

CHROM. 4956

## Empfindlicher Nachweis von Östrogenen mit einem automatischen Leitfähigkeitsdetektor für die Dünnschicht-Chromatographie

Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit zum selektiven Nachweis dissozierender Substanzen wurde schon verwendet, das Dünnschicht-Chromatogramm von Indikatorfarbstoffen und Aminosäuren zu registrieren<sup>1</sup>. In der vorliegenden Arbeit soll die Anwendbarkeit dieser Methode zum empfindlichen Nachweis von Steroid-Östrogenen erprobt werden. Dabei wurden Östrogen-Reinsubstanzen sowie Harnextrakte untersucht.

Wir verwendeten eine modifizierte BN-Kammer<sup>2</sup>, wie sie in Fig. 5 der Arbeit von CREMER *et al.*<sup>1</sup> dargestellt ist. Auf einer  $5 \times 20$  cm Dünnschichtplatte wurde an den beiden Längsrändern das Adsorbens in einer Breite von 5 mm entfernt, um zwei Glasstäbe zur Einhaltung des Abstandes von 1 mm zur Deckplatte aufzulegen. In die Schicht wurden zwei Bahnen von 1 cm Breite eingeritzt. Auf jede dieser Bahnen konnten durch Löcher in der Deckplatte ein Paar Platinelektroden auf die Schicht gepresst werden. Die Elektroden (Durchmesser 0.8 mm, Abstand 1 mm) waren vertikal leicht verschiebbar in Teflonstopfen eingepasst. In einem Abstand von 2, 4 und 6 cm wurden in die Deckplatte weitere Teflonstopfen eingeschliffen, durch deren Bohrungen die Proben mit einer  $1\text{-}\mu\text{l}$  Hamilton-Spritze aufgetragen werden konnten. Das Fliessmittel wurde mit einer Filterpapierbrücke eingeführt und verdunstete beim Austritt aus der "zweidimensionalen Säule", die auf diese Weise kontinuierlich durchflossen wurde.

Nach der Probenaufgabe wurden die einzelnen Komponenten eines Substanzgemisches auf der Säule getrennt und durchwanderten nacheinander den Raum zwischen den Messelektroden. Die Widerstände der beiden Elektrodenpaare wurden mit Hilfe einer Wheatstoneschen Brücke abgeglichen. An das Brückeninstrument

