

Hochauflösende Gaschromatographie von Steroiden¹⁾

Von J. A. VÖLLMIN und H.-CH. CURTIUS

Aus der Medizinisch-Chemischen Abteilung der Universitäts-Kinderklinik Zürich

(Eingegangen am 28. August 1970)

Es wird gezeigt, daß Steroide als Trimethylsilyläther- und Methoximtrimethylsilylätherderivate mit Glaskapillarsäulen wesentlich besser getrennt werden können als mit gepackten Säulen. Es werden Beispiele für die gaschromatographische Bestimmung von Steroiden im Urin gegeben. Die Identifizierung erfolgt durch Verwendung derselben Säulen in einer Kombination von Gaschromatograph und Massenspektrometer. Durch den Einsatz der Glaskapillarsäulen kann auf eine komplizierte Vorreinigung verzichtet werden.

High resolution gas chromatography of steroids

It is shown, that steroids as trimethylsilyl and methoximtrimethylsilyl ether derivatives are separated much better on glass capillary columns than on packed ones. Therefore prepurification steps can be saved in the determination of human urinary steroids. The identification is carried out in a combination of gas chromatograph and mass spectrometer using the same columns.

Seit etwa zehn Jahren wird die Gaschromatographie zur Trennung von Steroiden verwendet. Dabei werden meist Derivate (Trimethylsilyläther, Methoxim-trimethylsilyläther u. a.) benutzt, welche sich mit gepackten Säulen und stationären Phasen auf Silikongrundlage im allgemeinen gut trennen lassen (vgl. z. B. 1—5). Die Gaschromatographie erlaubt eine hochspezifische Bestimmung einzelner Metabolite und ist deshalb kolorimetrischen Gruppenreaktionen wie Bestimmung der 17-Oxosteroide oder 17-Hydroxycorticoide vorzuziehen. Zur qualitativen oder quantitativen Analyse eines einzelnen Steroids aus biologischem Material sind jedoch oft mehrere Vorreinigungsschritte (z. B. mittels Dünnschicht- oder Säulenchromatographie) notwendig. Durch den Einsatz von Kapillarsäulen kann die Vorreinigung wesentlich verkürzt werden.

Zur Identifikation unbekannter Steroide aus biologischem Material eignet sich speziell eine Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer. Dabei können dieselben Kapillarsäulen verwendet werden, mit dem Vorteil, daß auch von sehr kleinen gaschromatographischen Peaks Massenspektren registriert werden können.

Vor etwa einem Jahr berichteten erstmals GROB und GROB (6) über die Gaschromatographie von Steroiden auf Glaskapillarsäulen. Über die Anwendung dieser Säulen zur Trennung von Steroiden aus menschlichem Urin ist vor kurzem berichtet worden (7). Unterdessen sind von NOVOTNY und ZLATKIS (8) ähnliche Ergebnisse veröffentlicht worden. Die vorliegende Arbeit soll zeigen, welche Vorteile der Einsatz dieser Kapillaren für die klinisch-chemische Steroidanalytik bedeutet.

Material und Methoden

Trivialnamen

1 ²⁾ Androsteron	5 α -Androstan-3 α -ol-17-on
2 Etiocholanolon	5 β -Androstan-3 α -ol-17-on
3 Dehydroepiandrosteron	5-Androsten-3 β -ol-17-on
4 11-Ketoandrosteron	5 α -Androstan-3 α -ol-11,17-dion
5 11-Ketoetiocholanolon	5 β -Androstan-3 α -ol-11,17-dion
6 Pregnanolon (interner Standard)	5 β -Pregnan-3 α -ol-20-on
7 11-Hydroxyandrosteron	5 α -Androstan-3 α ,11 β -diol-17-on
8 11-Hydroxyetiocholanolon	5 β -Androstan-3 α ,11 β -diol-17-on
9 Allopregnan diol	5 α -Pregnan-3 α ,20 α -diol
10 Pregnan diol	5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol
11 20 β -Pregnan diol	5-Pregnen-3 β ,20 β -diol
12 20 α -Pregnan diol	5-Pregnen-3 β ,20 α -diol
13 16 α -Hydroxypregnanolon	5-Pregnen-3 β ,16 α -diol-20-on
14 Pregnantriol	5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol
15 Pregnentriol	5-Pregnen-3 β ,17 α ,20 α -triol
16 Pregnantriolol	5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol-11-on
17 Cholesterin	5-Cholesten-3 β -ol
18 Tetrahydrodehydrocorticosterone	5 β -Pregnan-3 α ,21-diol-11,20-dion
19 Tetrahydrocorticosteron	5 β -Pregnan-3 α ,11 β ,21-triol-20-on
20 allo-Tetrahydrocorticosterone	5 α -Pregnan-3 α ,11 β ,21-triol-20-on
21 Tetrahydrocortison	5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,21-triol-11,20-dion
22 Tetrahydrocortisol	5 β -Pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-on
23 allo-Tetrahydrocortisol	5 α -Pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-on
24 Cortolon	5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 α ,21-tetrol-11-on
25 β -Cortolon	5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 β ,21-tetrol-11-on
26 Cortol	5 β -Pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,20 α -21-pentol

