

CHROM. 5408

## GASCHROMATOGRAPHISCHE SPURENANALYSE VON SCHILDDRÜSENHORMONPRÄPARATEN UND SCHILDDRÜSENHORMONHÄLTIGEN MEDIKAMENTEN

B. M. R. HEINL, H. M. ORTNER UND H. SPITZY

*Institut für Allgemeine Chemie, Mikro- und Radiochemie der Technischen Hochschule in Graz (Österreich)*

(Eingegangen am 9. April 1971)

---

### SUMMARY

*Gas chromatographic trace analysis of thyroid hormone preparations and of drugs containing thyroid hormone*

A quick and exact gas chromatographic routine method is described which is well suited for purity control of thyroid hormone preparations as well as for trace analysis of iodoamino acids in drugs containing thyroid hormone.

The derivation of iodoamino acids for gas chromatography by silylation with N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide proved to be advantageous. Isothermal gas chromatography was found best suited for qualitative and quantitative work. Quantitative evaluation was achieved by use of 3,5-diiodothyronine as internal standard. All iodothyronines and their isomers can be separated and determined quantitatively. Results on analysis of several commercially available iodoamino acid preparations are reported. Impurities of iodoamino acids of 0.01–0.05% can be identified using sample sizes of 2 mg. When using a flame ionisation detector the detection limit for thyronine and 3,5-diiodothyronine amounts to 5 ng, for thyroxine to 20 ng. Iodoamino acids with retention times between thyronine and thyroxine exhibit detection limits ranging from 5–20 ng, accordingly.

A procedure for the isolation of iodoamino acids from accompanying substances in drugs containing thyroid hormone was developed in order to carry out gas chromatographic analyses free of interferences. The method is based on the different sorption properties on ion exchangers of iodoamino acids and tableting materials, respectively. Results on analysis of drugs containing thyroid hormone are given.

---

### EINLEITUNG

Die grosse Bedeutung der Schilddrüsenhormonanalytik bei Diagnose und Behandlung von Schilddrüsenerkrankungen hat zur Ausarbeitung einer Vielzahl von Trenn- und Bestimmungsverfahren für die Schilddrüsenhormone geführt<sup>1</sup>. Einerseits sollen die Absolutmengen dieser Substanzen in biologischem Material ermittelt wer-

den, andererseits ist eine Reinheitskontrolle und Gehaltsbestimmung der zur Therapie von Schilddrüsenfunktionsstörungen verwendeten Jodaminosäurepräparate notwendig.

In beiden Fällen steht man vor dem Problem der Abtrennung kleinster Hormonmengen von einem riesigen Ballast an Begleitstoffen. Dabei stösst schon eine halbquantitative Erfassung von Jodaminosäurespuren in Schilddrüsenhormonpräparaten auf grosse Schwierigkeiten. Über die quantitative Analyse von schilddrüsenhormonhaltigen Medikamenten ist bisher nichts bekannt, obwohl Möglichkeiten zur Reinheitskontrolle von Schilddrüsenhormonpräparaten bisweilen diskutiert wurden<sup>2</sup>. Dünnschicht- und papierchromatographische Methoden vermögen keineswegs das gesamte interessierende Jodaminosäurespektrum zu erfassen und scheitern an der quantitativen Bestimmung sehr kleiner Jodaminosäuremengen. Die mit Erfolg zur Jodaminosäuretrennung im Blutserum entwickelte Ionenaustauschchromatographie ermöglicht die Auftrennung der Jodaminosäuren in zwei Gruppen entsprechend ihren  $pK_s$ -Werten<sup>3</sup>. Eine vollständige Auftrennung aller Jodaminosäuren und ihrer Isomeren durch Normaldruck-Flüssigkeitschromatographie wäre, sofern überhaupt möglich, mit sehr grossem experimentellen und zeitlichen Aufwand verbunden.

In der vorliegenden Arbeit wird über ein gaschromatographisches Verfahren zur Auftrennung sämtlicher Jodthyronine und Jodtyrosine sowie ihrer Isomeren berichtet, dass die quantitative Erfassung von Jodaminosäuren bis in den Bereich von 0.1% der Einwaage ermöglicht. Die Gesamtanalyse eines Jodaminosäure-Reinpräparates dauert einschliesslich Einwaage und Auswertung 5 h. Eine Gehaltsbestimmung von Schilddrüsenhormonen in Tabletten gelingt in 8 h.

Übersicht der im folgenden Text verwendeten Abkürzungen:

GC	= Gas-Chromatographie
FID	= Flammenionisationsdetektor
ECD	= Electron capture detector
BSA	= N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
TMCS	= Trimethylchlorsilan
TMS	= Trimethylsilyl
LM	= Lösungsmittel
HAc	= Essigsäure
JAS	= Jodaminosäure(n)
Th	= Thyronin
T <sub>1</sub>	= 3-Monojodthyronin
T <sub>1</sub> '	= 3'-Monojodthyronin
T <sub>2</sub>	= 3,5-Dijodthyronin
T <sub>2</sub> '	= 3,3'-Dijodthyronin
T <sub>2</sub> ''	= 3',5'-Dijodthyronin
T <sub>3</sub>	= 3,3',5-Trijodthyronin
T <sub>3</sub> '	= 3,3',5'-Trijodthyronin
T <sub>4</sub>	= Thyroxin

## MATERIAL UND METHODIK

### Reagenzien

BSA und Pyridin (silylation grade) wurden von Pierce Chemical Company,

Box 117, Rockford, Ill., U.S.A. bezogen; TMCS von Eastman Organic Chemicals, Rochester 3, N.Y., U.S.A.; Methanol,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , KJ und NaOH (alle p.A.),  $\text{J}_2$  (doppelt sublimiert) und KOH,  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  und  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  (chemisch rein) von Merck, Darmstadt, B.R.D.; Squalen prakt. von Fluka, Basel, Schweiz; BASF-Katalysator R3-11 von BASF, Ludwigshafen, B.R.D.; Sephadex G-25 fine von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

Die Ionenaustauscher Sephadex QAE, A-25,  $\text{Cl}^-$ -Form, (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und AG 50W X2, 100-200 mesh,  $\text{H}^+$ -Form, (Bio-Rad, München, B.R.D.) kamen zum Einsatz.

Die Aminosäuren wurden bezogen von Merck, Darmstadt, B.R.D. ( $\text{T}_2$ ,  $\text{T}_3$  und  $\text{T}_4$ ), Sanabo, Wien, Österreich ( $\text{T}_3$  und  $\text{T}_4$ ), Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz ( $\text{T}_2$ ), Henning, Berlin, B.R.D. ( $\text{T}_3$  und  $\text{T}_4$ ), Warner Lambert Research Institute, Morris Plains, N.J., U.S.A. ( $\text{T}_1$  und  $\text{T}_3'$ ) und von Schuchardt, München, B.R.D. (Th).

