

The present work was supported by a PHS Research Grant, HE 06818-06, from the National Institutes of Health, Bethesda, Md., U.S.A., and by a grant from the Finnish Medical Research Council.

Department of Medical Chemistry, University of Turku,
Turku 3 (Finland)

TAPIO NIKKARI
EERO HAAHTI

1 T. NIKKARI, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 17 (1965) *Suppl.* 85.

2 E. HAAHTI, K. LAGERSPETZ, T. NIKKARI AND H. M. FALES, *Comp. Biochem. Physiol.*, 12 (1964) 435.

3 E. HAAHTI AND H. M. FALES, *J. Lipid Res.*, 8 (1967) 131.

Received March 28th, 1968

J. Chromatog., 36 (1968) 244-246

CHROM. 3539

Eine dünnschichtchromatographische Schnellmethode zur Auftrennung der 17-Ketosteroide im Harn

Bildung der Trimethylsilyl-Äther und gaschromatographische Endbestimmung ist heute wohl die sicherste und eleganteste Methode zur Messung der einzelnen 17-Ketosteroide im Harn^{1,2}. Ist der instrumentelle Aufwand nicht gegeben, so sind auch dünnschichtchromatographische Methoden gerechtfertigt, die jedoch einfach und schnell sein müssen.

Die bislang beschriebenen dünnschichtchromatographischen Verfahren sind durch Verwendung von zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie oder vorgeschalteter Säulenchromatographie zu kompliziert^{3,4}. Andere sind nur halbquantitativ⁵, oder aber die Lokalisation der Steroide geschieht durch einfachen Vergleich mit Referenzsubstanzen auf Aluminiumoxydplatten^{6,7}. Da Aluminiumoxyd schwer zu standardisieren ist und auf der gleichen Platte schnell Aktivitätsunterschiede auftreten können, ist hier ein erheblicher Unsicherheitsfaktor gegeben.

Bei dem hier beschriebenen Verfahren wird Kieselgel G unter Zusatz eines Pyrenaufhellers (Fa. Bayer) verwendet. Dadurch lassen sich auch die nicht U.V.-absorbierenden 17-Ketosteroide durch Eigenfluoreszenz bis zu Mengen von 0.01 µg auf Dünnschichtplatten nachweisen⁸.

Experimentelles

Hydrolyse. 40 ml Harn wurden mit Eisessig auf pH 4.5 eingestellt, mit 4 ml 1 M Acetatpuffer 4.5 und 12,000 Einheiten (Fishman) β-Glucuronidase (Fa. Schering) versetzt und 24 Std. bei 37° inkubiert.

In einer zweiten Serie wurde mit einem Enzympräparat aus *Helix pomatia* (Fa. Boehringer, Mannheim) hydrolysiert. Je Ansatz nahmen wir 0.15 ml der Enzymlösung, entsprechend 15,000 Einheiten (Fishman) β-Glucuronidase und 7,500 Einheiten (Whitehead) Arylsulfatase.

Die Steroide wurden mit 1 1/2 fachem Volumen Äther extrahiert, mit 10 ml

J. Chromatog., 36 (1968) 246-249

10 %iger Natronlauge und zweimal 20 ml Wasser gewaschen. Nach Entwässerung über Natriumsulfat wurden die Extrakte eingedampft.

Dünnschichtchromatographie. 10 g Kieselgel G (Fa. Merck) wurden mit einer Spatelspitze Pyrenaufheller P_0 (etwas 5 mg) und 20 ml Wasser verrührt und auf einer Platte von 20×20 cm manuell aufgetragen. Nach Aktivieren der Platte wurden bis zu 4 Harnextrakte strichförmig aufgetragen, gerahmt von einem Testsubstanzgemisch aus Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon. Nach einmaligem Entwickeln im System Chloroform-Aceton (80:20) wurden zwei Zonen markiert. Zone I (R_F 0.04-0.43) enthält die 11-Oxy-17-ketosteroide. Zone II (R_F 0.43-0.73) enthält Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon.

Das Kieselgel dieser Zonen wurde abgekratzt, mit etwas Wasser deaktiviert und dreimal mit 2 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden abgedampft und weiterverarbeitet.

Der Extrakt der Zone I wurde in dieser Untersuchung zur Gruppenbestimmung der 11-Oxy-17-ketosteroide der Zimmermannreaktion unterworfen⁹.

