

KOMBINATION VON GASCHROMATOGRAPHIE UND DÜNNSCHICHT- CHROMATOGRAPHIE BEI STERIOD-UNTERSUCHUNGEN

H.-CH. CURTIUS UND M. MÜLLER

Chemisches Laboratorium der Universitäts-Kinderklinik, Zürich (Schweiz)*

(Eingegangen den 28. Juli 1967)

EINLEITUNG

Die Gaschromatographie besitzt unter den verschiedenen bekannten Chromatographiemethoden die höchste Trennleistung und Empfindlichkeit. Sie ist daher für die Analyse und Identifikation nur in Spuren vorkommender biologischer Substanzen sehr geeignet.

Die gaschromatographischen Peaks werden im allgemeinen mit Hilfe der Retentionszeiten den entsprechenden Substanzen zugeordnet. Wir haben gezeigt, dass bei der gaschromatographischen Analyse von Steroiden in biologischem Material, insbesondere bei der Verwendung ungeeigneter Hydrolysenverfahren, Steroidpeaks von Stör- bzw. Zersetzungsprodukten unterlagert sein können¹.

Daraus ergibt sich häufig die Notwendigkeit, die Gaschromatographie mit anderen Analysen- und Detektionsverfahren zu koppeln. Unter den zahlreichen Möglichkeiten ist die Kombination mit der Dünnschichtchromatographie besonders leistungsstark. Es ist das Ziel der vorliegenden Untersuchung, die Kombination Gaschromatographie-Dünnschichtchromatographie für die Analyse von Steroiden einzusetzen. Wir haben zu diesem Zweck die von KAISER beschriebene Apparatur modifiziert².

GERÄTE

Gaschromatograph "Aerograph 1520" mit Splitter vor dem FID; Chromatographiesäule aus Glas von 2 m Länge und 2.7 mm Ø.

Ausrüstung zur Dünnschichtchromatographie der Firma C. Desaga, Heidelberg (W.-Deutschland). Die Dünnschichtplatten wurden mit Kieselgel G beschichtet und luftgetrocknet.

CHEMIKALIEN

Alle Lösungsmittel p.a. und frisch destilliert.

Die verwendeten Steroide wurden von den Firmen Ikapharm (Israel) und Merck (W.-Deutschland) bezogen.

* Direktor: Prof. Dr. A. PRADER.

REAGENZIEN

Fliessmittel für die Dünnschichtchromatographie

- (1) Methylenchlorid–Aceton (70:30).
- (2) Chloroform–Aethanol (90:10).

Sprühmittel für die Dünnschichtchromatographie

- (1) Methanol–Schwefelsäure konz. (1:1); Farbentwicklung: 20 Min. bei 110°.
- (2) 1 % Vanillin in 10 % wässriger HClO₄; Farbentwicklung: 5–7 Min. bei 110°.
- (3) 0.5 g KMnO₄ in 15 ml Schwefelsäure konz.; Farbentwicklung: sofort bei Raumtemperatur.
- (4) Zunächst 5–10 % FeCl₃ in Wasser, dann 5 % Kaliumferricyanid in Wasser; Farbentwicklung: sofort bei Raumtemperatur.
- (5) 1–2 % Tetrazolblau in Wasser–2 N NaOH in Methanol (1:9); Farbentwicklung: sofort bei Raumtemperatur.
- (6) Antimon(III)chlorid in Eisessig (1:1); Farbentwicklung: 5 Min. bei 95°.

Silylierungsgemisch für die Gaschromatographie

3 ml Hexamethyldisilazan + 0.1 ml Trimethylchlorsilan (verschlossen aufbewahren, jeden 2. Tag frisch ansetzen).

Testgemisch

Je 10 mg Allopregnanol, Pregnanol, Androsteron, Etiocholanol, Dehydroepiandrosteron, Pregnanol, Pregnatriol, 11-Ketoandrosteron, 11-Ketoetiocholanol, 11-Hydroxiandrosteron, 11-Hydroxiatiocholanol und Pregnatriol in Aethanol *ad* 100 ml.