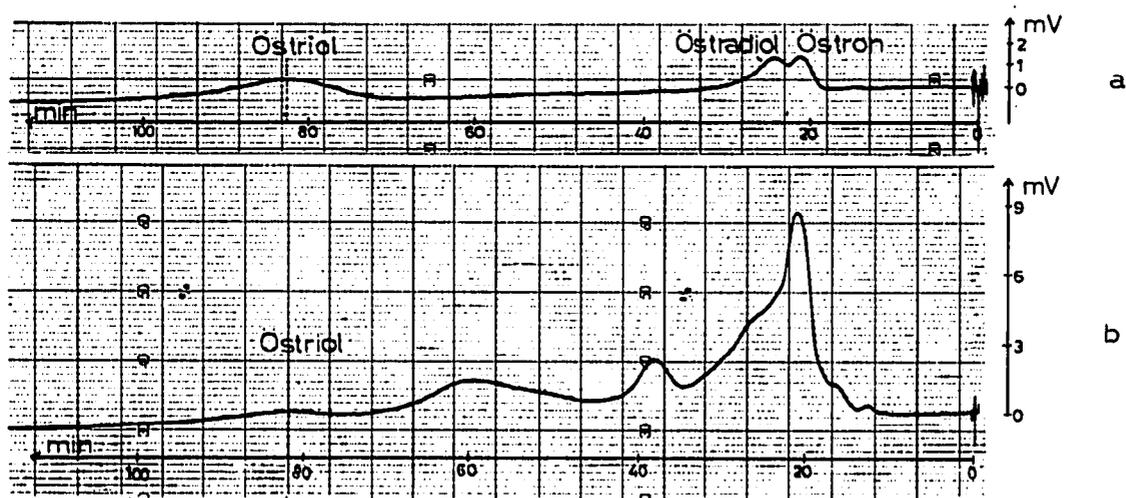


Fig. 1. Dünnschicht: Kieselgel H. Abstand Probenaufgabe-Elektroden ("Säulenlänge"): 6 cm. Fliessmittel: Methylisobutylketon, wasser-gesättigt. Widerstände der beiden Elektrodenpaare:  $80\text{ M}\Omega$ . Probe: (a) je  $0.3\text{ }\mu\text{g}$  Östron, Östradiol- $17\beta$  und Östriol ( $0.3\text{ }\mu\text{l}$  einer  $0.1\text{-}\%$ igen Lösung der drei Östrogene im Fliessmittel); (b)  $0.3\text{ }\mu\text{l}$  aus  $0.5\text{-ml}$  Harnextrakt A.

