

Gaschromatographische Bestimmung von Pregnandiol, Pregnantriol und Pregnantriolon im Urin

Von H.-CH. CURTIUS

Technische Assistenz: M. MÜLLER

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universitäts-Kinderklinik Zürich (Direktor: Prof. Dr. A. Prader)

(Eingegangen am 8. September 1965)

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von Pregnandiol, Pregnantriol und Pregnantriolon im Urin beschrieben. Die Methode besteht in der enzymatischen Hydrolyse der Steroidkonjugate mit Glucuronidase, der Extraktion und Reinigung der Extrakte und der Gaschromatographie der Steroide als Trimethylsilyläther. Durch Zumischen von Testsubstanzen zu Urin wurde die Ausbeute und die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft. Die Resultate stimmen mit den Ergebnissen der konventionellen Analyseverfahren anderer Autoren überein. Die Empfindlichkeit pro Probe liegt im Nanogrammbereich.

A method is described for the gas chromatographic determination of urinary pregnanediol, pregnanetriol and pregnanetriolone. The method entails the enzymic hydrolysis of the steroid conjugates with glucuronidase, extraction and purification of the extracts and gas chromatography of the steroids as their trimethylsilyl ethers. The yield and reproducibility of the method were tested by the addition of test materials to urine. The results were in complete agreement with those obtained by other authors with conventional analytical techniques. The sensitivity per sample is in the order of nanograms.

Die Progesteron-Metaboliten Pregnandiol, Pregnantriol und Pregnantriolon werden im Urin als Konjugate, und zwar hauptsächlich als Glucuronide ausgeschieden. Ihre quantitative Bestimmung setzt daher eine hydrolytische Spaltung in Steroid- und Glucuronsäure voraus. Dazu stehen im wesentlichen zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die hydrolytische Spaltung durch β -Glucuronidase oder Ketodase (1) oder die Spaltung durch Solvolyse (2). — Beide Methoden wurden für Forschungs- und klinische Zwecke intensiv angewendet. Die anschließende Identifizierung und quantitative Bestimmung der einzelnen Steroide gestaltete sich für die Routine im Klinik-Laboratorium mühsam und zeitraubend. Meist lagen den Methoden säulen-, papier- oder dünn-schichtchromatographische Verfahren zugrunde (3—7). Sie erlaubten zum Teil nur eine semiquantitative Erfassung. Diese Nachteile wurden trotz der großen klinischen Bedeutung der Steroidanalysen in Kauf genommen.

Nachdem wiederholt (8—11) gezeigt worden ist, daß sich die Steroidhormone ohne Zersetzung gaschromatographieren lassen, und nachdem sich verschiedene Arbeiten mit der qualitativen und quantitativen Gaschromatographie dieser Verbindungen im biologischen Material befaßt hatten (12—15), erschien es uns wünschenswert, eine für den *klinischen Routinebetrieb* geeignete Methode für die quantitative Bestimmung von Pregnandiol, Pregnantriol und Pregnantriolon mittels Gaschromatographie auszuarbeiten.

Methodik

Geräte

„F 20“ Fraktometer der Fa. Perkin-Elmer mit Flammenionisationsdetektor
XE 60 Chromatographiesäule von 2 m Länge und 2,7 mm \varnothing
Hamilton Mikrospritzen 10 μ l, auf 0,1 μ l graduert
Thermostatisiertes Wasserbad
Wärmeschrank
Exsikkator mit P₂O₅ als Trocknungsmittel.

Chemikalien

Trimethylchlorsilan, z. B. Fluka, Art.-Nr. A 57998
Hexamethyldisilazan, z. B. Fluka, Art.-Nr. 54429
Aceton, z. B. Fluka, Art.-Nr. A 50045
Äthanol, z. B. Fluka, Art.-Nr. A 50231 puriss.
Äther, z. B. Fluka, Art.-Nr. A 52689 puriss.
Hexan, z. B. Merck, Art.-Nr. 9688
Methylenchlorid, z. B. Fluka, Art.-Nr. A 55634
Toluol, z. B. Merck, Art.-Nr. 98325
Natriumcarbonat, z. B. Merck, Art.-Nr. 6392
Pregnandiol, z. B. Calbiochem, Art.-Nr. 529853
Pregnantriol, z. B. Merck, Art.-Nr. 8968
Pregnantriolon, z. B. Merck, Art.-Nr. 8969
Allo-Pregnandiol, z. B. Merck, Art.-Nr. 8955
Androsteron, z. B. Merck, Art.-Nr. 8958
Etiocholanolon, z. B. Calbiochem, Art.-Nr. 341294
Dehydroepiandrosteron, z. B. Calbiochem, Art.-Nr. 254098
Pregnanolon, z. B. Sigma, pfs
 β -Glucuronidase, Sigma, Art.-Nr. 105-8/Type I (aus Bakterien)
Natriumhydroxyd, z. B. Merck, Art.-Nr. 6496
Natriumsulfat, z. B. Merck, Art.-Nr. 6649
Kalium-Dihydrogenphosphat, z. B. Merck, Art.-Nr. 4873.