Die radioaktiv markierten Verbindungen  $^{125}\text{J}-\text{T}_3$ ,  $^{125}\text{J}-\text{T}_4$ ,  $^{131}\text{J}-\text{T}_4$  und stabilisatorfreies  $^{131}\text{J}-$  wurden von The Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen.

### Geräte

Verwendet wird ein Philips-Pye-Unicam GC, Modell 84, ausgestattet mit FID und ECD, zwei 1-mV Schreibern von Philips, Modell PM 8000. Die Trennsäule besteht aus Glas und ist mit einem Spezial-Glas-Metallübergang am Ausgang zum Detektor versehen. Zur katalytischen Jod-Bestimmung wird eine von KNAPP UND SPITZY beschriebene Apparatur verwendet<sup>4</sup>. Die Aktivitätsmessungen erfolgen mit einer Zählgerätkombination der Berthold-Frieseke-Vertriebsgesellschaft mit Bohrloch-Szintillationskristall in Verbindung mit einem 100-Kanal-Gamma-Spektrometer, TMC Gammascopie II in Einkanalschaltung ( $^{125}\text{J}$ : 0.027 MeV  $\text{K}\alpha$ - $^{125}\text{Te}$ ;  $^{131}\text{J}$ : 0.36 MeV).

### Entwicklung der Methode

In der Literatur werden mehrere Möglichkeiten für die zur gaschromatographischen JAS-Trennung notwendige Derivatisierung beschrieben<sup>5-7</sup>. In Vorversuchen wurden die N,O-Bis(trimethylacetyl)- und N,O-Bis(trifluoroacetyl)-Derivate der Methylester der JAS präpariert und chromatographiert. Dabei waren Trennung und Reproduzierbarkeit gut. Da die Herstellung dieser Derivate jedoch in zwei Stufen erfolgt und etwa 3 Std. erfordert, wurde die Silylierung mit BSA den anderen Methoden vorgezogen.

BSA reagiert bei 50° mit allen drei funktionellen Gruppen der JAS quantitativ in 5 min<sup>7,8</sup>.

Zur Analyse der TMS-Derivate der JAS wurde zunächst nach einer Vorschrift von HANSEN<sup>8</sup> (Temperaturprogramm, Squalen als innerer Standard) verfahren, jedoch war dabei im Spurenbereich (eingespritzte JAS-Mengen unter 1  $\mu\text{g}$ ) keine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit qualitativer und quantitativer Daten zu erreichen. In der Folge wurde unter isothermen Bedingungen und mit  $\text{T}_2$  als innerem Standard gearbeitet. Es erwies sich als notwendig, die Erstellung der Eichkurven und die Analyse unter möglichst ähnlichen Bedingungen auszuführen, d.h. die Menge des inneren Standards und des Silylierungsgemisches sowie das Einspritzvolumen sind nach Möglichkeit nicht zu ändern. Unter diesen Voraussetzungen ist die Analyse wesentlich besser reproduzierbar als bei Anwendung eines Temperaturprogrammes

Die Bestimmung von Schilddrüsenhormonen in Tablettenmaterial ist wegen des hohen Überschusses an Begleitstoffen auf direktem gaschromatographischem Wege nicht möglich. Deshalb wurde eine flüssigkeitschromatographische Methode ausgearbeitet, die es gestattet, diese Begleitstoffe quantitativ bei mehr als 90% JAS-Ausbeute abzutrennen. Das Verfahren beruht auf den unterschiedlichen Sorptions-eigenschaften von Tablettenbegleitstoffen und Schilddrüsenhormonen an Ionenaustauschern. Durch kombinierte Anwendung eines stark basischen Anionenaustauschers und eines stark sauren Kationenaustauschers konnten Bedingungen für eine selektive JAS-Sorption ausgearbeitet werden. Dabei werden gleichzeitig alle bei der gaschromatographischen Bestimmung störenden Stoffe (Tablettenbegleitstoffe, Salze, schwer verdampfbare organische LM oder Säuren) abgetrennt. Die Wahl der günstigsten Austauscherkombination erfolgte nach Bestimmung von JAS-Verteilungskoeffizienten in batch-Versuchen an verschiedenen Ionenaustauschern mit  $^{125}\text{J}$ - bzw.  $^{131}\text{J}$ -markierten JAS.

*Präparation von JAS.*  $\text{T}_1$ ,  $\text{T}_2'$ ,  $\text{T}_2''$  und  $\text{T}_3'$  werden nach Vorschriften von ROCHE *et al.*<sup>9</sup> hergestellt.

*Herstellung von JAS-Lösungen.* Als LM wird ein Gemisch von 100 ml Methanol + 1 ml 25%igem  $\text{NH}_3$  verwendet.

*Herstellung der TMS-Derivate der JAS.* Alle Silylierungen werden mit einem Gemisch von Pyridin, BSA und TMCS im Verhältnis von 5 ml:2 ml:3 Tropfen durchgeführt. Einen 15 ml Einhalskolben (siehe Fig. 2), der die über  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  getrockneten JAS enthält, spült man mit trockenem  $\text{N}_2$  und verschliesst mit einem teflongeschützten Silikongummiseptum. Mit einer trockenen Injektionspritze führt man 200  $\mu\text{l}$  Silylierungsgemisch zu und erwärmt 5 min auf 50°. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur können die so erhaltenen Präparate sofort chromatographiert werden.

*GC-Bedingungen.* Eine 500 × 3 mm Glassäule, gefüllt mit 3% OV-17 auf Diatomite CQ, 80–100 mesh, vorgetestet von Pye-Unicam, England, wurde verwendet. Der Trägergasstrom war 40 ml  $\text{N}_2$ /min. Die Säulentemperatur für Th,  $\text{T}_1$  und  $\text{T}_2$  war 250° und für  $\text{T}_2$ ,  $\text{T}_3$  und  $\text{T}_4$  285°. Will man Th,  $\text{T}_1$  und  $\text{T}_2$  in  $\text{T}_3$ - oder  $\text{T}_4$ -Präparaten bestimmen, so eluiert man erstere isotherm (12 min bei 250°) und reinigt die Säule von  $\text{T}_3$  bzw.  $\text{T}_4$  durch Aufheizen auf 285° mit raschem Temperaturprogramm (24°/min).

Weitere Bedingungen waren: FID, 300°;  $\text{H}_2$ , 40 ml/min; Pressluft, 600 ml/min; Einspritzzone, 300°; Einspritzvolumen, 2  $\mu\text{l}$ ; Schreibervorschub, 10 mm/min. Sämtliche verwendeten Gase werden vor Gebrauch über Aktivkohle und Molekularsieb 5 Å gefiltert. Der verwendete Stickstoff wird zusätzlich über einen Kupferturm (BASF-Katalysator, 180°) von  $\text{O}_2$  befreit.

