

CHROM. 5537

DAS PRODUKT AUS DURCHBRUCHSZEIT UND PEAKHÖHE ALS
MENGENMASS BEI DER GASCHROMATOGRAPHISCHEN BESTIMMUNG
VON STEROIDEN

HORST HUCK

*Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität, Innsbruck (Austria)**Eingegangen am 25. Mai 1971; geänderte Fassung am 1. Juli 1971*

SUMMARY

Quantitative evaluation of gas chromatographically separated steroids from the products of breakthrough time and peak height.

Several steroids were separated by gas chromatography using flame ionisation detection. The peaks obtained were evaluated quantitatively from the products of peak height, breakthrough time and a correction factor (ratio of molecular weight to carbon number). The standard deviation in this procedure was found to be 4.8% with free steroids, 6.0% with the acetates and 10.5% with the trimethylsilyl ethers. Thus the quantitative determination of several steroids in one chromatogram is possible without integration of the peak areas and with the use of one standard only.

EINFÜHRUNG

Die quantitative Auswertung eines Gas-Chromatogrammes erfolgt meistens über die Peakflächen, die nach Anbringung stoffspezifischer Korrekturfaktoren ein Mass der aufgegebenen Mengen sind. Die Peakflächen werden dabei mit der erforderlichen Genauigkeit mittels mechanischer oder besser elektronischer Integratoren bestimmt. Nicht immer steht jedoch ein Integrator zur Verfügung. In solchen Fällen ist die Flächenbestimmung nach der Dreiecksmethode¹, Peakhöhe mal Halbwertsbreite, $h \cdot b_1$, nur dann zuverlässig, wenn der Schreibervorschub gross genug gewählt wird, um die Halbwertsbreite mit einem Lineal genau messen zu können. Bei engen Peaks ist es vorteilhafter, anstelle der Halbwertsbreite die ihr unter bestimmten Bedingungen proportionale Durchbruchzeit t_{df} zu verwenden, die sich als Strecke vom Ort der Aufgabe bis zum Peakmaximum angeben lässt. Das Mass der aufgegebenen Menge ist dann Peakhöhe mal Durchbruchzeit, $h \cdot t_{df}$, worauf bereits PESCOR² hinwies, und was später am Beispiel der Analyse eines Pfefferminzöls von BARTLET UND SMITH³ bei nur teilweise getrennten Peaks und bei der Analyse von Fettsäureestern von CARROLL⁴ experimentell bestätigt wurde. Eine relativ gute Übereinstimmung der linearen Beziehung zwischen b_1 und t_{df} wurde auch bei homologen Substanzen gefunden. Bei Verwendung von Schreibern, die ihre Empfindlichkeit proportional zur Messzeit ändern, ergibt sich das Flächenmass schliesslich direkt aus der Peakhöhe^{5,6}. Dass die Halbwertsbreite eines symmetrischen Konzentrationsprofils von der aufge-

gegebenen Menge unabhängig und der Durchbruchzeit proportional ist, war bereits von CREMER UND MÜLLER¹ aufgezeigt worden. CREMER UND HAUPT⁷ benutzten die gemessene Peakhöhe als Mengengröße bei der Bestimmung von CO und CO₂, wobei die Durchbruchzeit in den empirisch bestimmten Proportionalitätsfaktor hineingenommen wurde.

In der vorliegenden Arbeit wird die Möglichkeit überprüft, beliebige Steroide und deren Derivate, wie Acetate und Trimethylsilyläther, nach ihrer gas-chromatographischen Trennung und ihrer Anzeige mittels Flammenionisationsdetektor (FID) quantitativ über das Produkt $h \cdot t_{0r}$ bei Verwendung nur eines Standards zu bestimmen, um bei medizinisch-chemischen Untersuchungen nicht nur ein rasches und zuverlässiges, sondern auch billiges Auswerteverfahren zur Verfügung zu haben.

EXPERIMENTELLES

Gas-Chromatograph

Die Untersuchungen wurden mit einem Perkin-Elmer Gas-Chromatographen, Modell 801 mit Doppel-FID, durchgeführt. Die Glassäule, Länge 180 cm, äußerer Durchmesser 3,2 mm, enthielt 3% NE-60 auf Gas-Chrom P. Die Säulentemperatur betrug bei den freien Steroiden und deren Acetate 235° und bei den Silyläthern 210°. Die Injektor- und die Detektortemperatur waren jeweils gleich der Säulentemperatur. Die Strömungsgeschwindigkeit von Stickstoff als Trägergas betrug immer 1 ml/sec. Vor dem FID wurde die Strömung im Verhältnis 1:1 geteilt.