Reagenzien

Standardlösungen: Je 10 mg Pregnandiol, Pregnantriol und Pregnantriolon jeweils in Äthanol ad 100 ml.

Testgemisch: Je 10 mg Pregnandiol, Allo-Pregnandiol, Pregnantriol, Pregnantriolon, Androsteron, Etiocholanolon, Dehydroepiandrosteron, Pregnanolon in Äthanol ad 100 ml.

Innerer Standard: 10 mg Pregnanolon in Äthanol ad 100 ml.

Silylierungsgemisch: Mischung von 3 ml Hexamethyldisilazan + 0,1 ml Trimethylchlorsilan (kühl und verschlossen aufbewahren, jeden 2. Tag frisch ansetzen.)

Phosphatpuffer: pH 6,2; 0,5 m; 500 ml 1,0 m KH₂PO₄ (136,0 g KH₂PO₄, H₂O ad 1000 ml) + 100—150 ml 2 n NaOH auf pH 6,2 einstellen, H₂O ad 1000 ml.

Sodalösg. 2 n: 106,0 g Na₂CO₃; H₂O ad 1000 ml.

Vorgehen

Die inneren Standards werden durch den ganzen Analysegang geführt.

Hydrolyse

a) mit Salzsäure

Diese Vorschrift hält sich im wesentlichen an die Methode von KLOPPER (16). 2 ml Pregnanolon-Lösg. werden in einem Rundkolben zur Trockene eingedampft. Nacheinander werden 25 ml Urin und 20 ml Toluol zugegeben und zum Sieden erhitzt. Nach Zusatz von 2,5 ml konz. Salzsäure wird 10 Min. am Rückfluß gekocht. Die Lösung wird dann auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Extraktion

Das Hydrolysat wird 3 mal mit 25 ml Toluol extrahiert, die vereinigten Extrakte 2 mal mit 2 n Sodalösung ausgeschüttelt und anschließend 5 mal mit je 20 ml aqua dest. neutral gewaschen. Die organische Phase wird nun mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Aceton aufgenommen, in ein kleines Röhrchen überführt und zuerst am Vakuum und nachher im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

b) mit β -Glucuronidase

Vorschrift nach R. E. PETERSON (17): Zu 2 ml in einem Rundkolben getrockneter Pregnanolon-Lösg. werden 25 ml Urin gegeben und auf pH 6,2 eingestellt. Nach Zugabe von 5 ml Phosphatpuffer und 2500 Einheiten β -Glucuronidase wird das Gemisch für 48 Std. in den Wärmeschrank gestellt. Bakterielle Zersetzung kann durch 3 Tropfen Chloroform vermieden werden.

Extraktion

Nach 3-maliger Extraktion des Hydrolysats mit 25 ml Äther werden die vereinigten Extrakte zuerst 2 mal mit etwa 20 ml 2 n Sodalösg. und nachher 5 mal mit 20 ml aqua dest. ausgeschüttelt. Die organische Phase muß neutral sein. Dann wird der Äther mit Natriumsulfat getrocknet und am Vakuum eingedampft. Den Rückstand überführt man mit wenig Aceton in ein kleines Reagenzglas, dampft wiederum ab und trocknet im Exsikkator über P_2O_5 .

Silylierung

Die getrockneten Proben werden in 0,5 ml Silylierungsgemisch gelöst und in einem mit Schliffstopfen verschlossenen Röhrchen 1 Std. in einen Wärmeschrank von 60° gestellt. Das überschüssige Silylierungsgemisch wird anschließend bei etwa 40° mit absolut getrocknetem Stickstoff abgedampft (reinsten Stickstoff wird durch mehrere Waschflaschen mit konz. H_2SO_4 geleitet). Den Rückstand nimmt man in 0,1 ml absolutem Hexan auf. Diese Lösung wird anschließend gaschromatographiert. Wegen der großen Empfindlichkeit gegen Luftfeuchtigkeit ist die Lösung *nicht* lange haltbar.

Trennsäulenbedingungen

Säule: XE 60, 2 m, 3% auf Gaschrom P; \varnothing : 2,7 mm, Kolonnentemperatur: 225°, $x = 16$
Einspritzblocktemperatur: 275° (Abb. 1) bzw. 285° (Abb. 3—5).
Stickstoff: 40 ml/Min.