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen von J. A. VÖLLMIN anlässlich des Symposiums über gaschromatographische Steroidhormonbestimmung in Innsbruck (19. 5. 1970).

²⁾ Entsprechende Nummern sind für sämtliche Gaschromatogramme gültig.

Chemikalien

Referenzsteroide (Sigma, Chem. Comp., St. Louis, Mo. USA und Ikapharm, Ramat-Gan, Israel)

Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan (Fluka, Buchs, Schweiz)

Bis(trimethylsilyl)acetamid (Serva, Heidelberg, W.-Deutschland)

Methoxylamin-hydrochlorid (Eastman Org. Chem., Rochester, USA)

Sämtliche verwendeten Lösungsmittel waren p. a. Qualität oder wurden vor Gebrauch destilliert.

Arbeitsvorschrift

Hydrolyse — 50 ml Urin werden auf pH 6,2 eingestellt und mit 5000 FISHMAN-Einheiten β -Glucuronidase (Typ I, bakteriell) in 10 ml Phosphatpuffer (0,5M KH_2PO_4 , mit 2N NaOH auf pH 6,2 eingestellt) während 24 Std. bei 37° hydrolysiert.

Extraktion — Nach der Hydrolyse wird dreimal mit 40 ml Äther extrahiert. Es wird zweimal mit 1N NaOH und anschließend mit Wasser neutral gewaschen. Die Ätherextrakte werden vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und in gleicher Art wie die Referenzsteroiden silyliert. Die Extraktion der Corticosteroide erfolgt mit Äthylacetat anstelle von Äther und die Bildung von Methoximtrimethylsilyläther-Derivaten analog den Referenzsteroiden.

Trimethylsilyläther-Derivate — 0,5 ml einer Testlösung oder eines Urinextrakts (je 5 mg Steroid/100 ml Äthanol) werden am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Anschließend werden 500 μl Bis(trimethylsilyl)acetamid und 20 μl Trimethylchlorsilan zugegeben und 1 Std. bei 60° silyliert. Es wird mit Stickstoff bei 60° abgelassen, in 500 μl Heptan aufgenommen und 1 μl in den Gaschromatographen eingespritzt.

Methoximtrimethylsilyläther-Derivate — 0,5 ml einer Testlösung (je 5 mg Steroid/100 ml Äthanol) oder Urinextrakt werden ge-