EXPERIMENTELLES

Silylierung

Zu 1 ml in einem Schliff-Röhrchen getrockneter Testmischung werden 0.5 ml Silylierungsgemisch gegeben und gut verschlossen 1 Std. in den Wärmeschrank bei 60° gestellt. Das überschüssige Silylierungsgemisch wird anschliessend bei etwa 40° mit absolut getrocknetem Stickstoff abgedampft. Den Rückstand nimmt man in 50 µl absolutem Hexan auf. Von dieser Lösung werden 10 µl in den Gaschromatographen injiziert.

Trennsäulenbedingungen

XE 60, 3 % auf Gaschrom P, 80–100 mesh; T_c 210°, T_f 265°; N₂, 50 ml/Min.

Gaschromatographie–Dünnschichtchromatographie

Eine mit Kieselgel G beschichtete Dünnschichtplatte von 20 × 20 cm wird an den Ausgang der gaschromatographischen Trennsäule angeschlossen. Die Platte wird mit Hilfe eines Motors auf einem Wagen fortbewegt; die aus der Trennsäule austretenden Substanzen können somit auf der Startlinie nacheinander adsorbiert werden. Ein am Ende der Trennsäule eingebauter "Splitter" trennt den Gasstrom in zwei Teile. Nur ca. 10 % werden dem FID zugeführt. Vom zweiten Ausgang des Splitters

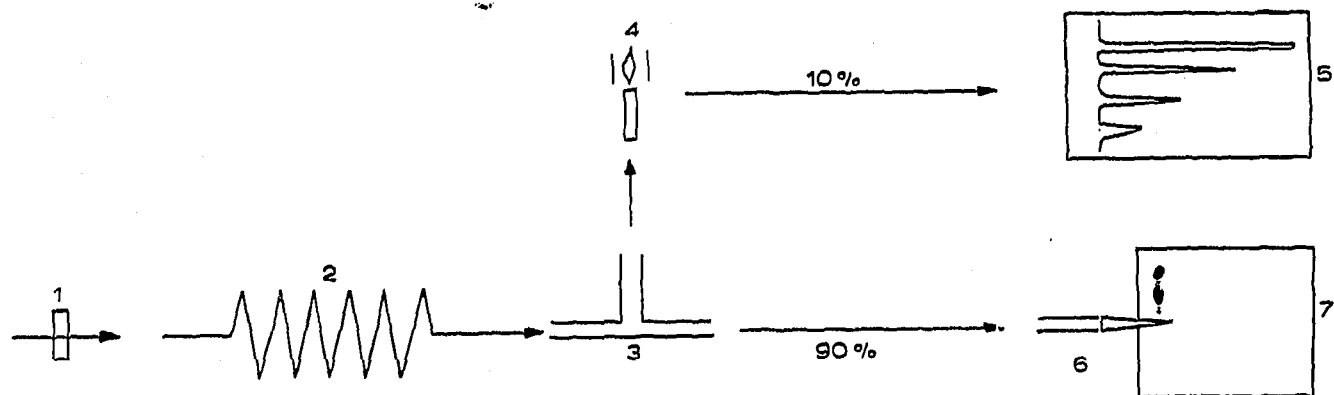


Fig. 1. Prinzip der Kombination GC-DC. 1 = Einlass-System; 2 = Trennsäule; 3 = Strömungssplitter; 4 = Flammenionisationsdetektor; 5 = Registriergerät; 6 = Adsorptionsrohr; 7 = Dünnschichtplatte.