Berechnung

Bei substanzeigenem innerem Standard errechnet sich die Konzentration der gesuchten Substanz nach der folgenden Formel:

$$\text{Stoff i (in Gew.-%)} = \frac{100 \cdot F_i \cdot z_i}{\left(\frac{F_x^I}{F_x^{II}} \cdot F_{zi} - F_i \right) (100 - z_i)}$$

F_{zi} = Fläche des Berges i nach Zusatz von z% des Stoffes i zum Gemisch bei der Analyse II

F_i = Fläche des Berges i ohne Zusatz bei der Analyse I

z_i = Gew.-% Zusatz des Stoffes i als Gew.-% Gehalt des neu-entstandenen Gemisches, das gleich 100 gesetzt wird

F_x^I = Bergfläche eines beliebigen unbeeinflussbaren Berges x bei der Analyse I

F_x^{II} = Bergfläche des gleichen Berges x bei der Analyse II.

Wenn kein Pregnanolon in der Analyse zu erwarten ist, kann das Ergebnis nach folgender abgekürzten Formel errechnet werden:

$$\text{mg \% x} = \frac{\text{mg \% St} \cdot F_x}{F_{St}} \cdot F$$

mg % St = Konzentration des inneren Standards (Pregnanolon)

F_x = Peakfläche der gesuchten Substanz

F_{St} = Peakfläche des inneren Standards (Pregnanolon)

F = Umrechnungsfaktor (= Fläche Pregnanolon/Fläche gesuchte Substanz bei gleichen Konzentrationen).

In der Praxis hat sich die Auswertung mit Hilfe einer graphischen Eichkurve bewährt. An Hand von Eichlösungen mit konstantem innerem Standard, mit denen der ganze Analysengang durchgeführt wird, errechnet man einen Faktor (f): $f = \frac{F_x}{F_{St}}$. Auf der Abszisse trägt man die eingesetzte Menge, auf der Ordinate den errechneten Faktor f ab. In einem Chromatogramm mit unbekanntem Mengen bestimmt man den Faktor f und liest auf der Eichkurve ab. — Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch Ausmessen als Höhe mal Breite in 15 und 85% der Höhe.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt ein Testchromatogramm von 8 verschiedenen Steroiden als Silyläther.

Aus der Darstellung geht hervor, daß die einzelnen Steroide sehr gut voneinander trennbar sind. In Tabelle 1 sind die Retentionszeiten dieser 8 Steroide bei den oben beschriebenen Kolonnenbedingungen angegeben.

Tab. 1
Relative Retentionszeiten bezogen auf Cholestan

Cholestan	= 1,00 (8 Min.)
Allo-Pregnanolol	= 0,77
Pregnanolol	= 0,88
Androsteron	= 0,96
Etiocholanolon	= 1,16
Dehydroepiandrosteron	= 1,34
Pregnantriol	= 1,57
Pregnantriolon	= 1,88
Pregnantriolon	= 4,24

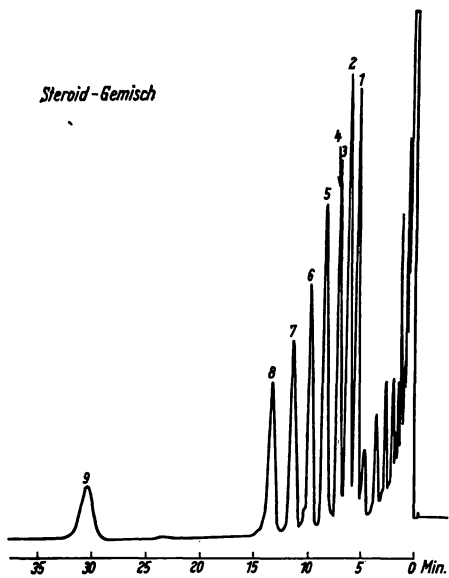


Abb. 1

Gaschromatogramm der Silyläther von Steroiden

- 1 = Allopregnan diol
- 2 = Pregnan diol
- 3 = Androsteron
- 4 = Cholestan
- 5 = Etiocholanolon
- 6 = Dehydroepiandrosteron
- 7 = Pregnan olon
- 8 = Pregnan triol
- 9 = Pregnan triolon

Trennbedingungen siehe Text; eingesetzt: 2 µl

In Abbildung 2 ist eine Konzentrationsreihe von 100 bis 1000 µg pro Probe Pregnan diol, Pregnan triol und Pregnan triolon dargestellt. Der alkoholischen Lösung der Testsubstanzen wurde wie unter 1b beschrieben einerseits Urin und andererseits Wasser zugemischt und durch den gesamten Analysengang geführt. Die graphische Darstellung zeigt, daß die Ausbeute annähernd 100% beträgt und daß eine lineare Beziehung zwischen Peakfläche und Konzentration besteht.

Abbildung 3 zeigt die Gaschromatogramme des gleichen Urins unter gleichen Bedingungen und mit gleicher Menge Ausgangsmaterial, links nach salzsaurer Hydrolyse und rechts nach Hydrolyse mit β-Glucuronidase.