#### ANALYSENGANG FÜR SCHILDDRÜSENHORMONPRÄPARATE

##### *Qualitative Analyse*

Etwa 2 mg JAS werden genau eingewogen, silyliert und chromatographiert. Aus der Lage der Peaks und ihren Flächen kann die Art der Verunreinigungen erkannt und deren Menge abgeschätzt werden.

##### *Quantitative Analyse*

In ein Silylierungskölbchen gibt man eine in Methanol- $\text{NH}_3$  gelöste  $\text{T}_2$ -Menge

gleicher Größenordnung wie die der zu bestimmenden Verunreinigung. Bei den handelsüblichen, meist sehr reinen Präparaten, wird diese Menge etwa  $20 \mu\text{g}$  bei einer 2 mg JAS-Einwaage betragen. Verunreinigungen von 3% bis zu 0.1% liegen dann noch in jenem Teil der Eichkurve, der eine genaue Bestimmung zulässt.

Nach Verflüchtigen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer werden letzte Feuchtigkeitsspuren durch zweistündiges Trocknen des Rückstandes über  $\text{P}_4\text{O}_{10}/\text{KOH}$  bei 10 Torr entfernt. Anschliessend werden etwa 2 mg JAS genau eingewogen. Man silyliert, chromatographiert und bestimmt die Peakflächen. Bei der Auswertung ist zu beachten, dass die gemessene  $\text{T}_2$ -Peakfläche sich aus der Summe des zugesetzten und des im Präparat vorhandenen Dijodthyronins zusammensetzt. Der Berechnung der Peakflächenverhältnisse muss man aber jene Peakfläche zugrunde legen, die der zugesetzten  $\text{T}_2$ -Menge entspricht. Dazu zieht man die bei der qualitativen Analyse gemessene  $\text{T}_2$ -Fläche von jener bei quantitativer Analyse ab; der Unterschied in den JAS-Einwaagen wird durch einen Vergleich der Peakflächen der Hauptspezies berücksichtigt. Man bestimmt die Peakflächenverhältnisse JAS/ $\text{T}_2$  und erhält aus den Eichkurven die Gewichtsverhältnisse JAS/ $\text{T}_2$ , aus denen sich die JAS-Mengen in  $\mu\text{g}$  und weiters die JAS-Verunreinigungen in Gewichtsprozenten berechnen lassen.  $\text{T}_2$ -Reinpräparate können in ähnlicher Weise, jedoch mit  $\text{T}_3$  als innerem Standard, analysiert werden.

#### ARBEITSVORSCHRIFT FÜR DIE ANALYSE VON SCHILDDRÜSENHORMONHÄLTIGEN MEDIKAMENTEN

##### Reagenzien

Lösung 1: 0.05 N KJ.

Lösung 2: 0.05 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Lösung 3: 5 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Lösung 4: 2 N HCl.

Lösung 5: Methanol- $\text{H}_2\text{O}$  (50:50).

Lösung 6: Methanol-HAc- $\text{H}_2\text{O}$  (50:1:49).

Lösung 7: Methanol- $\text{NH}_3$  konz.- $\text{H}_2\text{O}$  (50:25:25).

##### Präparation von $^{131}\text{J}-\text{T}_3'$ und Reinigung von radioaktiv-markierten JAS

$^{131}\text{J}-\text{T}_3'$  wird aus  $10 \mu\text{g}$   $\text{T}_1$ , gelöst in etwa  $100 \mu\text{l}$  25%igem  $\text{NH}_4\text{OH}$  unter Zugabe von  $6.3 \mu\text{g}$   $\text{J}_2$ , gelöst in  $50 \mu\text{l}$  Methanol und 1 mCi träger- und stabilisatorfreiem  $^{131}\text{J}$ odid hergestellt. Nach einer Stunde Reaktionszeit liegt ein Gemisch von  $^{131}\text{J}$ odid,  $^{131}\text{J}-\text{T}_2'$  und  $^{131}\text{J}-\text{T}_3'$  vor, das flüssigkeitschromatographisch aufgetrennt wird. Auf eine Säule ( $8 \times 560$  mm), gefüllt mit Sephadex G-25, gequollen in 0.015 N NaOH, werden  $150 \mu\text{l}$  des Gemisches aufgegeben und mit 0.015 N NaOH eluiert. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt  $50 \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{h}$ . Fig. 1 zeigt die Elutionskurve eines Gemisches von  $^{125}\text{J}$ odid  $^{131}\text{J}$ odid,  $^{131}\text{J}-\text{T}_2'$ ,  $^{125}\text{J}-\text{T}_3$ ,  $^{131}\text{J}-\text{T}_3'$  und  $^{125}\text{J}-\text{T}_4$ . Da das nach obiger Vorschrift präparierte  $^{131}\text{J}-\text{T}_3'$  nur mit  $^{131}\text{J}-\text{T}_2'$  und  $^{131}\text{J}$ odid verunreinigt ist, kann durch Sammeln der Fraktionen 18-22 (Fig. 1) chromatographisch reines  $^{131}\text{J}-\text{T}_3'$  gewonnen werden. Nach entsprechender Verdünnung erhält man eine Lösung von  $20 \text{ ng } \text{T}_3'/\text{ml}$  mit einer Impulsrate von 20 000 Imp./min pro ml. Der  $\text{T}_3'$ -Gehalt wird durch katalytische Jod-Bestimmung mit der von KNAPP UND SPITZY beschriebenen Apparatur<sup>4</sup> ermittelt.

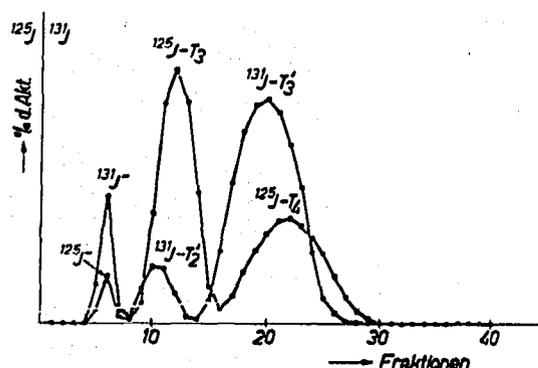


Fig. 1. Trennung von Radiojodid und radioaktiv-markierten Jodaminosäuren auf Sephadex G-25. Säulendimension,  $8 \times 560$  mm; Elutionsmittel,  $0,015$  N NaOH; Durchflussgeschwindigkeit,  $50$  ml/cm<sup>2</sup>·h; Volumen einer Fraktion,  $3$  ml.

$^{125}\text{J}-\text{T}_3$  und  $^{131}\text{J}-\text{T}_4$  (Amersham) enthalten  $^{125}\text{J}$ odid bzw.  $^{131}\text{J}$ odid und  $^{131}\text{J}-\text{T}_3$ . Beide Substanzen werden über Sephadex G-25 von ihren Verunreinigungen befreit und bei  $4^\circ$  in Dunkeln aufbewahrt.