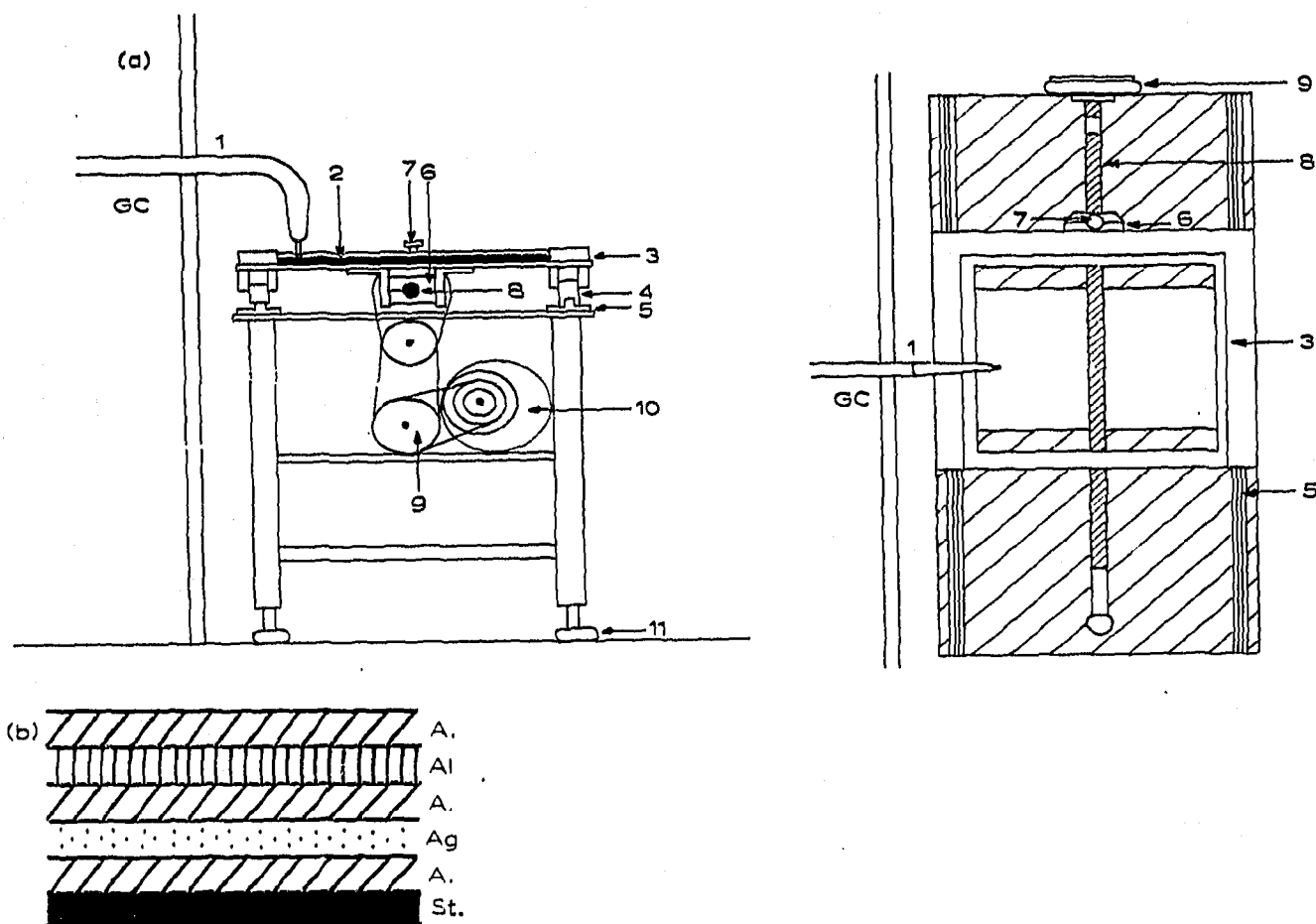


Fig. 2. (a) Schematische Darstellung der Apparatur. Platten-Transportwagen. 1 = Geheiztes Adsorptionsrohr; 2 = Dünnschichtplatte; 3 = Plattenträger; 4 = Räder; 5 = T-Schiene; 6 = Kupplung; 7 = Entkupplungsknopf; 8 = Spindel; 9 = Getriebe; 10 = Motor; 11 = Niveauschraube. (b) Querschnitt des Adsorptionsrohres. A. = Asbest; Al = Aluminiumfolie; Ag = Silberrohr; St. = Stahlrohr.