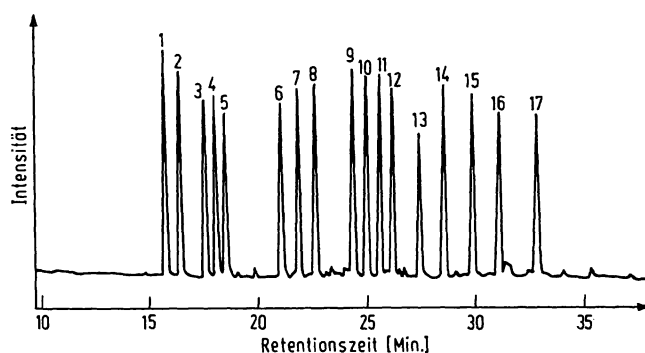


Abb. 1

Gaschromatogramm eines Testgemischs von Steroid-Trimethylsilyläthern

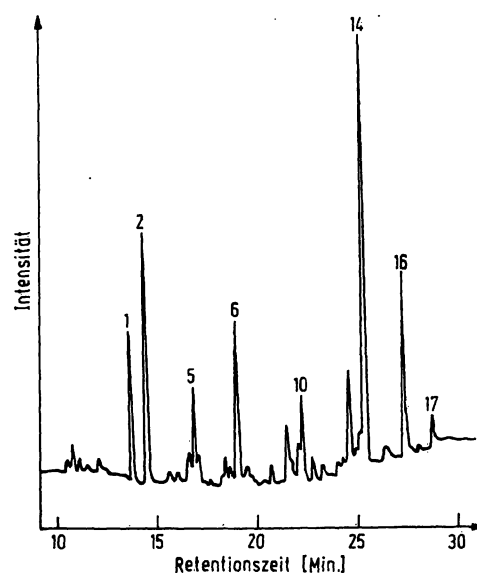


Abb. 2

Gaschromatogramm der Trimethylsilyläther von Steroiden im Urin eines Patienten mit adrenogenitalem Syndrom (21-Hydroxylase-Mangel)

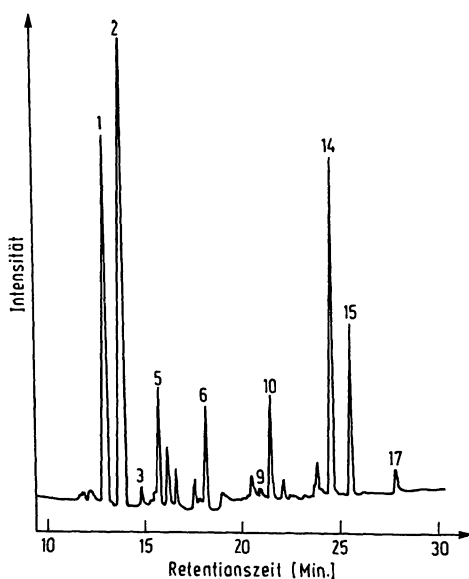


Abb. 3

Gaschromatographische Trennung der Trimethylsilyläther von Steroiden im Urin einer Frau mit Hirsutismus