#### Jodid-Bestimmung in JAS-Lösungen

Für die Jodid-Bestimmung radioaktiv markierter JAS-Lösungen bereitet man eine Säule ( $6 \times 20$  mm), die mit dem stark sauren Kationenaustauscher AG 50W X2, 100–200 mesh, H<sup>+</sup>-Form, gequollen in Wasser, gefüllt ist. Man lässt die Säule mit  $5$  ml  $1\%$ iger HAc-Lösung einlaufen. Die zu untersuchende JAS-Lösung wird mit  $10\%$ iger HAc angesäuert, sodass die Essigsäurekonzentration etwa  $1\%$  beträgt. Na-Acetat, das bei der Neutralisation einer an NaOH  $0,015$  N JAS-Lösung entsteht, stört die Jodid-Bestimmung nicht. Zur Abtrennung der JAS von dem zu bestimmenden Jodid gibt man  $1$  ml der Probelösung auf die AG-Säule. Während die JAS im essigsauren Medium quantitativ gebunden werden, wird Jodid vom Kationenaustauscher nicht zurückgehalten.

Man wäscht die Säule mit  $2 \times 4$  ml  $1\%$ iger HAc nach und sammelt das Jodid-Eluat in einem  $10$  ml Masskolben. Nach Auffüllen wird die Impulsrate von  $5$  ml gemessen. Zur Bestimmung der eingesetzten Aktivität pipettiert man das gleiche Volumen an Probelösung, das auf die AG-Säule gegeben wurde, in einen  $10$  ml Masskolben, füllt mit  $1\%$ iger HAc auf und entnimmt  $5$  ml zur Aktivitätsmessung. Die gemessene Impulsrate repräsentiert  $50\%$  der eingesetzten Aktivität. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass die bei  $^{125}\text{J}$  ins Gewicht fallende Selbstabsorption konstant gehalten wird.

#### Präparation der Austauschersäulen

Pro Analyse werden zwei Ionenaustauschersäulen vorbereitet. Die erste Säule wird mit Sephadex QAE, A-25, Cl<sup>-</sup>-Form, gequollen in Wasser, gefüllt, Säulendimension:  $8 \times 20$  mm.

Die Säule lässt man der Reihe nach mit folgenden Reagenzien einlaufen: (1)  $15$  ml Lösung 1, (2)  $6$  ml H<sub>2</sub>O und (3) kurz vor Gebrauch  $5$  ml Lösung 2.

Die zweite Säule wird mit AG 50W X2, 100–200 mesh, H<sup>+</sup>-Form, gequollen in Lösung 5, gefüllt. Säulendimension:  $8 \times 20$  mm. Die Säule lässt man mit folgenden Reagenzien einlaufen: (1)  $5$  ml Lösung 5 und (2) kurz vor Gebrauch  $10$  ml Lösung 6.

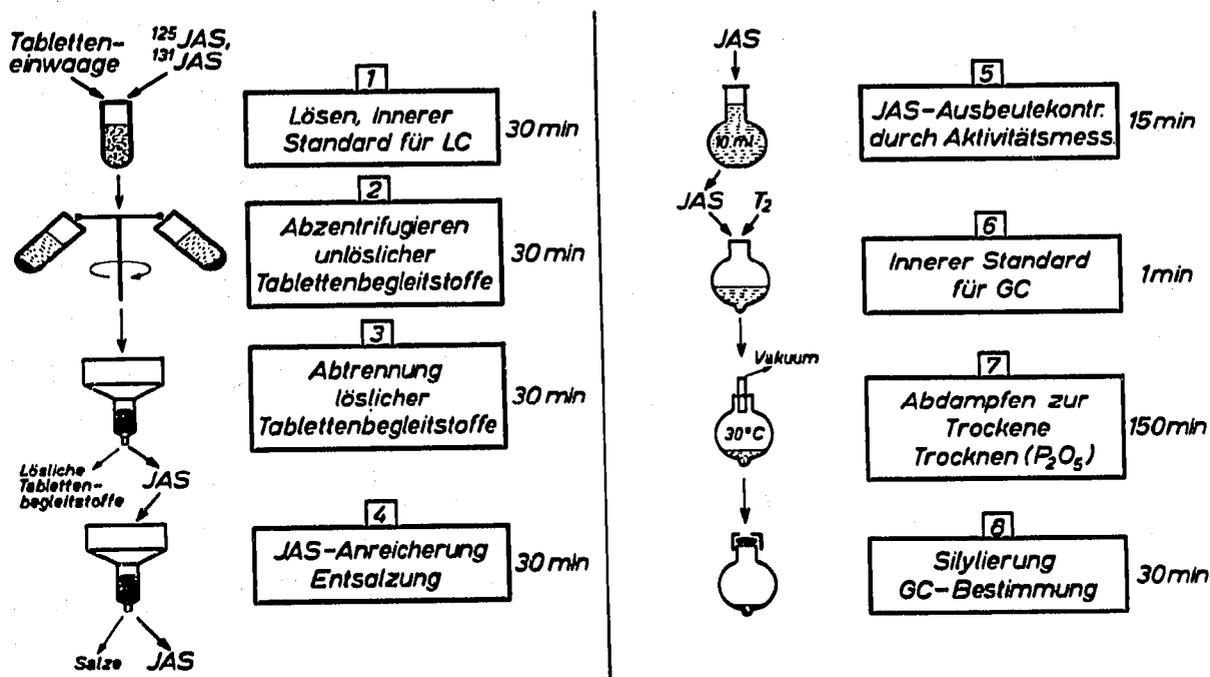


Fig. 2. Fließschema für die Analyse von schilddrüsenhormonhaltigen Medikamenten.

#### Abtrennung der Begleitsubstanzen (Fig. 2)

Sollen in einem Schilddrüsenhormonpräparat JAS-Spuren in der Größenordnung von 200–1000 p.p.m. bestimmt werden, geht man von einer Tablettenmenge von 1 g aus. In ein Zentrifugenglas gibt man die Tabletteneinwaage, 5 ml 0.05 N  $NH_4OH$  und 1 ml einer zuvor über Sephadex G-25 gereinigten  $^{125}J$ - oder  $^{131}J$ -markierten JAS-Lösung. Dieselbe Menge der markierten Hormonlösung pipettiert man in einen 10 ml Masskolben, füllt auf und entnimmt 2 ml zur Messung der Impulsrate. Diese repräsentiert 20% der eingesetzten Gesamtpulsrate.

Man löst das Tablettenmaterial unter kräftigem Schütteln, zentrifugiert unlösliche Niederschläge (Tablettierungsmittel) ab und wäscht letztere durch Suspensieren in  $2 \times 5$  ml der Lösung 2 und Abzentrifugieren JAS-frei.