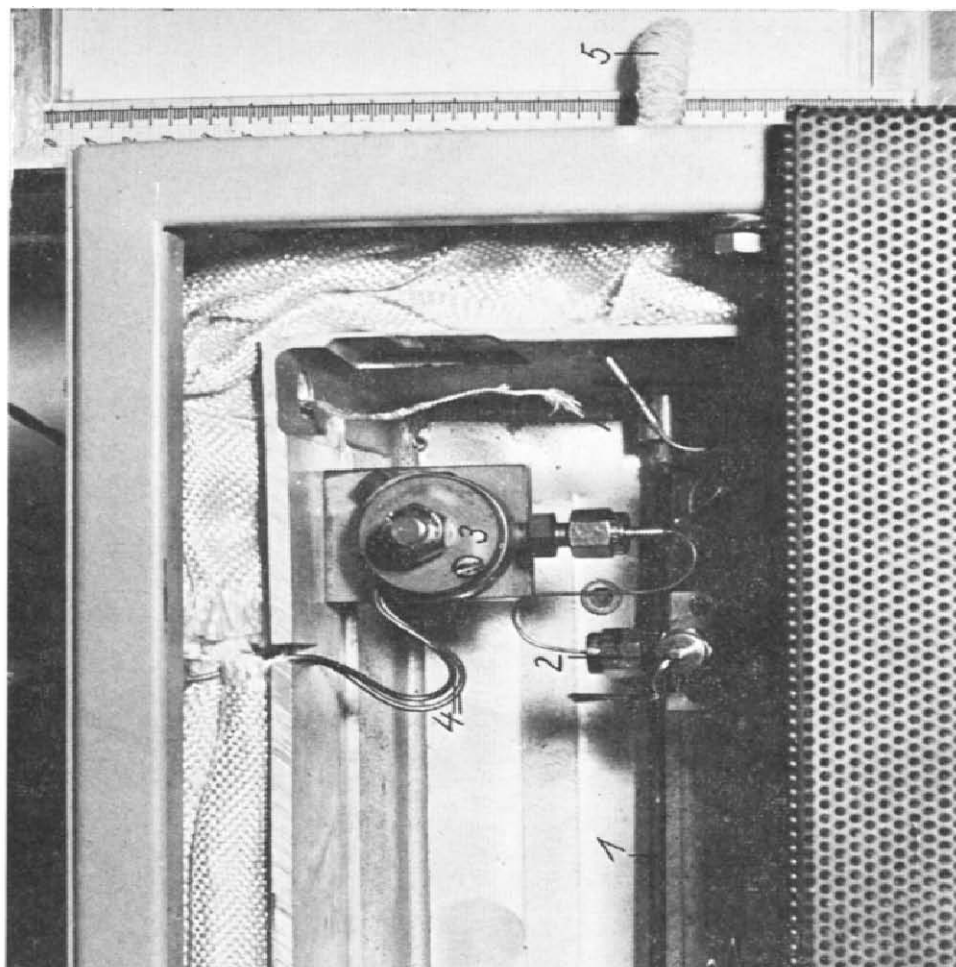


Fig. 4. Photographie des Detektorfens. 1 = Silberrohr; 2 = Strömungssplitter; 3 = Flammenionisationsdetektor; 4 = Luft- und H₂-Zufuhr; 5 = geheizter Ausgang mit Asbesfisolation.