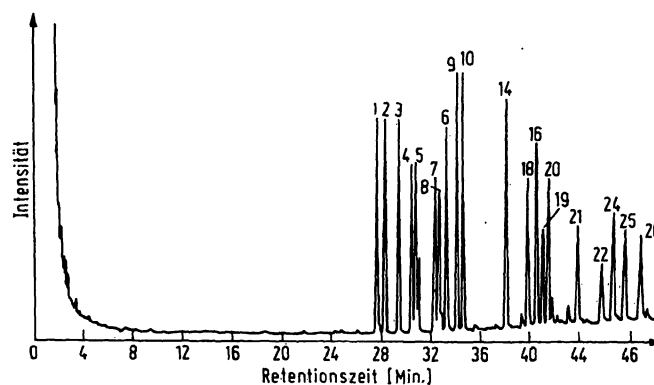
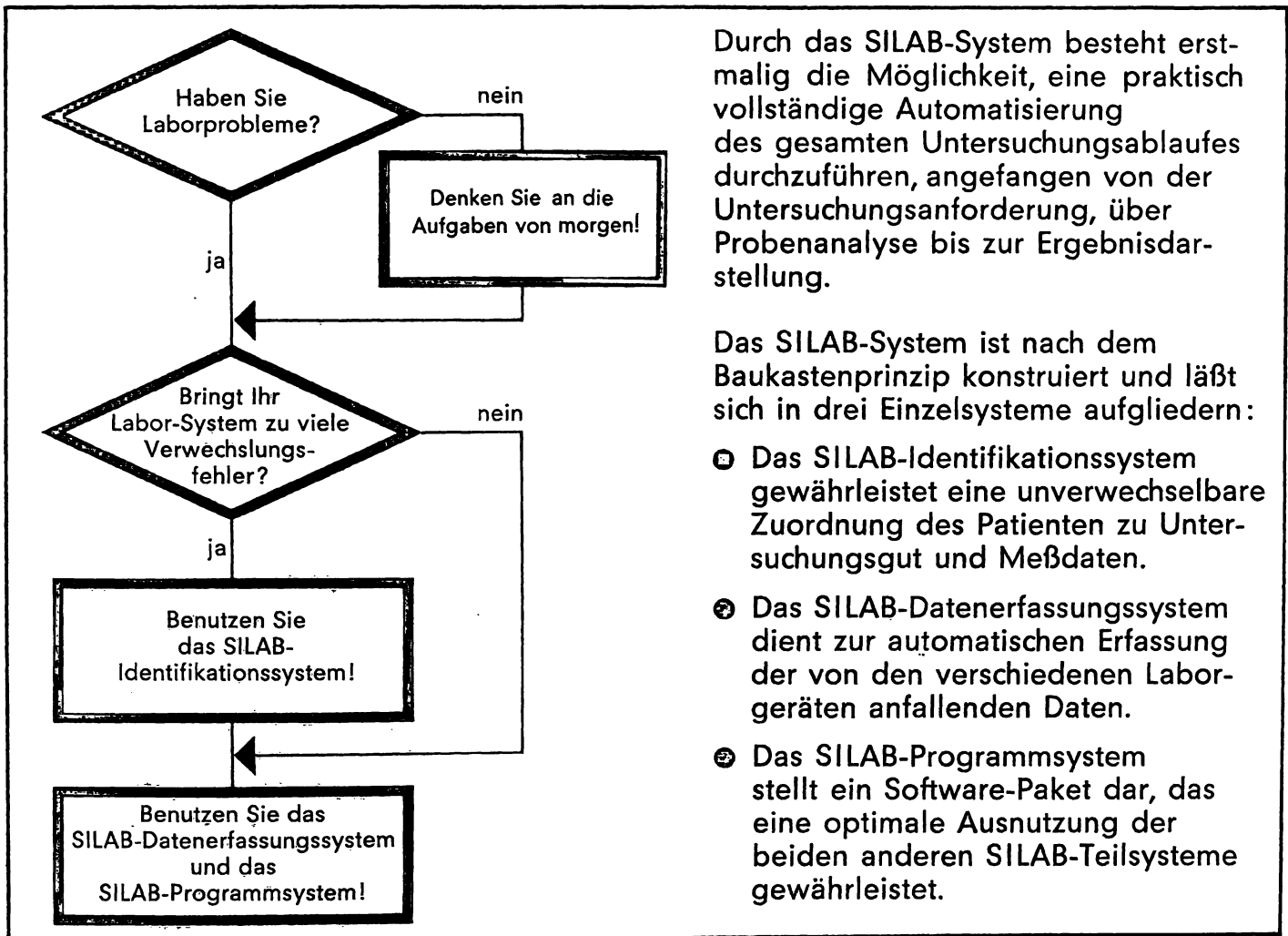


Abb. 4

Gaschromatogramm eines Testgemischs von Steroid-Methoxim-trimethylsilyläthern

Laborautomation



Durch das SILAB-System besteht erstmalig die Möglichkeit, eine praktisch vollständige Automatisierung des gesamten Untersuchungsablaufes durchzuführen, angefangen von der Untersuchungsanforderung, über Probenanalyse bis zur Ergebnisdarstellung.

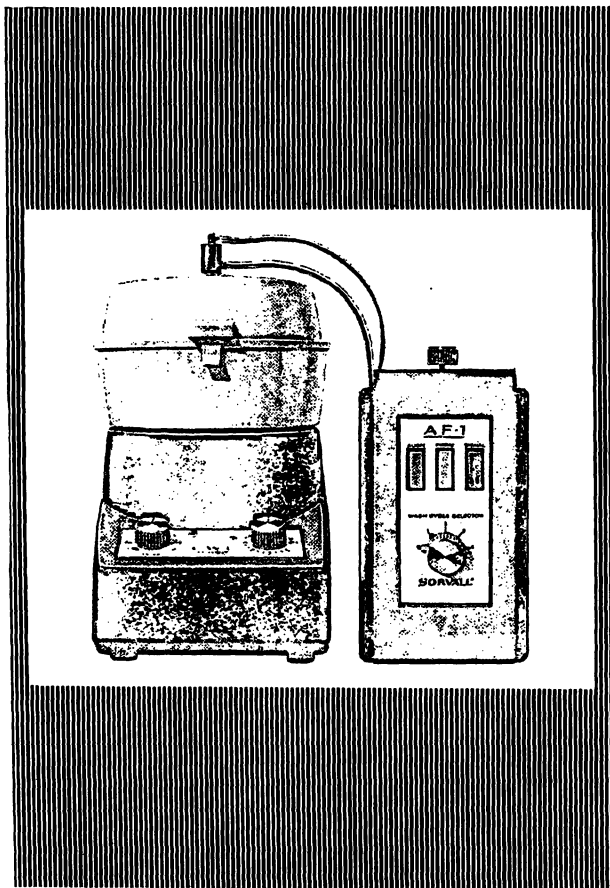
Das SILAB-System ist nach dem Baukastenprinzip konstruiert und läßt sich in drei Einzelsysteme aufgliedern:

- ① Das SILAB-Identifikationssystem gewährleistet eine unverwechselbare Zuordnung des Patienten zu Untersuchungsgut und Meßdaten.
- ② Das SILAB-Datenerfassungssystem dient zur automatischen Erfassung der von den verschiedenen Laborgeräten anfallenden Daten.
- ③ Das SILAB-Programmsystem stellt ein Software-Paket dar, das eine optimale Ausnutzung der beiden anderen SILAB-Teilsysteme gewährleistet.

mit dem SILAB-System von Siemens

SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT
Bereich Medizinische Technik
Erlangen

**Sie erfahren viel
über das automatische
SORVALL
Zellwasch-System,
auch über
Coombs-Tests
und andere serolog.
Untersuchungen**



Unsere interessante
Druckschrift CW-70810
informiert Sie ausführlich.



WISSENSCHAFTLICHE APPARATE

HORMUTH-VETTER

6908 Wiesloch/Bd., Postfach 1348, Tel. 06222/2147
6900 Heidelberg 1, Postfach 750, Tel. 06221/20045

Johannes Flügge

Grundlagen der Polarimetrie

Gerätekunde und Meßtechnik

Oktav. Mit 72 Abbildungen und 28 Tabellen.
XII, 159 Seiten. 1970. Plastikeinband DM 48,—
(Arbeitsmethoden der modernen Naturwissen-
schaften, herausgegeben von Kurt Fischbeck)

Wurde die Polarimetrie bereits seit langem als analytisches Verfahren, z. B. in Zuckerfabriken und in Betrieben der pharmazeutischen Chemie, angewandt, so hat sie sich in neuerer Zeit auch in der Erforschung von Molekülstrukturen als aufschlußreich erwiesen, besonders seitdem es automatische und Spektralpolarimeter bis ins Ultraviolett gibt. Das vorliegende Werk informiert über Grundlagen, Meßtechnik und moderne Geräte dieser optischen Methode und berücksichtigt ihren Stand bis in die jüngste Zeit, wobei neben der Analytik auch die Bestimmung der Rotationsdispersion, der magneto-optischen Drehung des Lichts und der Elliptizität, wie sie bei Zirkulardichroismus auftritt, besprochen werden. Photoelektrische Polarimeter und Saccharimeter werden ausführlich behandelt.



Walter de Gruyter
Berlin · New York

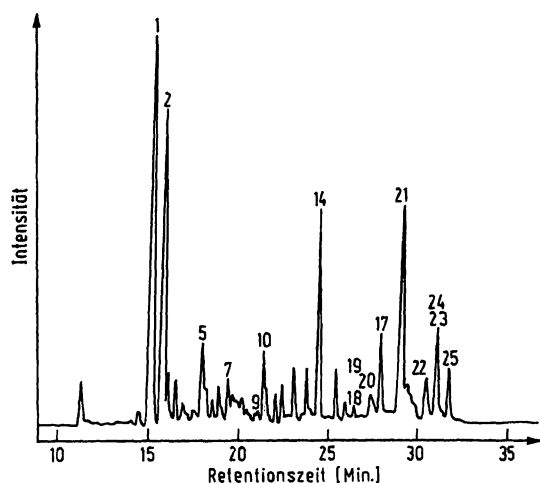


Abb. 5

Gaschromatographische Trennung von Steroid-Methoximtrimethylsilyläthern im Urin eines gesunden Mannes (22-jährig)

trocknet und mit 200 μ l einer 1proz. Methoxylamin-hydrochlorid-Lösung versetzt. Die Reaktion erfordert bei Raumtemperatur mindestens 12 Stdn. Anschließend wird mit 500 μ l Hexamethyldisilazan und 20 μ l Trimethylchlorosilan während 1 Std. bei 60° silyliert.