Die vereinigten JAS-Lösungen werden auf die QAE-Säule aufgegeben, die zur Sorption der JAS dient, während die noch vorhandenen Tablettenbegleitstoffe und Kationen nicht zurückgehalten werden. Man wäscht die QAE-Säule mit 10 ml Lösung 5 nach, wobei gleichzeitig der Quellzustand des Austauschers auf Lösung 6 eingestellt wird. Zur quantitativen Elution der JAS sind  $2 \times 10$  ml Lösung 6 erforderlich. Da das essigsäure JAS-Eluat nicht rasch und verlustfrei verflüchtigt werden kann, wird es zur JAS-Anreicherung und Entfernung störender Anionen direkt auf die AG-Säule aufgegeben, an der Schilddrüsenhormone aus methanol-essigsäurem Medium sorbiert werden. Man wäscht mit 5 ml Lösung 5 nach, eluiert die JAS mit 9.5 ml Lösung 7 in einen 10 ml Masskolben und füllt mit Methanol auf. Zur JAS-Ausbeutebestimmung entnimmt man 2 ml, misst deren Impulsrate und vergleicht mit jener der eingesetzten JAS-Lösung. Enthält das Schilddrüsenhormonmedikament z.B. 200 p.p.m.  $T_3$  und 1000 p.p.m.  $T_4$ , so pipettiert man aus dem 10 ml Masskolben 5 ml für die  $T_3$ -, 2 ml für die  $T_4$ -Bestimmung in je ein Silylierungskölbchen und gibt zu beiden Kölbchen je 100  $\mu g$   $T_2$  als inneren GC-Standard. Das LM wird im Rotationsverdampfer ver-

flüchtig. Nach zweistündigem Trocknen der JAS-Rückstände über  $P_4O_{10}/KOH$  bei 10 Torr wird silyliert und chromatographiert. Die Berechnung der gaschromatographisch gefundenen JAS-Mengen in  $\mu g$  erfolgt durch Bestimmung der Peakflächenverhältnisse,  $JAS/T_2$ , aus denen über Eichkurven Gewichtsverhältnisse  $JAS/T_2$  erhalten werden. Die Berechnung der JAS-Gehalte, bezogen auf 1 g Tablettenmaterial, erfolgt nach der Formel:

$$T_3 = \frac{200 \cdot x}{E \cdot A} \text{ (p.p.m.)}$$

bzw.

$$T_4 = \frac{500 \cdot x}{E \cdot A} \text{ (p.p.m.)}$$

wobei

$x$  = gaschromatographisch gefundener JAS-Wert, in  $\mu g$

$E$  = Tabletteneinwaage, in g

$A$  = JAS-Ausbeute nach Abtrennung der Tablettenbegleitstoffe in %.

#### ERGEBNISSE

Die vorgeschlagene Methode zur Analyse von Schilddrüsenhormonpräparaten erlaubt die Auftrennung sämtlicher Jodthyronine einschliesslich des Thyronins (Fig. 3). Auch die isomeren Dijodthyronine und Trijodthyronine konnten getrennt werden. Die Peaks von  $T_1$  und  $T_1'$  werden erst bei Verwendung längerer Säulen vollständig aufgelöst. Die Retentionsindizes nach KOVATS der in Fig. 3 getrennten JAS werden in Tabelle I angegeben. Eichkurven für alle als Reinsubstanz zur Verfügung stehenden JAS mit Bezug auf 20, 50 und 100  $\mu g$   $T_2$  als inneren Standard wurden erstellt. Fig. 4 zeigt Eichkurven für  $T_3$ ,  $T_3'$  und  $T_4$  mit 20  $\mu g$   $T_2$  als innerem Standard. Besondere Beachtung verdient der gleiche Anstieg der  $T_3$ - und  $T_3'$ -Eichkurven. Die Reproduzierbarkeit der Peakflächenverhältnisse, bestimmt in drei Einzelversuchen, war besser als 2%. Die Analysenergebnisse eines repräsentativen Querschnittes der nach dem

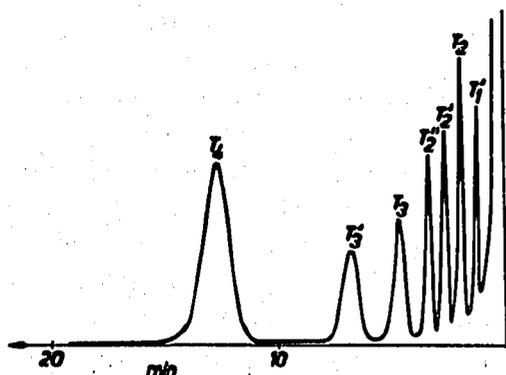


Fig. 3. Gaschromatographische Trennung jodierter Thyronine und ihrer Isomeren. FID, 300°, 40 ml  $H_2$ /min; Pressluft, 600 ml/min; Säule, 500 × 3 mm, gefüllt mit 3% OV-17 auf Diatomite CQ, 80–100 mesh; Säulentemperatur, 285°; Trägergasstrom, 40 ml  $N_2$ /min; Einwaagen, 50–500  $\mu g$  JAS, 200  $\mu l$  Silylierungsgemisch (BSA–Pyridin–TMCS, 2 ml: 5 ml: 3 Tropfen); Einspritzmenge, 2  $\mu l$ ; Elektrometerempfindlichkeit,  $1 \cdot 10^3$ ; Schreibervorschub, 10 mm/min.

TABELLE I

RETENTIONSINDIZES NACH KOVATS VON THYRONIN UND JODTHYRONINEN AUF 3% OV-17 BEI 285°

JAS	$I(i)_{OV-17}^{285}$ <sup>a</sup>	JAS	$I(i)_{OV-17}^{285}$
Th	2900 ± 15	T <sub>2</sub> ''	3760 ± 5
T <sub>1</sub> '	3310 ± 14	T <sub>3</sub>	3930 ± 5
T <sub>2</sub>	3550 ± 6	T <sub>3</sub> '	4097 ± 5
T <sub>2</sub> '	3660 ± 5	T <sub>4</sub>	4350 ± 5

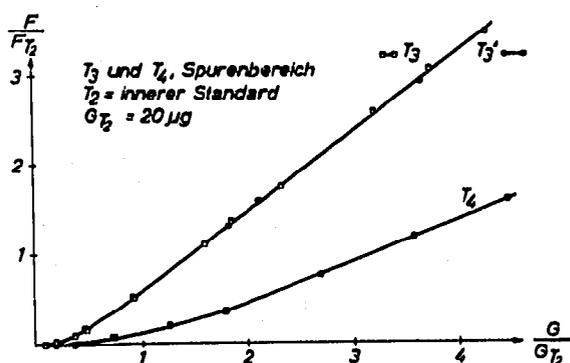
<sup>a</sup>  $I(i)_{OV-17}^{285}$  = Retentionsindex  $I$  der Substanz  $i$  auf OV-17 bei 285°.

