Harns beim gesunden Mann zu $\frac{1}{3}$ dem Steroidstoffwechsel des Hodens und zu etwa $\frac{2}{3}$ dem der Nebennierenrinde entstammen, gibt OERTEL (1) an, daß das Verhältnis mehr zugunsten der Nebennierenrinde verschoben ist. Bei der gesunden Frau ist die Nebennierenrinde wesentliche Quelle der 17-Ketosteroide, kaum das Ovar; bei der Schwangeren kommt noch die Placenta hinzu. Auch bei Kindern und Säuglingen können schon kleinere Mengen von 17-Ketosteroiden nachgewiesen werden; das ist besonders eindrucksvoll beim angeborenen adrenogenitalen Syndrom.

Eine pathologische Vermehrung findet man bei Erkrankungen und Syndromen wie der *Pubertas praecox*, Nebennierenrindentumoren, Hirsutismus, Virilismus, *Morbus Cushing*, bestimmten Hodentumoren, Akromegalie, Gravidität und bei der Stimulierung der Nebennierenrinde. Die Ausscheidung kann vermindert sein bei Nebennierenrindeninsuffizienz, *Morbus Addison*, Eunuchoidismus, hypophysärem Infantilismus, *Dystrophia adiposogenitalis*, Gynäkomastie, Myxödem, *Diabetes mellitus*, chronischem Hunger, schweren chronischen Erkrankungen, Leberparenchymschädigungen, *Waterhouse-Fridrichsen-Syndrom* usw. Das Ausscheidungsmuster der einzelnen Substanzen kann aber, vor allem nach den Erfahrungen mit der Säulenchromatographie (1—4) völlig verschieden sein, Unterschiede, die diagnostisch sehr wichtig sein können. Weil solche Methoden aber sehr kompliziert sind, wurde versucht, die mikrochemische Gesamtbestimmung nach ZIMMERMANN (4) mit ihrer quantitativen Aussage durch semiquantitative

Dünnschichtchromatographie einzelner Substanzen zu komplettieren. Dieses Vorgehen hat sich schon bei der Oestrogen-Diagnostik bewährt ((5, 6) u. a.).

Methodik

Reagenzien und Lösungen

Sie wurden aus analysereinen Präparaten hergestellt. — Die Zuverlässigkeit des 24-Stdn.-Sammelharns wurde wie üblich mit der Bestimmung der Chlorid- und Kreatininausscheidung überprüft. Konnte der Urin nicht sofort bearbeitet werden, wurde er nach Zusatz von konz. Salzsäure bei pH 3—4 im Kühlschrank aufbewahrt.

Heiße Säurehydrolyse

10 ml Harn wurden mit 3 ml 10-proz. Salzsäure 20 Min. lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Durch Zusatz von 1 ml 10-proz. Kupfersulfatlösung wurde die Bildung störender Harnpigmente, die zum Teil erst bei der Hydrolyse entstehen, weitgehend ausgeschaltet.

Extraktion und Reinigung

Das Hydrolysat wurde in einem Scheidetrichter mit 30 ml Äther 1—2 Min. ausgeschüttelt. Der Ätherextrakt wurde etwa 1 Min. mit 15 ml 10-proz. NaOH und dreimal mit je etwa 20 ml Wasser ausgeschüttelt, um alles Alkali völlig zu entfernen; danach wurde in einem 100 ml Rundkolben bei 40° in einem Vakuum-Rotationsverdampfer eingedampft. Eventuell zurückgebliebenes Wasser wurde durch Zugabe einiger ml eines Benzol/Äthanol-Gemisches (1 : 1 v/v) durch nochmaliges Eindampfen entfernt und der Rückstand in 0,5 ml abs. Äthanol aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie

50 g Kieselgel G wurden mit 100 ml Wasser verrührt und auf 200 × 200 mm große Glasplatten in einer Schichtdicke von 250 μ ausgestrichen. Nach kurzem Antrocknen in Luft wurden die Platten 30 Min. bei 110° aktiviert (7, 12). 15 mm vom unteren Rand wurden die Testsubstanzen und die Harnextrakte in verschiedenen Konzentrationen mit einer AGLA-Mikrometerspritze und Warm-