Standardlösungen und Derivate

Von den einzelnen Steroiden wurden Lösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml in abs. Äthanol hergestellt. Die Silyläther wurden durch Umsetzung von je 1 mg eines Steroids mit 0,5 ml Hexamethyldisilazan und drei Tropfen Trimethylchlorosilan während 1 Std. bei 65° erhalten⁸. Bei dieser katalytischen Silylierung reagieren auch die sterisch gehinderten 11 β -Hydroxylgruppen⁹. Überschüssige Reagenzien wurden im Luftstrom, der zuvor über conc. H₂SO₄ und NaOH-Plätzchen getrocknet wurde, entfernt. Die Rückstände wurden in 1 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Zur Gewinnung der Acetate wurde je 1 mg eines Steroids mit 0,5 ml Essigsäureanhydrid und 0,1 ml Pyridin bei 50° 1 Std. stehen gelassen¹⁰. Die überschüssigen Reagenzien wurden wieder im trockenen Luftstrom bei 60° entfernt und die Rückstände in 1 ml Tetrachlorkohlenstoff aufgenommen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Unter Voraussetzung, dass keine Zersetzung in der Säule eintritt und eine lineare Anzeige vorliegt, lautet die Formel zur quantitativen Berechnung bei Verwendung eines äusseren Standards.

$$m_X = \frac{F_X \cdot f_X}{F_{St} \cdot f_{St}} m_{St} \quad (1)$$

m_X und m_{St} sind die Mengen der Substanz X bzw. des Standards St, F_X und F_{St} die entsprechenden Peakflächen und f_X und f_{St} die substanzspezifischen Korrekturfaktoren. Beim FID erzeugen gleiche Molmengen Kohlenwasserstoffe Ausschläge, die in

erster Näherung dem Kohlenstoffgehalt im Molekül proportional sind. Die Korrekturfaktoren sind dann proportional MG/n , dem Quotienten aus Molekulargewicht und der Kohlenstoffzahl im Molekül¹¹

$$f \sim \frac{MG}{n} \quad (2)$$

Gl. 1 lautet jetzt

$$m_X = \frac{F_X(MG_X/n_X)}{F_{St}(MG_{St}/n_{St})} m_{St} \quad (3)$$

Merkliche Abweichungen dieser Faktoren von Gl. 2 wurden bei Substanzen beobachtet, die sich sehr in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden¹². Da die Steroide diesbezüglich einander ähnlich sind, war zu erwarten, dass sich die genannten Korrekturfaktoren mit guter Näherung einsetzen lassen. Aus demselben Grund war auch anzunehmen, dass die Bodenzahl einer Trennsäule¹³ für die einzelnen Steroide konstant sein sollte, so dass bei symmetrischen Peaks somit auch die Voraussetzung für eine proportionale Beziehung zwischen b_1 und t_{Dr} bzw. zwischen $F \sim h \cdot b_1$ und $h \cdot t_{Dr}$ gegeben ist. Des weiteren sind die Durchbruchzeiten (Gesamtretentionszeiten) der Steroide gegenüber einem Inertgas relativ gross. Daher kann als eine weitere notwendige Voraussetzung die Diffusionsverbreiterung in der Gasphase vernachlässigt werden.

Die zur Mengenermittlung zu prüfende Formel lautet nun

$$m_X = \frac{h_X t_{Dr(X)}(MG_X/n_X)}{h_{St} t_{Dr(St)}(MG_{St}/n_{St})} m_{St} \quad (4)$$

TABELLE I

AUSWERTUNG FREIER STEROIDE NACH GL.5

Trennsäule: 3% NE-60 auf Gas-Chrom P, 235 .

Steroid	Relative Retentionszeit (Pregnandiol = 1,00)	f MG_X/n_X	$f_{relativ}$	$h \cdot t_{Dr}$ (cm ²)	$h \cdot t_{Dr} / f_{relativ}$ (cm ²)	A	A^2
5-Androsten-3 β ,17 β -diol	0,74	15,3	1,02	48,0	40,0	2,0	4,00
Dehydroepiandrosteron	0,84	15,1	1,00	47,7	47,7	0,7	0,49
trans-Androsteron	0,85	15,3	1,02	49,7	47,7	0,7	0,49
Pregnandiol	1,00	15,2	1,01	45,0	40,1	0,6	0,81
allo-Pregnandiol	1,01	15,2	1,01	44,2	44,0	2,4	5,76
5 β -Androstan-3,17-dion	1,12	15,1	1,00	42,3	42,3	4,7	22,09
Testosteron	1,55	15,1	1,00	47,1	47,1	0,1	0,01
11-Ketoandrosteron	1,68	16,0	1,06	45,2	47,8	0,8	0,64
4-Androsten-3,17-dion	1,85	15,0	1,00	47,0	47,0	0,0	0,00
11 β -Hydroxyandrosteron	2,16	16,1	1,07	47,2	50,4	3,4	11,56
				Mittelwert: 47,0			$\Sigma A^2: 45,85$