Fig. 4. Eichkurven für T<sub>3</sub>, T<sub>3</sub>' und T<sub>4</sub>. F = Fläche, G = Gewicht. FID, 300°, 40 ml H<sub>2</sub>/min; Pressluft, 600 ml/min; Säule, 500 × 3 mm, gefüllt mit 3% OV-17 auf Diatomite CQ, 80-100 mesh; Säulentemperatur, 285°; Trägergasstrom, 40 ml N<sub>2</sub>/min; Einspritzmenge, 2 µl.

TABELLE II

ANALYSENERGEBNISSE VON SCHILDDRÜSENHORMONPRÄPARATEN

Angabe in Gewichtsprozenten.

Präparat	Th	T <sub>1</sub> + T <sub>1</sub> '	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> '	T <sub>2</sub> ''	T <sub>3</sub>	T <sub>3</sub> '	T <sub>4</sub>
3-DL-Monojodthyronin <sup>a</sup>	2.85		<0.1	<0.1	<0.4	<0.3	<0.6	<0.5
3,5-DL-Dijodthyronin <sup>b</sup>	<0.3	<0.25		<0.2	<0.1	<0.1	<0.03	<0.1
3,5-Dijodthyronin <sup>c</sup>	<0.05	<0.4		<0.4	<0.02	<0.07	<0.02	<0.01
3',3,5-Trijodthyronin <sup>c</sup>	<0.08	<0.02	<0.2	<0.1	<0.3		<0.7	<0.7
3',3,5-Trijodthyroninhydrochlorid <sup>d</sup>	<0.1	<0.02	<0.8	<0.1	<0.05		<0.25	1.0
3',3,5-Trijodthyronin <sup>e</sup>	<0.5	<0.2	<0.1	<0.1	<0.1		5.2	<0.1
3,3',5'-DL-Trijodthyronin <sup>a</sup>	<0.6	<0.5	<0.01	<0.2	2.8	<0.6		<0.5
L-Thyroxin-Na <sup>c</sup>	<0.06	<0.01	<0.02	<0.01	<0.01	<0.5	<0.4	
L-Thyroxin-Na <sup>d</sup>	<0.5	<0.07	<0.1	<0.03	<0.01	<0.7	1.5	
L-Thyroxin-Na <sup>d</sup>	<0.1	<0.1	<0.05	<0.05	<0.05	1.8	1.1	
D-Thyroxin-Na <sup>d</sup>	<0.2	<0.1	<0.06	<0.06	<0.06	<0.6	1.4	
L-Thyroxin-Na <sup>e</sup>	<0.5	<0.2	<0.25	<0.25	<0.1	1.0	6.1	

<sup>a</sup> Warner Lambert Research Institute, Morris Plains, N.J., U.S.A.<sup>b</sup> Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz.<sup>c</sup> Merck, Darmstadt, B.R.D.<sup>d</sup> Henning, Berlin, B.R.D.<sup>e</sup> Keine Angabe.

beschriebenen Verfahren untersuchten JAS-Reinsubstanzen werden in Tabelle II wiedergegeben. Im Bereich einer JAS-Beimischung zur Hauptsubstanz von *ca.* 1% betrug bei einer Einwaage von 2 mg die relative Standardabweichung der Analyseergebnisse durchschnittlich  $\pm 5\%$ , bei JAS-Spuren von *ca.* 0.1% betrug diese  $\pm 10\%$ . Die angegebenen relativen Standardabweichungen beziehen sich auf die Reproduzierbarkeit des Analysenverfahrens mit allen seinen Teilschritten. Bei Einsatz des FID lagen die Erfassungsgrenzen für  $T_3$  (Säulentemperatur 250°) und  $T_2$  (Säulentemperatur 285°) bei 5 ng, jene für  $T_4$  bei 20 ng. Die anderen Jodthyronine zeigten Erfassungsgrenzen von 5–20 ng.

TABELLE III

ANALYSENERGEBNISSE VON SCHILDDRÜSENHORMONHÄLTIGEN MEDIKAMENTEN

Angabe in p.p.m.

Präparat Nr.	$T_3$	$T_3'$	$T_4$
1	190/210	< 5	963/1013
2	161/178	< 20	725/793
3	182/166	< 20	708/646
4	175/158	< 20	675/614
5	180/164	< 20	552/612
6	29/34	< 3	172/141

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methodik konnte nicht nur eine Reinheitskontrolle von Schilddrüsenhormon-Reinsubstanzen, sondern auch eine JAS-Bestimmung in Schilddrüsenhormonmedikamenten durchgeführt werden. Die Analyseergebnisse mehrerer Medikamente sind in Tabelle III zusammengefasst.

Die Bestimmung von JAS in Tabletten war mit einer relativen Standardabweichung von besser als  $\pm 10\%$  bei JAS-Mengen von 200 p.p.m. möglich. Die angegebene relative Standardabweichung bezieht sich auf die Reproduzierbarkeit des Analysenverfahrens mit allen seinen Teilschritten.  $T_3$ - bzw.  $T_4$ -Eichproben wurden derselben Behandlung unterzogen wie Schilddrüsenhormonmedikamente und liessen sich mit Abweichungen geringer als 5% vom theoretischen Wert bestimmen.

## DISKUSSION

Bei Ausarbeitung der Methode und Auswahl der Analysenbedingungen wurde im Hinblick auf den routinemässigen Einsatz in pharmazeutischen Laboratorien grosser Wert auf eine möglichst einfache und zeitlich rationelle Durchführung gelegt. Daher kam zur Derivatisierung nur die rasch auszuführende Silylierung in Frage.

Bei Verwendung von Squalen als innerer Standard und Anwendung eines Temperaturprogrammes ist die Präzision quantitativer Resultate für einige JAS, insbesondere  $T_3$ ,  $T_3'$  und  $T_4$ , gering. Die schlechte Reproduzierbarkeit ist darauf zurückzuführen, dass die genannten JAS erst bei wesentlich höheren Temperaturen eluiert werden als Squalen und ihre Retentionszeiten zu sehr von der Bezugssubstanz abweichen. Daher erscheint Squalen für  $T_3$ ,  $T_3'$  und  $T_4$  als innerer Standard ungeeignet.

Die Anwendung eines Temperaturprogrammes erweist sich aus mehreren Gründen als wenig günstig:

(1) Eine gute Reproduzierbarkeit von Retentionsdaten ist nur durch präzise Einstellung der Anfangstemperatur möglich. Isotherme GC-Bedingungen garantieren verlässliche Retentionsdaten ohne langwieriges Stabilisieren der Anfangstemperatur.