luft aufgetragen (8). Aus den aufgetragenen Mikrolitern und den Volumenverhältnissen bei der Aufarbeitung wurde aufgrund des Vergleichs mit der Testsubstanz die Tagesausscheidung berechnet. Zur Trennung wurden Glaskammern mit Filterpapier ausgeschlagen und mit etwa 100 ml Fließmittelgemisch aus Äthylacetat/Methylenchlorid (5 : 100 v/v) beschickt; die Kammern wurden vor der Chromatographie durch Umschwenken gesättigt. Um eine optimale Trennung, besonders von Androsteron und Dehydroepiandrosteron zu erreichen, ließen wir das Fließmittel bis 8 mal je etwa 15 cm hoch in je etwa 35 Min. ansteigen, nachdem die Platten dazwischen an der Luft getrocknet waren. Nach der letzten Lufttrocknung wurden die Platten mit 30-proz. Phosphorsäure besprüht, etwa 10 Min. bei 110° erhitzt, danach mit 10-proz. alkoholischer Molybdätophosphorsäure nochmals besprüht und wiederum bei 110° erhitzt, bis die einzelnen Steroide deutlich als schwarzblaue Flecken sichtbar wurden. Das durch das Sprühmittel gelb gewordene Absorptionsmittel konnte durch Ammoniakdämpfe etwas aufgehellt werden; die Intensität der Steroidflecken blieb dabei konstant.

Ergebnisse und Diskussion

Der Schwerpunkt des methodischen Teiles dieser Arbeit lag darin, das geeignete Elutionsmittel für die Auftrennung der Gesamt-17-Ketosteroidfraktion in die angegebenen Einzelfractionen zu finden. Die für die Steroide üblichen, bei mehreren Autoren (1, 2, 4, 9, 10) angeführten Laufmittel hatten nur teilweise vollständige Trennungen hervorgerufen. Aus den angeführten R_F -Werttabellen der Laufmittelzusammensetzungen war hervorgegangen, daß sich die R_F -Werte für Androsteron und Dehydroepiandrosteron kaum unterscheiden. Da aber normalerweise Androsteron, Dehydroepiandrosteron und Ätiocholanolon quantitativ am meisten ausgeschieden werden, war ihre Trennung besonders wichtig. Mit einmaligem Laufen eine vollständige Trennung zu erreichen, zeigte sich uns als nicht durchführbar. Bei den Elutionsmitteln Äthanol, Chloroform, Aceton, Benzol, Methanol, Petroläther und Äthylacetat wanderten die Substanzen zwar schnell, trennten sich aber schlecht. Auf der anderen Seite zeigte Methylenchlorid einen guten Trenneffekt, aber mit zu geringer Wanderungsgeschwindigkeit, so daß die Chromatographie mehrmals wiederholt werden mußte. Unter den mit Methylenchlorid kombinierten Laufmitteln bewährte sich Äthylacetat besonders. In der Mischung von 100 Volumenteilen Methylenchlorid und 5 Teilen Äthylacetat wurde die Trennwirkung des Methylenchlorids annähernd beibehalten, die Laufzahl aber beträchtlich reduziert. Bei achtmaliger Rechromatographie konnten alle Substanzen eindeutig getrennt werden. Der dabei gültige R_F -Wert wurde mit $R_{F(8 \times)}$ bezeichnet und ist das Verhältnis aus der Wegstrecke der Steroide zur gesamten Wegstrecke der Lösungsmittelfront bei achtfacher Rechromatographie: Androstendion ist z. B. insgesamt 12 cm gewandert, während die Lösungsmittelfront achtmal je 15 cm = 120 cm hoch lief; also ist sein $R_{F(8 \times)}$ 0,100 (Tab. 1). Die 11-Hydroxy-17-ketosteroide, wie 11 β -Hydroxyandrosteron und 11 β -Hydroxyaetiocholanolon zeigten einschränkend bei größeren Substanzmengen oder bei zu starkem Ausfließen im Auftragspunkt keine klare Trennung; sie liefen oft als längliche Flecken, die nur in der Mitte mehr oder weniger eingeschnürt waren,

ineinander über; dies hatte praktisch kaum Bedeutung, da diese 17-Ketosteroide in den meisten hier untersuchten Harnen nicht nachweisbar waren (Abb. 1). Eine eindeutige Trennung dieser Fractionen kann unter Verzicht der Auswertung der schnell laufenden Substanzen erreicht werden, wenn man noch öfter rechromatographiert. Die Farbtintensität nach Besprühen mit Molybdätophosphorsäure war für die einzelnen Substanzen verschieden. Man konnte die semiquantitative Auswertung darum nicht auf eine einzige mitchromatographierte Testsubstanz beziehen; es wurden alle Testsubstanzen als Gemisch mitchromatographiert (Abb. 1).