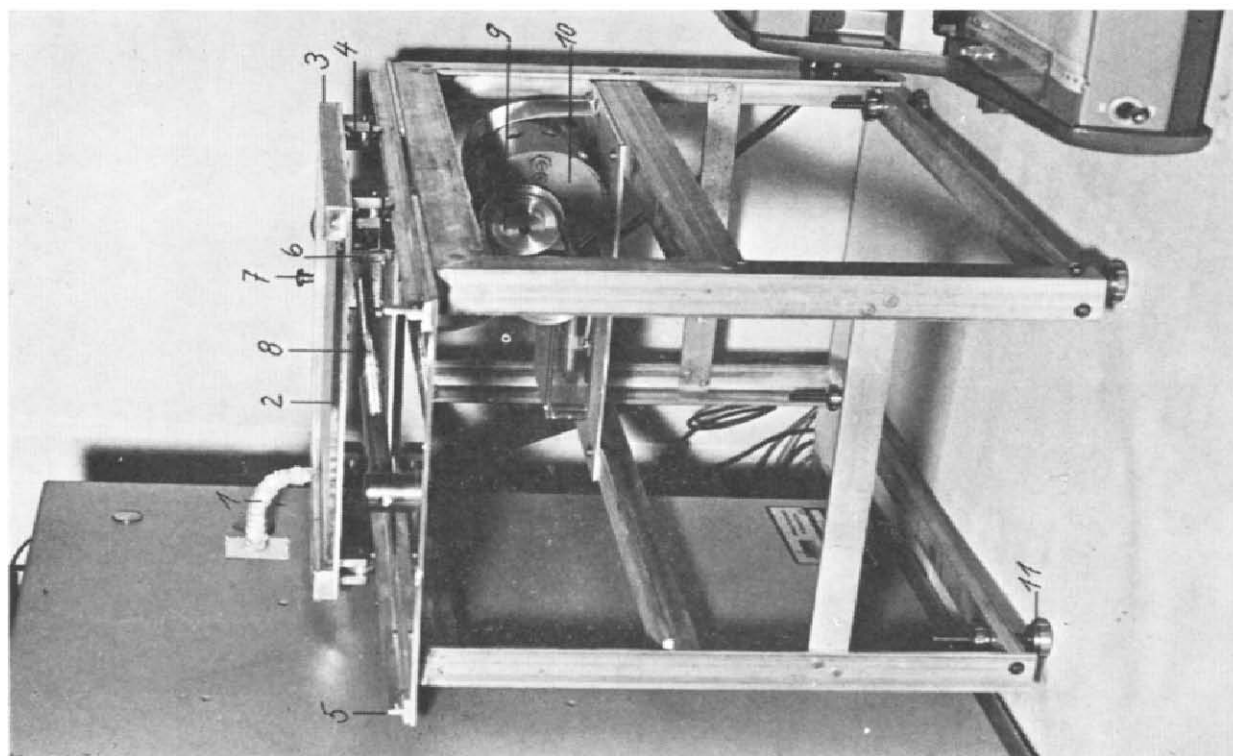


Fig. 3. Kombination GC-DC. 1 = Geheiztes Adsorptionsrohr; 2 = Dünnschichtplatte; 3 = Plattenträger; 4 = Räder; 5 = T-Schiene; 6 = Kupplung; 7 = Entkuppelungsknopf; 8 = Spindel; 9 = Getriebe; 10 = Motor; 11 = Niveauschraube.

werden 90 % des Gasstromes durch eine dünne Metallkapillare von 1.5 mm Ø bis 0.5–1 mm über die Dünnschichtplatte geführt. Die Kapillare wird vom geheizten Detektorofen bis über die Platte durch ein Silberrohr von 4.0/2.2 mm Ø geleitet, das seinerseits von der ungeheizten Seite ausserhalb des Gaschromatographen an mit Asbest und Aluminiumfolie gegen Wärmeverlust isoliert ist.

Der Wagen wird mit Hilfe eines kleinen Elektromotors über ein Getriebe fortbewegt (siehe Fig. 2). Das Getriebe kann entweder stufenlos sein oder sich auf einige vorwählbare Geschwindigkeiten einstellen lassen. Die Geschwindigkeit des Wagens wird im vorliegenden Beispiel auf 30 cm/h eingestellt.