(2) Zur Elution von  $T_3$  und  $T_4$  sind verhältnismässig hohe Säulentemperaturen erforderlich. Auch wenn man mit temperaturresistenten stationären Phasen (z.B. OV-17) arbeitet, ist ein "Bluten" der Säule unvermeidbar. Bei Temperaturprogram-

**Schilddrüsenhormon-Tabletten**  
200ppm  $T_3$     1000ppm  $T_4$

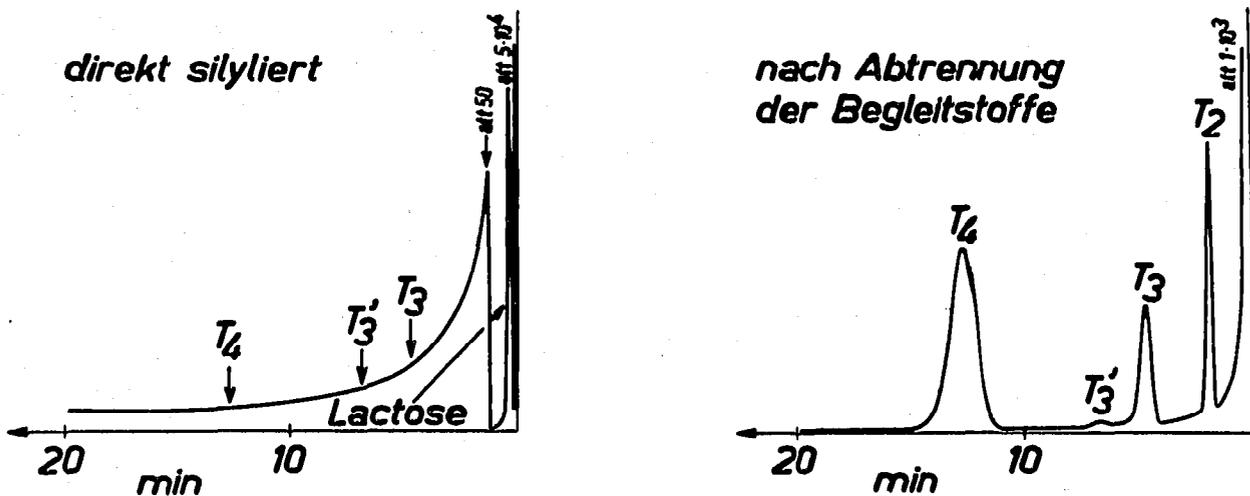


Fig. 5. Gaschromatographische Spurenanalyse von Jodaminosäuren in schilddrüsenhormonhaltigen Medikamenten. Für Bedingungen, siehe Unterschrift Fig. 4. Links: Tabletteneinwaage, 50 mg; 1 ml Silylierungsgemisch; Einspritzvolumen, 2  $\mu$ l. Rechts: Tabletteneinwaage, 500 mg; 200  $\mu$ l Silylierungsgemisch; Einspritzvolumen, 2  $\mu$ l.

men werden daher durch das Ansteigen der Basislinie Peaks von JAS-Spuren verzerrt, wodurch deren quantitative Erfassung erschwert wird. Durch Verwendung eines Doppel-FID könnte diese Basisliniendrift kompensiert werden.

(3) Im Vergleich zu isothermer Säulentemperatur erscheinen die Peaks von Spuren  $T_2$  oder  $T_3$  wesentlich verbreitert. Dadurch verschlechtert sich die Nachweisgrenze um eine Zehnerpotenz.

Bei isothermer Säulentemperatur liegt ein geringer Nachteil in der Notwendigkeit, für  $T_4$  und  $T_1$  bei einer anderen Temperatur zu arbeiten als für  $T_2$ ,  $T_3$  und  $T_4$ . Dieser Nachteil wird jedoch durch Vorteile im Routinebetrieb mehr als ausgeglichen.

Da sich Squalen für  $T_3$ ,  $T_3'$  und  $T_4$  nicht als innerer Standard eignet, musste eine andere Bezugssubstanz gefunden werden, wobei folgende Anforderungen an einen optimalen inneren Standard zu stellen sind:

(1) Die Struktur des inneren Standards soll der Struktur der zu bestimmenden JAS möglichst ähnlich sein.

(2) Das Retentionsvolumen des inneren Standards soll nach Möglichkeit in der Mitte der Retentionsvolumina der zu bestimmenden JAS liegen, d.h. der innere Standard soll sich für Thyronin sowie alle Jodthyronine gleich gut als Bezugssubstanz eignen.

(3) Es soll sich bei dem gewählten inneren Standard um eine Substanz handeln, deren funktionelle Gruppen ähnlich wie jene der JAS mit Silylierungsreagenzien reagieren, sodass eine Kontrolle der quantitativen Derivatbildung gegeben ist.

(4) Es soll sich um ein kommerziell leicht erhältliches, chromatographisch reines Präparat handeln.

(5) Der innere Standard soll nach Möglichkeit in der zu bestimmenden JAS nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorkommen.

(6) Das Retentionsvolumen des inneren Standards soll mit jenem der zu bestimmenden JAS nicht interferieren.

Alle angeführten Eigenschaften mit Ausnahme des Punktes (5) besitzt 3,5-Dijodthyronin. Für den Fall, dass geringe  $T_2$ -Mengen in einem zu analysierenden Präparat vorhanden sind, wird eine Korrektur angebracht, die im Analysengang beschrieben ist.

Bei der Spurenanalyse von JAS-Verunreinigungen in Schilddrüsenhormonpräparaten erwies es sich als notwendig, Parameter wie Menge des inneren Standards, Volumen des Silylierungsgemisches und der eingespritzten Probe sowie Empfindlichkeit der Elektrometereinstellung nach Möglichkeit bei der Eichung und bei der Analyse konstant zu halten, um optimale Präzision der Analysendaten zu erreichen. Eichkurven sollen für jenen Bereich erstellt werden, für den sie bei der Analyse tatsächlich gebraucht werden; sie sind nicht ohne grössere systematische Fehler auf andere JAS-Mengen übertragbar.

Die Identität aller bei Analysen gefundenen JAS, insbesondere der Isomeren des Mono-, Di- und Trijodthyronins, ist durch deren Präparation und Vergleich der Retentionsdaten gesichert.

Die Ergebnisse der Analysen von Schilddrüsenhormonmedikamenten waren erst nach Abtrennung der Tablettenbegleitsstoffe zufriedenstellend. Zwar wurde versucht, Tablettenmaterial direkt zu silylieren und einer GC-Analyse zu unterwerfen (Fig. 5), jedoch führte dieser Weg wegen des gegenüber dem JAS-Gehalt tausend- bis zehntausendfachen Überschusses an Ballaststoffen nicht zum gewünschten Erfolg. Die Methode zur Abtrennung der Tablettenbegleitsstoffe wurde auf Grund von batch-Versuchen durch Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von  $^{125}\text{J}$ - und  $^{131}\text{J}$ -markierten JAS auf verschiedenen Anionen- und Kationenaustauschern in verschiedenen Lösungsmittelsystemen ausgearbeitet. In Säulenversuchen wurde das Verfahren optimiert. Die Ausbeuten für  $T_3$ ,  $T_3'$  und  $T_4$  betragen durchschnittlich 90% oder mehr. Will man daher genaue Analysenergebnisse erzielen, so sind JAS-Ausbeutekorrekturen notwendig. Diese kann man für jede zu bestimmende JAS in einer gesonderten Einwaage ermitteln oder aber um Zeit zu sparen, gleichzeitig mit  $^{125}\text{J}$ - $T_3$  und  $^{131}\text{J}$ - $T_4$  Markierung bestimmen. Bei letzterer Methode muss man berücksichtigen, dass zwar die gemessenen  $^{131}\text{J}$ -Impulsraten von vorhandener  $^{125}\text{J}$ -Aktivität nicht beeinflusst werden; umgekehrt emittiert aber  $^{131}\text{J}$  auch niederenergetische Strahlung, die eine Messung von  $^{125}\text{J}$  stört. Eine  $^{125}\text{J}$ -JAS-Ausbeuteberechnung ist jedoch trotzdem leicht durchzuführen, indem man  $^{131}\text{J}$ -Proben auch bei der Gamma-Spektrometereinstellung für  $^{125}\text{J}$  misst und eine Korrekturkurve erstellt.