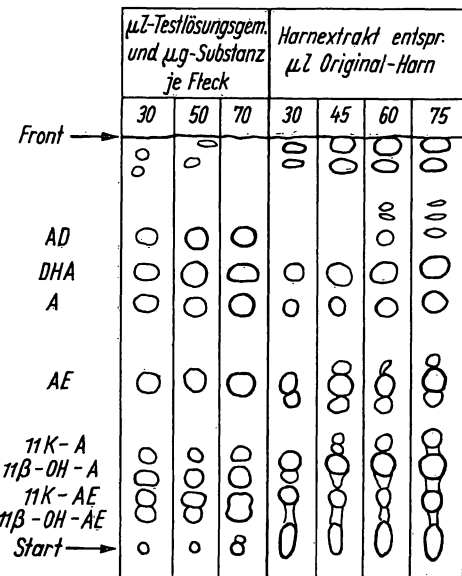


Abb. 1

Dünnschichtchromatographie eines Testgemisches von 8 verschiedenen 17-Ketosteroiden (Tab. 1) und eines Patienten-Harnes (vgl. Tab. 2, Nr. 333); 8-fach rechromatographiert

Tab. 1

$R_{F(8 \times)}$ -Werte der 17-Ketosteroide bei 8-maliger Rechromatographie; Fließmittel: Äthylacetat/Methylenchlorid (5:100 v/v)

17-Ketosteroid	$R_{F(8 \times)}$ -Wert
Androstendion (AD)	0,100
Dehydroepiandrosteron (DHA)	0,090
Androsteron (A)	0,081
Aetiocholanolon (AE)	0,069
11-Ketoandrosteron (11K-A)	0,035
11 β -Hydroxyandrosteron (11 β -OH-A)	0,026
11-Ketoaetiocholanolon (11K-AE)	0,018
11 β -Hydroxyaetiocholanolon (11 β -OH-AE)	0,012

Als Recovery-Versuch wurden 10 ml normaler Urin mit 15 μ g Dehydroepiandrosteron versetzt, wie üblich hydrolysiert, aufgearbeitet und chromatographiert; im visuellen Vergleich mit der mitchromatographierten Testsubstanz war praktisch kein Verlust aufgetreten. In dieser Form war also eine gute Ausbeute erreicht, verglichen mit der von OERTEL (1), der beispielsweise $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{5}$ der Substanz als Schwund angibt. Die Kunstprodukte, die bei der Säurehydrolyse anfallen können, stören bei der angegebenen Art der Chromatographie nicht. Wenn man die einzelnen, mit halbquantitativer Dünnschichtchromatographie im Harn bestimmten 17-Ketosteroide aufaddiert, erhält man von 6 Bestimmungen 75 bis 100%, im Mittel 85% der nach ZIMMERMANN (3, 4) mikroche-

Tab. 2

Ausscheidungsmuster der neutralen 17-Ketosteroide; Dünnschichtchromatographie, halbquantitative Auswertung; Angabe in mg/Tag und in Klammern in % der ZIMMERMANN-Bestimmung

Diagnose (Fall Nr.)	Alter Geschl.	17-Ketosteroide in mg/Tag	Dehydroepiandrosteron	Androsteron	Aetiocholanolon	11-Keto-aetiocholanolon	11-Keto-androsteron	11 β -Hydroxyandrosteron	11 β -Hydroxyaetiocholanolon	Summe der Einzelsubstanzen	Aetiocholanolon zu Androsteron
Cushing-Syndrom (333)	27 J. männl.	27	5,6 (21%)	4,2 (16%)	9,7 (36%)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	2,6 (9,6%)	0,0 (0%)	22,1 (82%)	2,2
NNR-Hyperplasie; 2 Tage n. 80 I. E. ACTH (396)	25 J. männl.	30	6,5 (22%)	10 (33%)	8,0 (26%)	1,5 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	26,0 (86%)	0,8
NNR-Hyperplasie (416)	28 J. männl.	30,6	10 (33%)	7,5 (25%)	7,5 (25%)	0,5 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	25,5 (85%)	1,0
NNR-Carcinom (1405)	37 J. männl.	82,5	30 (36,1%)	16,2 (19,5%)	20 (24%)	0 (0%)	2 (2,4%)	0 (0%)	0 (0%)	68,2 (82%)	1,2
Ovarialinsuffizienz (1415)	31 J. weibl.	27,5	9,6 (38,2%)	6,3 (25,4%)	7,3 (29,2%)	0 (0%)	1,8 (7,3%)	0 (0%)	0 (0%)	25,0 (100%)	1,1
Hodentumor links Nierentumor links Lungenmetastasen (1140)	17 J. männl.	7,8	0 (0%)	2,7 (34,7%)	2,7 (34,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0,2 (2,7%)	0,2 (2,7%)	5,8 (75%)	1,0

misch erhaltenen Gesamt-17-Ketosteroide. Das stimmt mit anderen Untersuchungen (1) überein. Androstendion wurde, wie auch von VAN DEN WIELE und Mitarbeitern (11) in keinem der Harnen nachgewiesen. Ferner waren die Mengenverhältnisse der Stoffe in den 6 zur Untersuchung gelangten Harnen verschieden (Tab. 2).