Nach der Adsorption der Trimethylsilyläther auf der Startlinie besprüht man die Dünnschicht-Platte mit einer Lösung von 1 % HCl in Methanol. Nach dem Trocknen wird in einem dünnenschichtchromatographischen Fließmittelsystem (System 1 oder 2) entwickelt und die freien Steroide mit einem geeigneten Sprühreagenz behandelt (Sprühreagenzien 1–6).

In Fig. 1–4 sind das Prinzip und die Apparatur der Kombination Gaschromatographie–Dünnschichtchromatographie dargestellt.

RESULTATE

In Fig. 5 ist ein Gaschromatogramm von 12 Steroiden als Trimethylsilyläther, die Startlinie des Dünnschichtchromatogramms und das entwickelte Chromatogramm der freien Steroide dargestellt.

TABELLE I

R_F -WERTE UND FARBSKALA VERSCHIEDENER STEROIDE IN FREIER FORM UND ALS TRIMETHYLSILYLÄTHER

System (1) Methylenchlorid–Aceton (70:30); System (2) Chloroform–Äthanol (90:10).

| No. | Steroid | R_F -Werte | | | Farbe* H_2SO_4 50 % in MeOH |
|-----|---------------------------|--------------|------|----------|-------------------------------------|
| | | System 1 | | System 2 | |
| | | Silyliert | Frei | Frei | |
| 1 | Allopregnandiol | 0.79 | 0.40 | 0.58 | grau |
| 2 | Pregnandiol | 0.79 | 0.32 | 0.54 | grau |
| 3 | Androsteron | 0.75 | 0.53 | 0.70 | rot-violett |
| 4 | Etiocholanolon | 0.75 | 0.46 | 0.68 | rot-violett |
| 5 | Dehydroepiandrosteron | 0.76 | 0.50 | 0.68 | grau-grün |
| 6 | Pregnanolon | 0.75 | 0.52 | 0.71 | lila-grau |
| 7 | Pregnantriol | 0.80 | 0.08 | 0.26 | grau |
| 8 | 11-Ketoandrosteron | 0.70 | 0.42 | 0.63 | hellgrau |
| 9 | 11-Ketoetiocholanolon | 0.69 | 0.35 | 0.60 | hellgrau |
| 10 | 11-Hydroxiandrosteron | 0.67 | 0.36 | 0.56 | violett |
| 11 | 11-Hydroxi-etiocholanolon | 0.66 | 0.32 | 0.52 | violett-grau |
| 12 | Prenantriolon | 0.82 | 0.05 | 0.19 | gelb |
| 13 | Oestradiol | | 0.51 | 0.57 | rot |
| 14 | Oestriol | | 0.15 | 0.24 | violett |
| 15 | Oestron | | 0.63 | 0.70 | rot |
| 16 | Testosteron | | 0.50 | 0.66 | dunkelgrün |
| 17 | Tetrahydro-S | | 0.25 | 0.36 | braun |
| 18 | Reichstein's-S | | 0.50 | 0.61 | braun-rot |
| 19 | 21-Hydroxipregnenolon | | 0.55 | 0.70 | dunkelblau |

* Färbung: Besprühen mit 50 % H_2SO_4 in Methanol, 20 Min. bei 110° entwickeln und die Farbe 45 Min. nach dem Besprühen ablesen.