Im Handel nicht erhältliche markierte JAS wie z.B.  $^{131}\text{J}-\text{T}_3'$  können hergestellt werden, indem man die von ROCHE *et al.*<sup>9</sup> gegebenen Vorschriften dem Ansatz nach in den  $\mu\text{g}$ -Bereich überträgt. Die dabei erhaltenen JAS-Gemische werden nicht durch Umfällen von JAS-Niederschlägen, sondern flüssigkeitschromatographisch über Sephadex G-25 gereinigt, (Fig. 1).

Über G-25 gereinigte JAS-Tracer enthalten meist weniger als 0.1% Jodid. Trotz Lagerung im Dunkeln bei 4° steigt der Jodidgehalt jedoch nach einiger Zeit an. Bei Abtrennung der Tablettenbegleitstoffe wird ein Anionenaustauscher verwendet, der diese Jodidspuren bindet. Bei der folgenden JAS-Elution verbleibt das Jodid mit der ihm zugehörigen Impulsrate am Austauscher. Dadurch würde die radiometrische JAS-Ausbeutebestimmung verfälscht, sofern man den Jodid-Gehalt im Tracer nicht bestimmt und berücksichtigt.

Das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren zur Jodidbestimmung kann auch bei inaktiven JAS-Lösungen angewandt werden. Jodid wird nach der gegebenen Vorschrift von den JAS getrennt und nach Lit. 4 chemisch bestimmt.

Bei der Abtrennung der Begleitsubstanzen schilddrüsenhormonhaltiger Medikamente ist darauf zu achten, dass unnötig lange Kontaktzeiten der empfindlichen JAS mit dem Austauschermaterial vermieden werden. Den Analysengang darf man—sollte dies notwendig sein—erst nach Elution der JAS von der AG-Säule unterbrechen, da die Stabilität der JAS nur im ammoniakalischen Elutionsmittel bis zu 48 Std. gewährleistet ist. Das Eindampfen der JAS-Lösungen im Rotationsverdampfer hat rasch und schonend zu erfolgen, wobei nicht über 30° erhitzt werden soll.

Sämtliche Teilschritte des Verfahrens wurden vielfach durch Einsatz von JAS-Eichproben kontrolliert, die derselben Behandlung unterzogen waren wie die Schilddrüsenhormonmedikamente. Dabei wurden stets vernachlässigbare Abweichungen von den theoretischen Werten gefunden.

Die hier beschriebene Methode zur Analyse von Schilddrüsenhormonpräparaten und schilddrüsenhormonhaltigen Medikamenten steht derzeit im Routineeinsatz und wird zusätzlich für Stabilitätsuntersuchungen herangezogen.

#### DANK

Dem Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sei für den Ankauf des Gaschromatographen und des 100-Kanal-Gamma-Spektrometers gedankt. Herrn Robert I. MELTZER, Ph.D., Director of the Chemical Research im Warner Lambert Research Institute, Morris Plains, N.J., wird für die freundliche Überlassung von  $\text{T}_1$  und  $\text{T}_3'$ -Proben sowie für die Erlaubnis, die Analysenergebnisse zu veröffentlichen, gedankt. Die Autoren danken ferner den Firmen Merck, Henning und Hoffmann-La Roche für die freundliche Erlaubnis, Analysenergebnisse mit Angabe der Provenienz publizieren zu dürfen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über eine rasche und exakte gaschromatographische Routinemethode zur Reinheitskontrolle von Schilddrüsenhormon-Reinsubstanzen und zur Spurenanalyse von Jodaminosäuren in schilddrüsenhormonhaltigen Medikamenten berichtet.

Die zur gaschromatographischen Analyse erforderliche Derivatisierung der Jodaminosäuren erfolgt mit N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid. Es wird isotherm chromatographiert. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgt mit Bezug auf 3,5-Dijodthyronin als inneren Standard. Sämtliche Jodthyronine und die Isomeren des Dijod- und Trijodthyronins können getrennt und quantitativ bestimmt werden. Über die Analysenergebnisse mehrerer Jodaminosäure-Reinpräparate wird berichtet. Bei einer Einwaage von 2 mg Substanz können noch JAS-Spuren von 0.01–0.05% identifiziert werden. Die Erfassungsgrenzen bei Verwendung eines Flammenionisationsdetektors liegen für Thyronin und Dijodthyronin bei 5 ng, für Thyroxin bei 20 ng. Jodaminosäuren mit Retentionszeiten zwischen Thyronin und Thyroxin haben Erfassungsgrenzen zwischen 5–20 ng.

Für die gaschromatographische Analyse von schilddrüsenhormonhaltigen Medikamenten wurde ein Verfahren zur Abtrennung der Tablettenbegleitstoffe ausgearbeitet. Es beruht auf der verschiedenen Sorption von Jodaminosäuren und Tablettenbegleitmaterial an Ionenaustauschern. Analysenergebnisse von schilddrüsenhormonhaltigen Medikamenten werden mitgeteilt.

#### LITERATUR

- 1 J. ROBBINS AND J. E. RALL, *Hormones in Blood*, Vol. 1, Academic Press, London and New York, 1967.
  - 2 *Proc. Soc. Anal. Chem.*, 2, No. 6 (1965) 96.
  - 3 H. M. ORTNER, B. E. SCHREIBER AND H. SPITZY, *Z. Anal. Chem.*, 252 (1970) 260.
  - 4 G. KNAPP AND H. SPITZY, *Talanta*, 16 (1969) 1361.
  - 5 A. H. RICHARDS AND W. B. MASON, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 1751.
  - 6 P. I. JAAKONMÄKI AND J. E. STOFFER, *J. Gas Chromatogr.*, 5 (1967) 303.
  - 7 N. M. ALEXANDER AND R. SCHEIG, *Anal. Biochem.*, 22 (1968) 187.
  - 8 L. B. HANSEN, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 1587.
  - 9 J. ROCHE, R. MICHEL AND W. WOLF, *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 239 (1954) 597.
- J. Chromatogr.*, 60 (1971) 51–64