Zur Differentialdiagnose kann außerdem nach LIM und Mitarbeitern (13) das Verhältnis Aetiocholanolon zu Androsteron ausgewertet werden; es liegt in der Regel zwischen 1,0 und 1,4. Bei dem Fall mit Cushing-Syndrom (Nr. 333) war der Quotient mit 2,2 stark erhöht; ebenfalls die Gesamtcorticoide mit 41,2 mg/Tag. Bei einer Nebennierenrindenhyperplasie, die klinisch mit einem Cushing-Syndrom einherging und histologisch als kleines Adenom mit Hyperplasie der Reticularis diagnostiziert wurde, wurden 33% Dehydroepiandrosteron und 24% Aetiocholanolon ausgeschieden. Bei einem faustgroßen Nebennierenrindentumor (Nr. 1405) mit Cushing-Syndrom, der histologisch ein Carcinom war, war Dehydroepiandrosteron auch bei unserem Fall Hauptausscheidungsprodukt; es war also wesentlich für die vermehrte Ausscheidung der 17-Ketosteroide verantwortlich. Die Ovarialinsuffizienz mit Cyclusstörung (Nr. 1415) ergab mit der erhöhten Tagesgesamtausscheidung (27,5 mg/Tag) eine markante Vermehrung der Dehydroepiandro-

steron-Ausscheidung von 37%; nach einer Abrasio fand sich histologisch eine Schleimhautatrophie; auch alle übrigen mituntersuchten Hormone waren erniedrigt: Gesamtcorticoide mit 2,7 mg/Tag; Oestrogene 25 μ g/Tag; Pregnandiol 0,4 mg/Tag (14), follikelstimulierendes Hormon 30 Einh./Tag. Im Gegensatz dazu konnte Dehydroepiandrosteron bei dem untersuchten Hodentumor (Nr. 1140) hier nicht erfaßt werden, dafür aber 11 β -Hydroxyandrosteron und 11 β -Hydroxyaetiocholanolon. Die histologische Untersuchung des halbseitig kastrierten Hodens zeigte, daß es sich um ein z. T. adenomatös, z. T. papillär und z. T. solide gewachsenes verkrebtes embryonales Teratomgewebe handelte. Die „Nebennierenrindenhyperplasie“ (Nr. 396) hatte nach ACTH-Stimulierung das niedrigste Aetiocholanolon/Androsteron-Verhältnis mit 0,8; die Gesamtcorticoide waren mit 36 mg/Tag stark erhöht; sie stiegen am Untersuchungstag infolge der ACTH-Belastung auf 52,2 mg/Tag an und gingen bis auf 72 mg/Tag hinauf.

Die Arbeit wurde mit Mitteln und Geräten der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür hier sehr gedankt sei. Einige Testsubstanzen verdanken wir den Firmen Schering A. G., Berlin und Organon GmbH, München. Herrn Dipl.-Chem. K. DROLL danken wir für die methodische Diskussion, ferner Herrn E. FAUTH und Fräulein A. GRAF für ihre zuverlässige experimentelle Mitarbeit.

Literatur

- OERTEL, G. W., „Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Harn“; Springer-Verlag, Heidelberg, 1964; S. 39, S. 57. — 2. NEHER, R., Steroid Chromatography; sec. ed.; Elsevier Publ. Co. Amsterdam, 1964. — 3. HAENEL, U., W. SCHNEIDER und HJ. STAUDINGER, Dtsch. med. Wschr. 87, 2481 (1962). — 4. ZIMMERMANN, W., Chemische Bestimmung von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten; Springer-Verlag, Berlin 1955. — 5. DETTER, F., J. DIETRICH und V. KLINGMÜLLER, Klin. Wschr. 44, 100 (1966). — 6. SCHMIDT, H. und Z. STARCEVIC, Klin. Wschr. 43, 1271 (1965). — 7. STAHL, E., Dünnschichtchromatographie; ein Laboratoriums-
- handbuch, Springer-Verlag, Heidelberg, 1962. — 8. WALDI, D., Ergebn. Labor.-Med. 2, 155 (1965). — 9. REISERT, P. M. und D. SCHUMACHER, Experientia 19, 84 (1963). — 10. STARKA, L., J. SULCOVA, J. RIEDLOVA und O. ADAMEC, Clin. Chim. Acta 9, 118 (1964). — 11. VAN DE WIELE, R. L., P. C. MAC DONALD und S. LIEBERMAN, J. clin. endocrin. 22, 1207, 1222, 1229 (1962). — 12. RANDEATH, K., Dünnschichtchromatographie; Verlag Chemie, Weinheim, 1962. — 13. LIM, N. Y., K. W. FESLER und F. J. DINGMAN, J. Clin. Endocrinol. Metabol. 24, 68 (1964). — 14. DETTER, F. und V. KLINGMÜLLER, Unveröffentl. Verss.

Prof. Dr. Dr. V. Klingmüller
68 Mannheim, Postfach 23