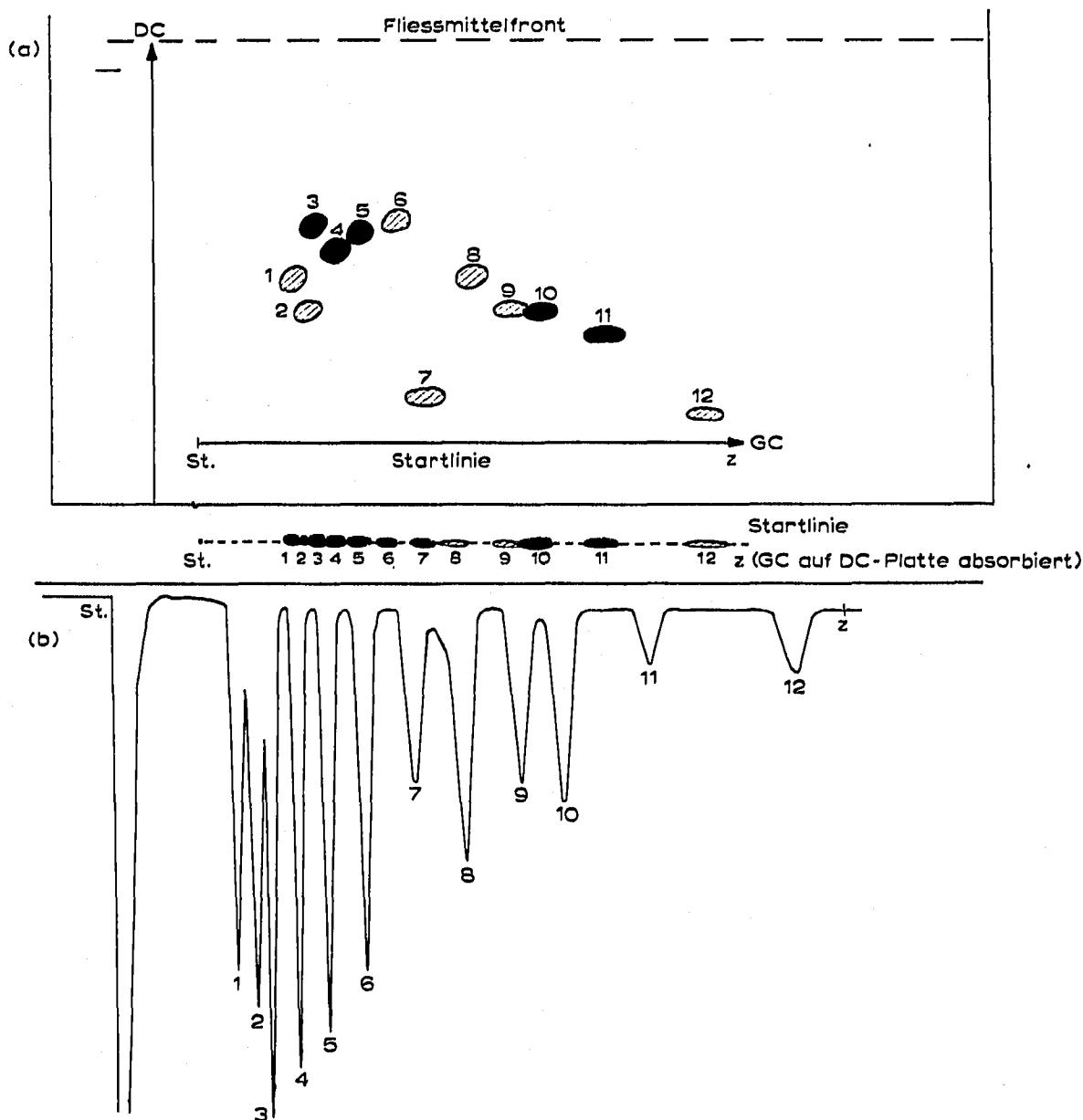


Fig. 5. Dünnschichtchromatogramm (a) und Gaschromatogramm (b) von 12 Steroiden.

Tabelle I zeigt R_F -Werte und Farbskala verschiedener Steroide in freier Form und als Trimethylsilyläther.

DISKUSSION

Wir haben die Kombination Gaschromatographie-Dünnschichtchromatographie zur Analyse von Steroiden eingesetzt. Ohne grossen Zeitaufwand konnten wir parallel zum analytischen Gaschromatogramm eine dünnschichtchromatographische Abklärung der einzelnen Peaks durchführen und so die Trennleistung von zwei verschiedenen Verfahren addieren.