Aus der Abbildung geht hervor, daß durch die salzsaure Hydrolyse Pregnan triol und Pregnan triolon weitgehend zerstört werden. Außer der Hydrolyse ist auch das verwendete Extraktionsmittel von großer Bedeutung. In Abbildung 4 sind die Gaschromatogramme mit verschiedenen Extraktionsmitteln bei gleicher Menge Ausgangsmaterial und unter gleichen Bedingungen dargestellt. Die Extraktion mit Toluol ist nicht quantitativ, besser eignet sich Methylchlorid, die besten Resultate wurden jedoch mit Äther erzielt.

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu prüfen, wurden 5 Proben desselben Patientenurins analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

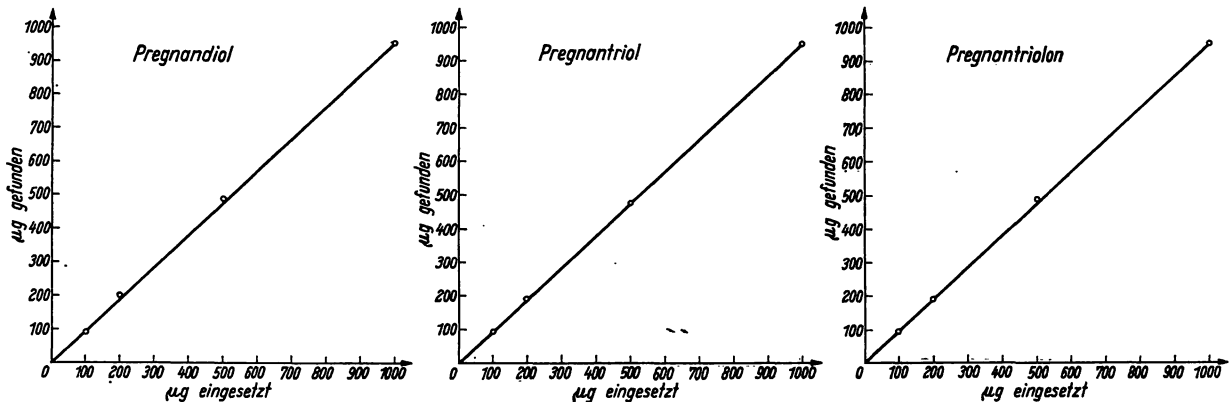


Abb. 2

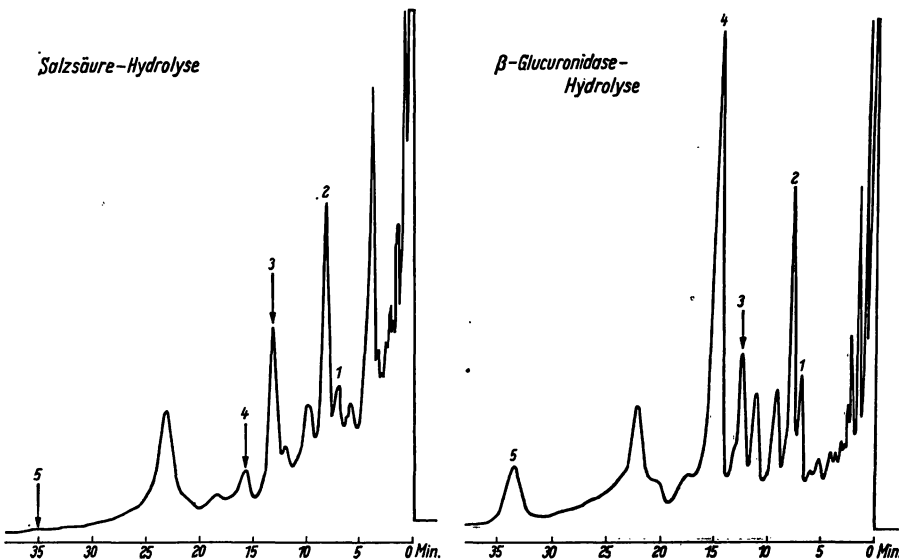


Abb. 3

Einfluß der Hydrolyse-Bedingungen auf die Gaschromatogramme von Steroiden

Links: salzsaure Hydrolyse
rechts: enzymatische Hydrolyse

- 1 = Pregnan diol
- 2 = Androsteron
- 3 = Pregnan olon (Inn. Standard)
- 4 = Pregnan triol Trennbedingungen siehe Text; eingesetzt: links: 1 µl; rechts: 0,7 µl
- 5 = Pregnan triolon