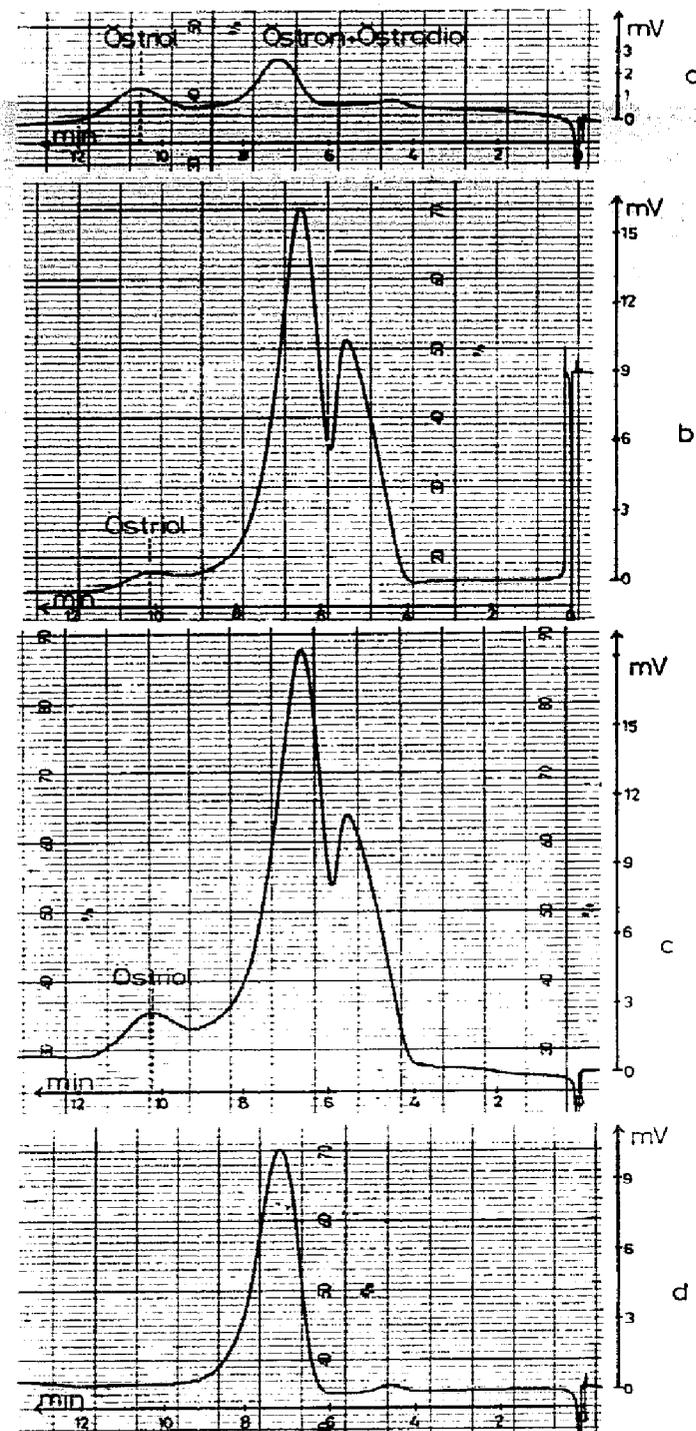


Fig. 2. Dünnschicht: Kieselgel-H. Abstand Probenaufgabe-Elektroden ("Säulenlänge"): 4 cm. Fließmittel: Aceton. Widerstände der beiden Elektrodenpaare:  $7\text{ M}\Omega$ . Probe: (a) je 20 ng Östron, Östradiol- $17\beta$  und Östriol (0.1  $\mu\text{l}$  einer 0.02-%igen Lösung der drei Östrogene im Fließmittel); (b) 0.1  $\mu\text{l}$  aus 1 ml Harnextrakt A; (c) = (b) + (a); (d) 0.1  $\mu\text{l}$  aus 1 ml Harnextrakt B.

(Keithley Elektrometer 602) war ein Kompensationsschreiber angeschlossen. Die Brückenspannung  $\Delta U$  ist bei symmetrischer Brücke der relativen Widerstandsänderung  $\Delta R/R$  proportional<sup>3</sup>:

$$\Delta U = \frac{U}{4} \cdot \frac{\Delta R}{R}$$

wobei  $U$  = Spannung der Gleichstromquelle (4.5 V).

Als Fließmittel wurden Ketone verwendet. Sie haben relativ hohe Dipolmomente (Aceton: 2.9 Debye) und Dielektrizitätskonstanten (Aceton: 20.7) und begünstigen so die Dissoziation der Östrogene mit ihren phenolischen OH-Gruppen.

Wir haben zwei verschiedene Harne untersucht\*. Harnextrakt A stammt von einer Frau im 8. Monat der Schwangerschaft, Harnextrakt B ist eine entsprechende Probe eines weiblichen Normalharns. Fig. 1a zeigt die Auftrennung der drei Östrogene Östron, Östradiol-17 $\beta$  und Östriol mit Methylisobutylketon, wasser-gesättigt, als Fließmittel. Fig. 1b zeigt das Chromatogramm der Trennung des Harnextraktes A. Die übrigen im Harn vorkommenden phenolischen Verbindungen treten in einer sehr viel grösseren Menge auf als das Östriol und verdecken die in sehr geringen Mengen vorhandenen Östrogene Östron und Östradiol, konnten aber von Östriol gut getrennt werden. Der Östriolpeak erscheint in diesem Falle erst bei etwa 80 min und ist dementsprechend stark verbreitert.