Gaschromatographie — Es wurde ein Gaschromatograph Carlo Erba Mod. GI (Flammenionisationsdetektor) mit Glaskapillaren (20 m \times 0,3 mm) verwendet. Die Herstellung der Säulen ist von GROB beschrieben worden (9, 10). Stationäre Phase war OV 101. Folgende Trennsäulenbedingungen wurden angewandt: Trägergas 2 ml/Min. Hc; Temperaturen: $T_j = 230^\circ$, $T_c = 10$ Min. 160° , Progr. $3^\circ/\text{Min.}$, 230° . Es wurde die Technik der splitlosen Injektion (sog. solvent bypassing) nach GROB (6, 11) angewandt. Das Gaschromatogramm in Abbildung 4 ist mit einer Glaskapillarsäule SF 96 (38 m \times 0,33 mm) aufgenommen worden; sämtliche Bedingungen jedoch sind dieselben wie oben.

Gaschromatographie — Massenspektrometrie — Zur Identifikation der einzelnen Metabolite wurde eine Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer LKB 9000 verwendet. Dabei wurden dieselben Säulen und dieselben Bedingungen wie für die reine gaschromatographische Trennung benützt. Einspritzblock und Separator wurden nach den Angaben in l. c. (7) abgeändert. Die Einspritzung erfolgte ebenfalls splitlos (6, 11).

Resultate

Abbildung 1 zeigt das Gaschromatogramm eines Testgemischs von Steroiden als Trimethylsilyläther-Derivate, getrennt auf einer Glaskapillarsäule. Jeder Peak entspricht einer Menge von 0,05 μ g. In Abbildung 2 ist die Trennung von Steroiden im Urin eines Patienten mit adrenogenitalem Syndrom, bedingt durch einen 21-Hydroxylasedefekt, wiedergegeben. Die Abbildung 3 zeigt Steroide im Urin einer Frau mit Hirsutismus. Für diese beiden gaschromatographischen Trennungen wurden keinerlei Vorreinigungsmethoden verwendet, es wurde lediglich enzymatisch mit β -Glucuronidase gespalten, mit Äther extrahiert und silyliert. Die Registrierung erfolgte durch Aufnahme des Totalionenstroms in einer Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer. In Abbildung 4 sind Referenz-

steroide in Form ihrer Trimethylsilyläther und Methoximtrimethylsilyläther-Derivate enthalten. Ein Gaschromatogramm von Trimethylsilyläther- und Methoximtrimethylsilyläther-Steroiden im Urin eines gesunden Mannes zeigt Abbildung 5. Durch Verwendung von Methoximtrimethylsilyläther-Derivaten ist es möglich, auch die Corticosteroide mit einer 17α -Hydroxygruppe (Tetrahydrocortison, Tetrahydrocortisol, allo-Tetrahydrocortisol) unzersetzt zu erfassen. Wiederum wurde lediglich mit Glucuronidase gespalten, mit Essigester extrahiert und anschließend derivatisiert. Es wurde keine zusätzliche Reinigung vorgenommen.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß mit Glaskapillarsäulen sehr hohe Trennleistungen erzielt werden können. Dadurch ist es möglich, auf zeitraubende Vorreinigungsschritte zu verzichten. Die Verwendung der Säulen in einer Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer ermöglicht die Identifikation von unbekanntem Metaboliten geringer Konzentration, da der Untergrund klein ist (geringes „bleeding“ der Säule).

Die Trennleistung einer Säule kann z. B. anhand der Trennung von 11-Oxoandrosteron und 11-Oxoätiocholanolon (Peak Nr. 4 und 5) getestet werden. Wie in Abbildung 1 gezeigt, werden die beiden Peaks von einer guten Säule total getrennt. Der geringe Anstieg der Basislinie bei Temperaturprogrammierung ist ein weiteres charakteristisches Merkmal für die Güte der Säule.