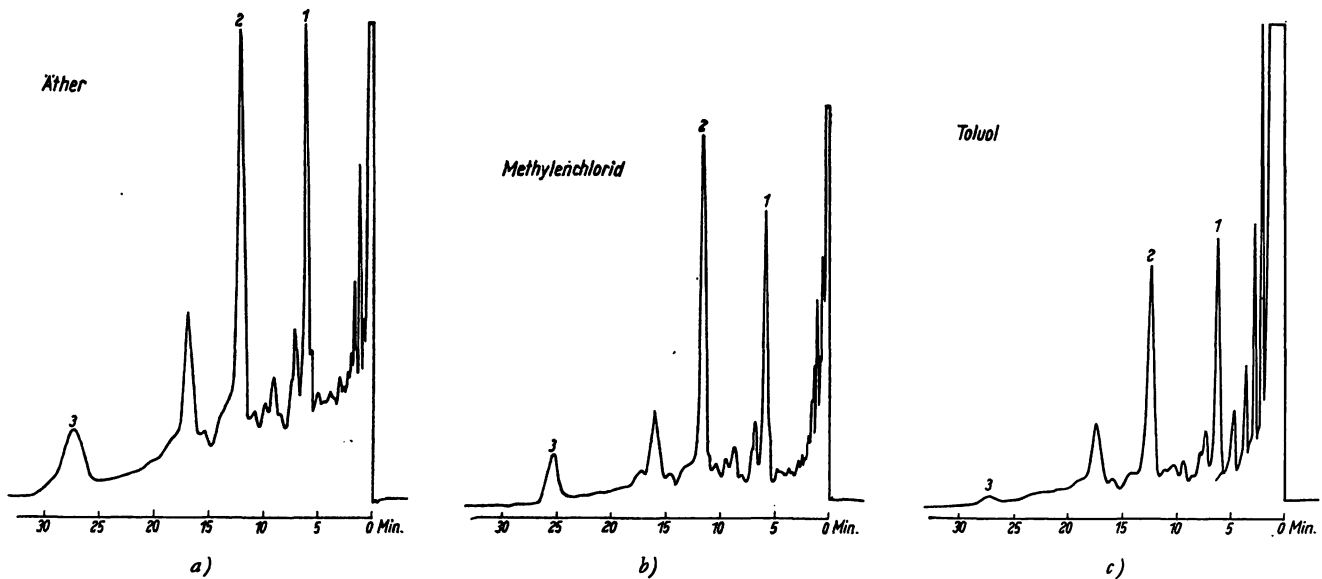


Abb. 4

Einfluß der Extraktionsmittel auf die Gaschromatogramme von Steroiden

1 = Androsteron
2 = Pregnantriol3 = Pregnantriolon. Trennbedingungen siehe Text;
eingesetzt: a) 0,5 μ l, b) 0,4 μ l, c) 0,2 μ l.Tab. 2
Prüfung der Reproduzierbarkeit der Methode an einem Urin
(adrenogenitales Syndrom) Werte in μ g%

	Pregnan diol	Pregnantriol	Pregnantriolon
1.	180	2640	1150
2.	160	2560	940
3.	180	2640	940
4.	220	2840	1160
5.	200	2880	1000
Arith. Mittel:	188 \pm 18	2712 \pm 118	1038 \pm 74

In Tabelle 3 sind die Analysen-Ergebnisse verschiedener Patientenerine aufgeführt.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird eine gaschromatographische quantitative Methode beschrieben, die sich anstelle der bisher verwendeten konventionellen Methoden für die routinemäßige Bestimmung der Progesteron-Metaboliten eignet.

In der letzten Zeit haben sich verschiedene Autoren mit der Gaschromatographie von Steroiden in biologischem Material beschäftigt. So beschreiben FRANCE und Mitarbeiter die Bestimmung von Androsteron, Etiocholanolon und Dehydroepiandrosteron im Urin als Silyl-äther (14), WOTIZ und Mitarbeiter die Bestimmung von Pregnan diol im Urin mit Hilfe der Acetate (12), und in neuerer Zeit berichten HAMMOND und LEACH (15) in

Tab. 3
Gaschromatographisch bestimmte Gehalte in 24-Stdn.-Harnen von Patienten. Werte in μ g% bzw. in (mg/24-Stdn.-Harn)