$$\sigma = \pm \sqrt{(45,85/9)} = \pm 2,26$$

$$h \cdot t_{Dr} \cdot f = 47,0 \pm 4,8\%$$

Bei gleichen Aufgabemengen sollte daher gelten

$$h_{\text{rel}} \cdot \text{rel}(x) / f_{\text{rel}} = \text{const.} \quad (5)$$

In den Tabellen I-III sind die bei einer Aufgabe von je 2 μg freier Steroide nach Gl. 5 ausgewerteten Peaks wiedergegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde mit relativen Korrekturfaktoren gerechnet. Die Steroide sind in der Reihenfolge ihrer

TABELLE II
AUSWERTUNG VON STEROID-SILYLÄTHER NACH GL. 5 UND 6
Frennsäule: 3% NE-60 auf Gas-Chrom P, 210°

Steroid	Relative Retentions- zeit (Pregnan- diol = 1,00)	f	MGX _{rel} · 10 ³ / f _{rel} · 10 ³	h _{rel} · 10 ³ (cm ²)	h _{rel} · 10 ³ / f _{rel} · 10 ³ (cm ²)	f	f ²
Åtlanolon	1,17	13,2	1,13	24,0	27,1	1,2	1,44
Dehydroepiandrosteron	1,30	13,1	1,12	27,0	30,2	1,0	3,00
trans-Androsteron	1,15	13,2	1,13	27,3	30,0	2,0	0,70
5-Pregnen-3 β -ol-20-on	2,02	13,2	1,13	29,8	39,3	2,0	4,00
3 β -Hydroxy-5 α -pregnan-20-on	2,13	13,2	1,13	24,8	28,0	0,3	0,09
Östron	2,22	12,8	1,09	28,0	31,2	2,0	8,41
Testosteron	2,51	13,1	1,12	29,1	29,2	0,0	0,81
11 β -Hydroxyandrosteron	2,93	12,2	1,04	21,3	22,2	0,1	37,24
Pregnantriolol	5,00	11,7	1,00	25,1	25,1	2,0	8,41
				Mittelwert: 28,3			$\Sigma f^2: 70,7$

$$\frac{\sigma}{h_{\text{rel}} \cdot f} = \frac{N(C) = 70,7(4,8)}{28,3 \cdot 10,5^{10}} = 2,97$$

TABELLE III
AUSWERTUNG VON ACETYLIERTEN STEROIDEN NACH GL. 5 UND 6
Frennsäule: 3% NE-60 auf Gas-Chrom P, 235°

Steroid	Relative Retentions- zeit (Pregnan- diol = 1,00)	f	MGX _{rel} · 10 ³ / f _{rel} · 10 ³	h _{rel} · 10 ³ (cm ²)	h _{rel} · 10 ³ / f _{rel} · 10 ³ (cm ²)	f	f ²
Åtlanolon	0,93	14,0	1,17	58,5	68,5	5,5	30,25
Androsteron	0,95	14,0	1,17	59,0	66,2	3,2	10,24
Dehydroepiandrosteron	0,72	13,7	1,14	59,5	57,0	5,4	29,16
Pregnantriol	1,00	12,8	1,07	60,7	65,0	2,0	4,00
Cholesterin	1,10	13,3	1,11	60,0	67,0	4,0	21,00
Östradiol	1,10	12,4	1,03	59,0	58,4	4,0	21,00
Östron	1,22	13,5	1,12	55,3	62,0	1,0	1,00
Östriol	2,00	12,0	1,00	59,1	59,1	3,0	15,21
				Mittelwert: 63,0			$\Sigma f^2: 132,0$

$$\frac{\sigma}{h_{\text{rel}} \cdot f} = \frac{N(C) = 132,0(8,7)}{63,0 \cdot 6,0^{10}} = 4,35$$

Durchbruchzeiten aufgeführt. Tabelle I enthält freie Steroide, Tabelle II Silyläther und Tabelle III Acetate von Steroiden. Bei Derivatbildung sind die Korrekturfaktoren der Gl. 2 entsprechend abzuändern. Es gilt analog

$$f_{\text{Derivat}} \sim \frac{MG_{\text{Derivat}}}{n_{\text{Derivat}}} \quad (20)$$