Der Extrakt der Zone II, der die 11-Desoxy-17-ketosteroide enthält, wurde, gerahmt von dem Testsubstanzgemisch auf eine *nicht* aktivierte Platte aufgetragen, die Platte 2 min über Wasserdampf (100°) geschwenkt und anschliessend sofort im Sinne einer Verteilungschromatographie in Methylenchlorid zweimal aufsteigend chromatographiert. Nach Trockenföhnen lassen sich die getrennten 11-Desoxy-17-ketosteroide des Harnextraktes und des Testsubstanzgemischs als helle Flecke auf bläulich fluoreszierendem Untergrund deutlich lokalisieren (Fig. 1). Die einzelnen Steroide wurden wie oben beschrieben eluiert und der Zimmermannreaktion unterworfen. R_F -Werte: Dehydroepiandrosteron 0.30, Androsteron 0.21, Ätiocholanolon 0.13.

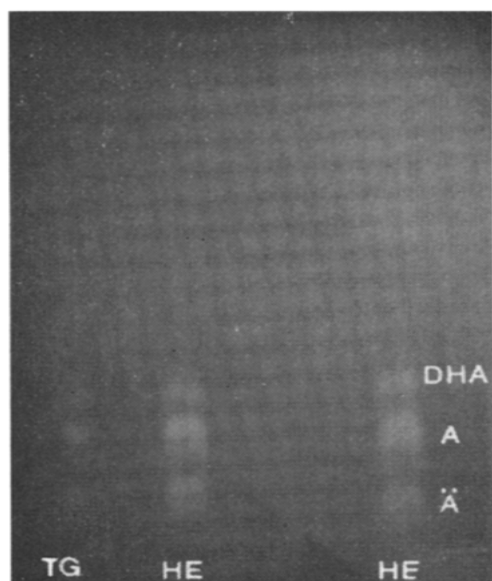


Fig. 1. Dünnschichtchromatographie zweier Harnextrakte (HE) und eines Testsubstanzgemischs (TG). DHA = Dehydroepiandrosteron; A = Androsteron; Ä = Ätiocholanolon.

Ergebnisse und Besprechung

Bei 20 gesunden Männern und 10 gesunden Frauen zwischen 20 und 35 Jahren wurden die Harn 17-Ketosteroide nach β -Glucuronidase Hydrolyse, bei weiteren 10

Männern nach Hydrolyse mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix Pomatia* bestimmt (Tabellen I und II).

TABELLE I

TAGESAUSSCHIEDUNG DER 17-KETOSTEROIDE IM HARN NACH β -GLUCURONIDASE HYDROLYSE
DHA = Dehydroepiandrosteron; A = Androsteron; \dot{A} = Ätiocholanolon; 11-KS = 11-Oxy-17-ketosteroide.

	DHA		A		\dot{A}		11-KS	
	mg/24 Std.	%	mg/24 Std.	%	mg/24 Std.	%	mg/24 Std.	%
Männer n = 20	0.45 s = \pm 0.42	6.1	1.90 s = 0.59	25.9	3.21 s = \pm 1.29	43.6	1.79 s = \pm 0.82	24.4
Frauen n = 10	0.37 s = \pm 0.23	6.1	1.56 s = \pm 0.44	25.8	2.32 s = \pm 1.11	38.4	1.8 s = \pm 0.83	29.7

Bekanntlich wird Dehydroepiandrosteron zum grössten Teil als Sulfatester im Harn ausgeschieden. Die für Dehydroepiandrosteron ermittelten Werte in Tabelle I sind deshalb auf unspezifische Spaltung zurückzuführen.

Da die Sulfatase aus *Helix Pomatia* nur $3\beta,5\alpha$ - oder $3\beta,5\alpha$ -Steroide spaltet¹⁰, wird in Tabelle II nicht die Androsteronsulfatfraktion erfasst. Für Ätiocholanolon und die 11-Oxy-17-ketosteroide ist dieses unbedeutend, da diese fast ausschliesslich als Glucuronide ausgeschieden werden¹¹.