Name	Geschlecht	Alter i. J.	Pregnan diol	Pregnantriol	Pregnantriolon
<i>Unbehandeltes kongenitales adrenogenitales Syndrom</i>					
M. K.	♀	16	1920 (16,32)	6800 (57,80)	2300 (19,65)
K. P.	♀	13	188 (2,20)	2712 (32,50)	1038 (12,40)
H. J.	♂	6	400 (1,60)	4500 (18,00)	800 (3,20)
P. S.	♂	5	160 (1,17)	4000 (29,20)	300 (2,19)
S. M.	♀	1	50 —	2000 (2,40)	700 (0,84)
S. T.	♂	0,1	50 —	200 (1,10)	240 (1,30)
S. H.	♀	0,1	— —	80 (0,19)	60 (0,14)
<i>Behandeltes kongenitales adrenogenitales Syndrom</i>					
B. E.	♂	14	— —	660 (7,26)	280 (3,08)
B. E.	♂	11	50 —	400 (4,60)	50 —
F. B.	♀	7	160 (1,05)	1340 (8,78)	1740 (11,40)
M. I.	♀	6	140 (0,78)	1680 (9,41)	500 (2,80)
<i>Nichtbestätigter Verdacht auf adrenogenitales Syndrom</i>					
H. L.	♀	12	— —	160 (0,72)	— —
C. A.	♂	0,1	— —	60 (0,30)	— —
F. R.	♂	0,1	— —	50 —	< 50 —

einer Kurzmitteilung über die Gaschromatographie von Progesteron-Metaboliten. — Die gaschromatographische Methode ist den konventionellen Methoden, wie z. B. Papier-, Dünnschicht- und Kolonnen-Chromatographie, in verschiedener Hinsicht überlegen. So ist eine quantitative Bestimmung im Nanogrammbereich möglich. Die Methode ist auch viel weniger zeitraubend und spezifischer als die konventionellen Trennungs- und Nachweismethoden (3—7).

Die Aufarbeitung des Urins — Hydrolyse und Extraktion — wurde nach den bekannten und vielgebrauchten Verfahren durchgeführt. Bei unserem Analysengang erübrigte sich eine weitere Reinigung mittels Kolonnen- oder präparativer Dünnschichtchromatographie. Anschließende gaschromatographische Analysen eignen sich sehr gut, verschiedene Hydrolyse- und Extraktionsverfahren zu prüfen. So kann auf Grund der gezeigten Resultate die salzsaure Hydrolyse *nicht* mehr empfohlen werden, da sie die empfindlicheren Steroidmoleküle zerstört. Vor allem tritt beim Pregnantriol und Pregnantriolon Zersetzung ein; Pregnanliol hingegen übersteht sie ohne Verluste. Für die Progesteron-Metabolite ist deshalb die *enzymatische Hydrolyse* mit Glucuronidase die Methode der Wahl. Andere Konjugate als Glucuronide treten bei diesen Verbindungen nur in zu vernachlässigenden Konzentrationen auf.

Die Verwendung verschiedener Extraktionsmittel zeigte, daß unpolare Lösungsmittel, wie z. B. Toluol für die Extraktion ungeeignet sind und daß Äther die besten Resultate liefert.

Zur Entfernung der Oestrogene verwendeten wir 2 *n* Sodalösg., da mit Natronlauge Zersetzungen entstehen. Wichtig ist, daß die ätherische Phase anschließend vollkommen neutral gewaschen wird. Spuren von Alkali, die

im Analysengang mitgeführt werden, können bei der Injektion in den Gaschromatographen im Einspritzblock Zersetzung der Analysensubstanz hervorrufen.

Die Silyläther, deren Verwendung zuerst von HORNING und Mitarbeitern (11) beschrieben wurde, scheinen uns die geeignetsten Derivate für die Gaschromatographie der Steroide zu sein. Man erzielt praktisch quantitative Ausbeuten und die Verbindungen sind sehr gut flüchtig. Auch tritt bei den verwendeten Temperaturen keine Zersetzung ein. Die Silyläther sind aber außerordentlich wasserempfindlich. Schon Spuren von Luftfeuchtigkeit können das Analysenergebnis in Frage stellen. Bei Beachtung aller Vorsichtsmaßnahmen erscheinen sie uns aber als die geeigneten Derivate. Von der Verwendung von Acetaten haben wir abgesehen, da unseres Erachtens das Risiko von β -Eliminierung bei den hohen Kolonnen-temperaturen groß ist und somit unkontrollierbare Zersetzungsprodukte entstehen können.

Für die quantitative Bestimmung ist die Verwendung eines inneren Standards notwendig. Da aber die Urinchromatogramme eine sehr große und wechselnde Zahl von Peaks aufweisen, muß in diesem Fall anstelle eines substanzfremden, nicht in der Probe vorkommenden Stoffes, ein substanz eigener (evtl. im Urin vorkommender Stoff) Standard eingeführt werden. Für diesen Zweck eignet sich Pregnanlon oder auch Etiocholanolon gut. Praktisch muß man so vorgehen, daß von der gleichen Probe zwei Chromatogramme hergestellt werden, das eine mit, das andere ohne Zugabe von Pregnanlon. Da wir aber nur selten Pregnanlon feststellen konnten, erübrigte sich im allgemeinen die zweite Analyse. In Abbildung 5 ist das Gaschromatogramm eines Urins mit Pregnanlon als innerer Standard dargestellt.