Abbildung 2 zeigt die typischen Steroide eines Patienten mit 21-Hydroxylasedefekt (Knabe, 8-jährig). Dabei ist zu berücksichtigen, daß der Urin unter Behandlung mit Prednison gesammelt wurde. Die Ausscheidung der 17-Oxosteroide (Peak Nr. 1, 2, 5) ist hoch, besonders aber hervorstechend sind Pregnantriol (Peak Nr. 14) und Pregnantriolon (Peak Nr. 16), letzteres ein Steroid, das beim Gesunden nicht nachgewiesen werden kann. Die Ausscheidung der Steroid-glucuronide einer Frau mit Hirsutismus (24-jährig) liegt im Normalbereich, lediglich Pregnantriol (Peak Nr. 15) wird gegenüber dem Gesunden in etwa 3—4facher Menge ausgeschieden (860 μ g/24 Stdn.).

Steroide, welche eine 17α -Hydroxyacetonsseitenkette tragen, können in Form ihrer reinen Trimethylsilyläther nicht unzersetzt gaschromatographiert werden. Es werden deshalb bevorzugt Methoximtrimethylsilyläther-Derivate verwendet. Auf diese Weise können auch die Tetrahydrocorticosteroide, welche in erheblicher Konzentration im Urin vorhanden sind, erfaßt werden. Es sind Versuche im Gange, mit Hilfe von Kapillarsäulen sowie Trimethylsilyläther- und Methoximtrimethylsilyläther-Derivaten eine möglichst große Anzahl von Steroiden im Urin ohne Vorreinigung quantitativ zu analysieren. HORNING und Mitarbeiter (4, 12) haben umfassende qualitative Untersuchungen mit gepackten Säulen gemacht, während bei quantitativen Versuchen

auf dieser Basis infolge schlechter Trennung mit größeren Fehlern zu rechnen ist (13).

Die Haltbarkeit der verwendeten Glaskapillarsäulen ist ausgezeichnet; auch nach 500 Gaschromatogrammen ist die Trennleistung nicht wesentlich gesunken. Eine Neubelegung der Glasoberfläche mit stationärer Phase

scheint ohne weiteres möglich zu sein. Entsprechende Experimente sind erfolgversprechend.

Für das leihweise Überlassen von Glaskapillarsäulen sind wir Herrn PD Dr. K. GROB zu großem Dank verpflichtet. Die technische Hilfe von Herrn M. ELSENER sei ebenfalls bestens dankt.

Literatur

1. VAN DEN HEUVEL, W. J. A., C. C. SWEELEY und E. C. HORNING, *J. Amer. chem. Soc.*, **82**, 3481 (1960). — 2. SWEELEY, C. C. und E. C. HORNING, *Nature (London)* **187**, 144 (1960). — 3. VAN DEN HEUVEL, W. J. A., B. G. CREECH und E. C. HORNING, *Analytic. Biochem.* **4**, 191 (1962). — 4. EIK-NES, K. B. und E. C. HORNING, *Gas Phase Chromatography of Steroids*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1968). — 5. FALES, H. M. und T. LUUKKAINEN, *Analytic. Chem.* **37**, 955 (1965). — 6. GROB, K. und G. GROB, *J. Chromatog. Sci.* **7**, 584 (1969). — 7. VÖLLMIN, J. A., *Chromatographia* **3**, 233 und 238 (1970). — 8. NOVOTNY, M. und A. ZLATKIS, *J. Chromatog. Sci.* **8**, 346 (1970). — 9. GROB, K., *Helv. chim. Acta* **48**, 1362 (1965). — 10. GROB, K., *Helv. chim. Acta* **51**, 718 (1968). — 11. GROB, K. und G. GROB, *J. Chromatog. Sci.* **7**, 587 (1969). — 12. HORNING, E. C., M. G. HORNING, N. IKEKAWA, E. M. CHAMBAZ, P. JAAKONMAKI und C. J. W. BROOKS, *J. Gas Chromatog.* **5**, 283 (1967). — 13. ROS, A., *Monit. ostet. ginec.* **39**, 777 (1968).

Priv.-Doz. Dr. H.-Ch. Curtius
CH 8032 Zürich
Steinwiesstr. 75
Kinderspital