Mit Aceton als Fließmittel (Fig. 2a) wurden zwar Östron und Östradiol-17 $\beta$

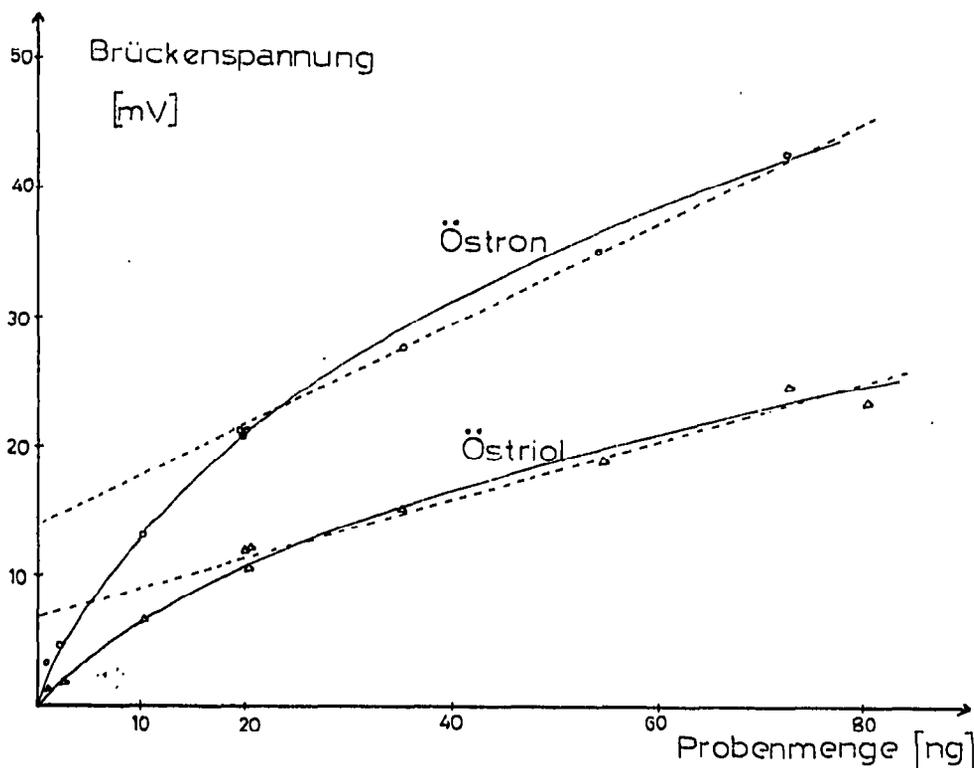


Fig. 3. Abhängigkeit der Brückenspannung  $\Delta U$  (mV) von der Probenmenge (ng) von Östron und Östriol.

\* Herr Dr. H. GLEISPACH, Universitäts-Kinderklinik, Innsbruck, stellte mir in dankenswerter Weise Harnextrakte zur Verfügung. Die 1/30 Menge des 24-h Harns wurde mit Salzsäure hydrolysiert. Der Ätherextrakt wurde mit alkalischen Puffern gewaschen, eingedampft und mit dem jeweiligen Fließmittel aufgenommen.

nicht aufgetrennt, der Östriolpeak aber dafür schon bei 10.5 min erhalten. Die Analysen können mit diesem Fließmittel sehr schnell ausgeführt werden. Das Chromatogramm in Fig. 2b zeigt wieder die Auftrennung des Harnextraktes A. In Fig. 2c wurde dem Harn A Östriol zugesetzt und eine Vergrößerung des Peaks bei 10.3 min registriert. In Fig. 2d wurde der Harnextrakt B aufgetrennt. Die phenolischen Verbindungen treten hier in geringeren Mengen auf, der Östriolpeak fehlt ganz.

In Fig. 3 wurden die Höhen der Peaks (in mV-Brückenspannung) gegen die Probenmenge (in ng) für Östron und Östriol aufgetragen. Als Fließmittel wurde Aceton verwendet, der Abstand Probenaufgabe-Elektroden betrug hier 4 cm. Die Brückenspannung ist nicht proportional der aufgegebenen Probenmenge. Die Abhängigkeit kann aber im Bereich von 20–80 ng durch eine Gerade dargestellt werden.

Das Fließmittel strömte kontinuierlich durch die Dünnschicht, sodass die Apparatur tagelang in Betrieb war. Ausserdem konnten ohne weiteres über dreissig Proben auf einer Platte bestimmt werden.

Mit der bisherigen einfachen Versuchsanordnung erreichten wir für die Östrogene eine Nachweisgrenze von 1 ng. Durch weitere Verfeinerung der Methode, namentlich durch Thermostatisierung, könnte man die Nachweisgrenze noch weiter senken. Bisher arbeitete man meist im  $\mu\text{g}$ -Bereich, durch fluorimetrische Auswertung ist auch ein Nachweis im ng-Bereich möglich, worüber auch OERTEL UND PENZES<sup>4</sup> jüngst berichteten. Auf Dünnschichtplatten konnten wir bisher 0.2 ng an Östrogenen gut nachweisen<sup>5</sup>.

*Physikalisch-Chemisches Institut der Universität  
Innsbruck, Innsbruck (Österreich)*

H. NAU

- 1 E. CREMER, TH. KRAUS UND H. NAU, *Z. Anal. Chem.*, 245 (1969) 37.
- 2 M. BRENNER UND A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 17 (1961) 237.
- 3 R. KAISER, *Gas-Chromatographie*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1960, S. 102.
- 4 G. W. OERTEL UND L. PENZES, *Vortrag auf der Tagung Biochemische Analytik 70, München 1970*.
- 5 E. CREMER, F. DEUTSCHER, P. FILL UND H. NAU, *J. Chromatog.*, 48 (1970) 132.

Eingegangen am 3. August, 1970

*J. Chromatog.*, 53 (1970) 391–394