Um ein „tailing“ zu vermeiden, wurde mit herabgesetzter Empfindlichkeit und mit 25 ml Urin gearbeitet. Die Empfindlichkeit kann aber bis weit unter 1 μ g pro Probe gesteigert werden.

So wurde die Methode durch Zumischen aufsteigender Steroidkonzentrationen zu Urin und Wasser getestet. Nach Durchführung des ganzen Arbeitsganges mit den Analysensubstanzen, einschließlich Hydrolyse, Extraktion und Silylierung wurden die erhaltenen Werte graphisch aufgetragen. Die Ausbeute erwies sich als sehr gut. Aus wiederholten Bestimmungen des gleichen Urins ergab sich eine hohe Zuverlässigkeit der Analyse. Die kleinen Abweichungen sind nicht durch die Gaschromatographie, sondern durch die nicht ganz reproduzierbare enzymatische Hydrolyse der Glucuronide verursacht.

Die Untersuchungen an Patienten aus unserer Klinik zeigen, daß die Methode für diagnostische Zwecke sehr gut geeignet ist. Erwartungsgemäß erhielten wir bei Patienten mit adrenogenitalem Syndrom eine massive Erhöhung von Pregnantriol und Pregnantriolon im Falle eines 21-Hydroxylase-Defektes (18, 19).

Wir möchten Herrn Dr. R. NEHER von der Ciba AG, Basel für die Überlassung von Testsubstanzen unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

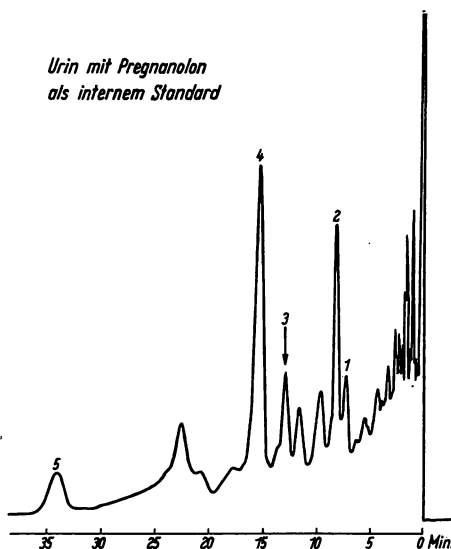


Abb. 5

Gaschromatogramm eines Urins mit Pregnanlon-Zusatz als inneren Standard. Trennbedingungen siehe Text; eingesetzt: 0,7 μ l

- | | |
|--------------------------------|--------------------|
| 1 = Pregnanliol | 4 = Pregnantriol |
| 2 = Androsteron | 5 = Pregnantriolon |
| 3 = Pregnanlon (Inn. Standard) | |

Literatur

1. VESTERGAARD, P., *Acta endocr., K'hvn. Supp.* 64, 50 (1964). —
2. BURSTEIN, S. und S. LIEBERMAN, *J. biol. Chemistry* 233, 331 (1958). —
3. DE WATTEVILLE, H., R. BORTH und M. GSELL, *J. Clin. Endocr., Springfield* 8, 962 (1948). —
4. BONGIOVANNI, A. M. und W. R. EBERLEIN, *Analytic Chem.* 30, 388 (1958). —
5. MARTIN, M. M., W. J. REDDY und G. W. THORN, *J. Clin. Endocr., Springfield* 21, 923 (1961). —
6. STARKA, L. und J. MALIKOVA, *J. Endocr.* 22, 215 (1961). —
7. OERTEL, G. W. und K. GROOT, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 11, 512 (1965). —
8. LIPSKY, S. R. und R. A. LANDAWNE, *Analytic Chem.* 33, 818 (1961). —
9. WOTIZ, H. H. und H. F. MARTIN, *J. biol. Chemistry* 236, 1312 (1961). —
10. VANDENHEUVEL, W. J. A., C. C. SWEeley und E. C. HORNING, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 3481 (1962). —
11. HORNING, E. C., W. J. A. VAN DENHEUVEL und B. G. CREECH, *Methods of Biochem. Analysis*, Vol. 2, Interscience, New York (1963). —
12. WOTIZ, H. H., *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 69, 415 (1963). —
13. JANSEN, A. P., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 8, 785 (1963). —
14. FRANCE, J. T., R. RIVERA, N. L. MCNIVEN und R. I. DORFMAN, *Steroids* 5, 687 (1965). —
15. HAMMOND, K. B. und H. LEACH, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 11, 584 (1965). —
16. KLOPPER, A., E. A. MICHIE und J. B. BROWN, *J. Endocr.* 12, 209 (1955). —
17. PETERSON, R. E., J. B. WYNGAARDEN, S. L. GUERRA, B. B. BRODIE und J. J. BUNIM, *J. Clin. Invest.* 34, 1779 (1955). —
18. BONGIOVANNI, A. M., W. R. EBERLEIN und J. CARA, *J. Clin. Endocr., Springfield* 14, 409 (1954). —
19. FINKELSTEIN, M. und J. SHOENBERGER, *J. Clin. Endocr., Springfield* 19, 608 (1959).