Die von KAISER beschriebene Apparatur wurde leicht modifiziert². Als ge-

heizten Ausgang verwendeten wir eine durch ein Silberrohr geheizte Kapillare. Die gute Wärmeleitung des Silberrohrs erübrigte eine Wurzelheizung, wodurch auch örtliche Überhitzungen vermieden werden konnten.

Die Steroide lassen sich am vorteilhaftesten als Trimethylsilyläther gaschromatographieren³. Wir haben festgestellt, dass die Derivate nicht sehr hydrolyseempfindlich sind, was einer allgemein verbreiteten Ansicht widerspricht. Sie konnten sogar unzersetzt dünnschichtchromatographiert werden; ihre Trennung war jedoch unbefriedigend (Tabelle I).

Es erwies sich daher als günstig, die Trimethylsilyläther mit Methanol-HCl auf der Startlinie in ihre Komponenten aufzuspalten und die freigesetzten Steroide in einem geeigneten Fließmittelsystem dünnschichtchromatographisch zu entwickeln. Es kann hier die ganze Vielfalt der dünnschichtchromatographischen Trennmedien eingesetzt werden⁴.

Beim Besprühen der Dünnschichtplatte mit einem Farbreagens kommt ein weiterer Vorteil der Gaschromatographie-Dünnschichtchromatographie-Kopplung zur Geltung: Die verwendete Farbreaktion kann chemisch hochspezifisch sein. Wir haben verschiedene Farbreaktionen getestet: Nur wenige Sprühmittel waren für alle in Frage kommenden Steroide gleich gut geeignet, wie z.B. Methanol-Schwefelsäure, Vanillin-Perchlorsäure und Kaliumpermanganat in konzentrierter Schwefelsäure. Viele andere Sprühmittel färbten die 11-Keto- und 11-Hydroxisteroide nur sehr schlecht an. Zur Anfärbung der Oestrogene eignete sich die Berliner-Blau-Reaktion mit Ferrichlorid-Kaliumferricyanid, für Reichstein's Tetrahydro-S und Reichstein's-S Tetrazolblau in Methanol. Antimon(III)chlorid in Eisessig war für alle untersuchten Steroide brauchbar, mit Ausnahme der 11-Ketoverbindungen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur automatischen, kontinuierlichen Kombination der Gaschromatographie mit der Dünnschichtchromatographie beschrieben. Wir haben diese Technik für Steroiduntersuchungen eingesetzt.

Die aus der Trennsäule eluierten Komponenten werden nacheinander auf der Startlinie der Dünnschicht-Platte adsorbiert. Auf einem Wagen liegend wird die Platte durch ein Getriebe mit verschieden einstellbarer Geschwindigkeit fortbewegt. Die als Trimethylsilyläther vorliegenden Steroide werden durch Besprühen mit HCl-Methanol auf der Startlinie gespalten und dünnschichtchromatographisch entwickelt. Eine Liste geeigneter Sprühmittel für die Anfärbung der freien Steroide auf der Dünnschichtplatte ist angeführt.

SUMMARY

A method for the automatic and continuous combination of gas chromatography with thin-layer chromatography is described. This technique has been applied to the investigation of steroids.

The components eluted from the separation column were adsorbed one after another on the startline of the thin-layer plate. This plate rests on a carriage propelled by a driving-motor which can operate at various adjustable speeds. The trimethylsilyl ethers of the steroids were split by spraying the startline with hydrochloric acid-

methanol, and thin-layer chromatography was then carried out. A list of suitable spray reagents for the detection of the free steroids on the thin-layer plate is given.

LITERATUR

- 1 H.-CH. CURTIUS UND M. MÜLLER, *J. Chromatog.*, 30 (1967) 410.
- 2 R. KAISER, *Chromatographie in der Gasphase*, Band IV, *Quantitative Auswertung*, Bibliographisches Institut, Mannheim, 1965.
- 3 W. J. A. VANDENHEUVEL, C. C. SWEELEY UND E. C. HORNING, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 3481.
- 4 R. NEHER, *Steroid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1964, S. 250.

J. Chromatog., 32 (1968) 222-229