TABELLE II

TAGESAUSSCHIEDUNG DER 17-KETOSTEROIDE NACH HYDROLYSE MIT β -GLUCURONIDASE/ARYL-SULFATASE AUS *Helix Pomatia*

	DHA		A		\dot{A}		11-KS	
	mg/24 Std.	%	mg/24 Std.	%	mg/24 Std.	%	mg/24 Std.	%
Männer n = 10	0.83 s = \pm 0.47	10.7	1.98 s = \pm 0.99	25.6	3.21 s = \pm 1.18	41.5	1.72 s = \pm 1.19	22.2

Unsere Fliessmittel sind so gewählt, dass die 11-Desoxy-17-ketosteroide der Harnextrakte nach der zweiten Chromatographie deutlich fluoreszieren, ohne von Pigmenten oder Verschmutzungen überlagert zu sein. Durch gleichzeitiges Mitchromatographieren von Referenzsubstanz ist eine zusätzliche Sicherheit in der Lokalisation gegeben. Für die dünnschichtchromatographisch schwer zu trennenden Substanzen Dehydroepiandrosteron und Androsteron erhielten wir durch die Wasser-sättigung der Platte gute Gangunterschiede.

Die in der Literatur berichteten Mittelwerte für die Hauptfraktionen der 17-Ketosteroide differieren erheblich. Für Männer finden sich Angaben von 0.6–2.6 mg/24 Std. für Dehydroepiandrosteron, 2.1–5.5 mg/24 Std. für Androsteron und 2.1–5.3 mg/24 Std. für Ätiocholanolon⁹.

Unsere Werte liegen etwa im mittleren Bereich, die prozentualen Anteile der einzelnen 17-Ketosteroide zeigen gute Übereinstimmung mit den Literaturangaben.

Bei Wiederauffindungsversuchen ($n = 5$) mit $50 \mu\text{g}$ Androsteron, die einen vorher analysiertem Harnextrakt zugesetzt wurden, liessen sich 101–82 % (Mittel 94 %) des zugesetzten Steroids im Endextrakt nachweisen. Bei Mehrfachbestimmungen ($n = 5$) von Ätiocholanolon an einer Harnprobe ergab sich ein Mittelwert von $94 \mu\text{g}/40 \text{ ml}$, mit einer Standardabweichung von $s = \pm 10.4 \mu\text{g}/40 \text{ ml}$ Harn. Die Spezifität der Methode ist durch definierte R_F -Werte, Fluoreszenz auf den Dünnschichtplatten und die Zimmermannreaktion gegeben.

Dank

Diese Arbeit wurde im Kreiskrankenhaus Schrobenhausen, Oberbayern, durchgeführt. Wir danken Herrn Chefarzt Dr. H. STREIFINGER für die Ermöglichung dieser Untersuchung. Herrn Prof. Dr. S. PETERSON, Leverkusen, danken wir für die Überlassung des Fluoreszenzindikators P_0 .

Institut für Physiologische Chemie,
Universität Düsseldorf (Deutschland)

KLAUS DEMISCH

- 1 I. S. HARTMAN UND H. H. WOTIZ, *Steroids*, 1 (1963) 23.
- 2 M. A. KIRSCHNER UND M. B. LIPSETT, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 23 (1963) 255.
- 3 B. L. HAMMAN UND M. M. MARTIN, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 24 (1964) 1195.
- 4 L. E. BÖTTIGER UND B. P. LISBOA, *Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.*, 5 (1967) 176.
- 5 F. DETTER, W. KOLLMEIER UND V. KLINGMÜLLER, *Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.*, 5 (1967) 153.
- 6 V. GRAEF UND H. J. STAUDINGER, *Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.*, 5 (1967) 314.
- 7 L. STÁRKA, J. ŠULCOVÁ, J. RIEDLOVÁ UND O. ADAMEC, *Clin. Chim. Acta*, 9 (1964) 168.
- 8 R. TSCHESCHE, G. BIERNOTH UND G. WULFF, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 342.
- 9 W. ZIMMERMANN, H. U. ANTON UND D. PONTIUS, *Z. Physiol. Chem.*, 289 (1952) 91.
- 10 P. JARRIGE, J. YON UND M. F. JAYLE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 45 (1963) 783.
- 11 L. O. PLANTIN UND G. BIRKE, *Acta Med. Scand.*, 148, Suppl. 291 (1954) 7.

Eingegangen den 18. März 1968

J. Chromatog., 36 (1968) 246–249