Dr. H.-Ch. Curtius

CH 8032 Zürich, Steinwiesstr. 75

Bestimmung von Kreatin in Serum und Urin

Von K. LAUBER

Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. med. H. Aebi)

(Eingegangen am 20. September 1965)

Eine einfache Methode zur Bestimmung von Kreatin in Serum und Urin mit der Diacetylreaktion wird beschrieben. Das Serum wird mit Perchlorsäure enteiweißt. Enteiweißtes Serum bzw. Urin werden mit einem Farbreagensatz bestehend aus Diacetyl und 1-Naphthol in Natronlauge zur Reaktion gebracht und photometriert. Die Messung der Extinktion nach zwei verschiedenen Zeiten erlaubt eine Korrektur des durch andere Guanidinderivate verursachten Fehlers. Die optimalen Reaktionsbedingungen werden diskutiert. Der Normalbereich im Serum wird ermittelt.

A simple method is described for the determination of creatine by the diacetyl reaction in serum and urine. The serum is deproteinised with perchloric acid. Deproteinised serum or urine is reacted with a colorimetric reagent consisting of diacetyl and 1-naphthol in sodium hydroxide solution and the colour is measured photometrically. By measuring the extinction at two different time intervals, a correction may be made for the interference by other guanidine derivatives. The optimal reaction conditions are discussed. The normal values for serum are reported.

Für die Ermittlung des Kreatingehaltes von biologischen Flüssigkeiten stehen heute im wesentlichen *drei Analysetypen* zur Verfügung: I. Photometrische Bestimmung als Kreatinin nach vorangehender Zyklisierung im sauren Milieu in der Wärme; II. Photometrische Bestimmung nach Überführung in roten Farbstoff mittels Diacetyl und α -Naphthol (*Barritt-Reaktion*); III. Enzymatische Bestimmung im optischen Test nach WARBURG.

Im klinischen Labor sind Kreatinbestimmungen relativ selten. Es besteht daher das Bedürfnis nach einer Methode, die auch bei nur sporadischem Gebrauch mit möglichst geringem Aufwand möglichst zuverlässige Resultate liefert. Die nach Prinzip I arbeitenden Methoden sind von vornherein wenig geeignet, weil sie für jede Probe zwei Analysen erfordern (Kreatininbestimmung vor und nach Zyklisierung des Kreatins) und bei Gegenwart großer Mengen von präformiertem Kreatinin ungenau sind. Es sind außerdem zahlreiche Bedenken gegen diesen Analysetyp erhoben worden, wie gegen die relative Ungenauigkeit der Pikratmethode an sich (1); Zerstörung von Kreatinin durch das Erhitzen (2); Bildung von unspezifischen Chromogenen (3); unvollständige Umwandlung des Kreatins in Kreatinin bei Gegenwart von viel präformiertem Kreatinin (Gleichgewichtsbildung) (4). Die auf Prinzip III basierenden Verfahren besitzen wohl eine nicht zu überbietende Spezifität und

haben für wissenschaftliche Reihenuntersuchungen entschieden den Vorrang. Bei seltener Anwendung sind aber auch sie umständlich und teuer, wegen der beschränkten Haltbarkeit der vielen Hilfspräparate (drei Enzyme, Adenosintriphosphat, Nikotinamid-adenin-dinukleotid, Phospho-enolpyruvat). ANDERSON und Mitarbeiter (5) haben eine auf der *Barritt-Reaktion* aufbauende Methode beschrieben, welche eine genaue und spezifische Erfassung des Kreatins in Serum und Urin ermöglicht. Die Verwendung von mehreren Ionenaustauschern in Serie macht das Verfahren zeitraubend und für die nicht besonders geschulte Arbeitskraft wenig geeignet. Auch ist der Serumbedarf (3–6 ml) für heutige Begriffe zu hoch. Das Verfahren von ABELIN und RAAFLAUB (1,6) ist wohl einfach, liefert aber zu kleine Extinktionen und läßt die Störfaktoren im Serum unberücksichtigt. Im folgenden wird eine Methode beschrieben und diskutiert, welche mit einem Minimum an Aufwand eine für klinische Belange hinreichend genaue Kreatinbestimmung in Serum und Urin erlaubt.

Methodik

Reagenzien

1. Perchlorsäure 6g/100 ml (0,6 n): 5,2 ml 70-proz. Säure mit Wasser ad 100 ml (unbeschränkt haltbar).
2. Diacetyl: 0,5 ml/100 ml Wasser (bei 4° praktisch unbeschränkt haltbar).