Bezieht man sich bei der Auswertung auf die freien Steroide, so muss noch mit einem stöchiometrischen Faktor $f_s = \frac{MG_{\text{freies Steroid}}}{MG_{\text{Derivat}}}$ multipliziert werden. Man erhält somit einen neuen Korrekturfaktor f^* , für den unter der Voraussetzung gleicher Ausbeutefaktoren geschrieben werden kann

$$f^* \sim f_{\text{Derivat}} \cdot f_s = \frac{MG_{\text{Derivat}}}{n_{\text{Derivat}}} \cdot \frac{MG_{\text{freies Steroid}}}{MG_{\text{Derivat}}} = \frac{MG_{\text{freies Steroid}}}{n_{\text{Derivat}}} \cdot \frac{MG_S}{n_D} \quad (6)$$

Aus den Tabellen I-III geht hervor, dass die Produkte nach Gl. 5 um einen Mittelwert schwanken. Bei den freien Steroiden beträgt die Standardabweichung $\pm 4,8\%$, bei den Acetaten $\pm 6,9\%$ und bei den Silyläthern $\pm 10,5\%$. Die höheren Standardabweichungen bei den Derivaten dürften auf Ausbeuteschwankungen zurückzuführen sein. Berücksichtigt man, dass es sich bei dieser Standardabweichung um Gesamtbeträge handelt, die noch Streuungen der Einwaage (Reinheit der Substanzen), der Ausbeute bei Derivatbildung und der Aufgabe enthalten, so folgt daraus, dass die über die substanzspezifischen Korrekturfaktoren und der Konstanz der Bodenzahl bzw. der Proportionalität zwischen b_1 und t_{Dr} gemachten Voraussetzungen gut erfüllt werden und Gl. 4 in der Praxis mit ausreichender Genauigkeit die quantitativen Berechnungen wiedergibt. Des weiteren kann bei übereinstimmenden oder nur geringfügig abweichenden Korrekturfaktoren der zu bestimmenden Substanzen und des Standards Gl. 4 in vereinfachter Form mit einem relativen Korrekturfaktor

$$\frac{MG_S/n_S}{MG_{Si}/n_{Si}} = 1 \quad \text{bzw.} \quad (7)$$

$$\frac{MG_S/n_D}{MG_{Si}/n_{D(Si)}} = 1 \quad (7a)$$

angewandt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Steroide wurden gas-chromatographisch getrennt und mittels Flammenionisationsdetektor angezeigt. Die erhaltenen Peaks wurden quantitativ über das Produkt von Peakhöhe, Durchbruchzeit und einem Korrekturfaktor (Verhältnis von Molekulargewicht zu Kohlenstoffenzahl) ausgewertet. Nach diesem Verfahren wurden bei jeweils gleicher Aufgabemenge bei den freien Steroiden eine Standardabweichung von $4,8\%$, bei den Acetaten von $6,9\%$ und bei den Silyläthern von $10,5\%$ gefunden. Folglich ist es möglich, die einzelnen Steroide eines Chromatogramms unter Benützung nur eines Standards quantitativ zu bestimmen, ohne die Peakfläche integrieren zu müssen.

LITERATUR

- 1 E. CREMER UND R. MÜLLER, *Z. Elektrochem.*, 55 (1951) 66, 217.
- 2 R. L. PECSOK, *Principles and Practice of Gas Chromatography*, Wiley, New York, 1959, S. 145.
- 3 J. C. BARTLET UND D. M. SMITH, *Can. J. Chem.*, 38 (1960) 2057.
- 4 K. K. CARROLL, *Nature*, 161 (1961) 377.
- 5 G. KATEMAN, *J. Chromatogr.*, 8 (1962) 280.
- 6 E. PALM, *Chromatographia*, 2 (1969) 213.
- 7 E. CREMER UND R. HAUPT, *Angew. Chem.*, 70 (1958) 310.
- 8 T. LUKKAINEN, W. J. A. VANDENHEUVEL, E. O. A. HAAMI UND E. C. HORNING, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 599.
- 9 K. B. EIK-NES UND E. C. HORNING, *Gas Phase Chromatography of Steroids*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.
- 10 H. H. WOTIZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 60 (1963) 415.
- 11 L. ONGKIEHONG, in R. P. W. SCOTT (Editor), *Gas Chromatography 1960*, Butterworths, London, 1960, S. 7.
- 12 H. HOLZHÄUSER, *Dissertation*, Karl-Marx-Universität Leipzig, Leipzig, 1964, S. 12, 42 und 50.
- 13 E. LEIBNITZ UND H. G. STRUPPE, *Handbuch der Gas-Chromatographie*, Geest und Portig K.-G., Leipzig, 1969.

J. Chromatogr., 62 (1971) 47-52