

CHROM. 5705

NEUE FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG VON TESTOSTERON AUS DEM URIN DURCH DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE DIREKT- AUSWERTUNG

D. EGG UND H. HUCK

*Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Innsbruck,
Innsbruck (Österreich)*

(Eingegangen am 9. September 1971)

SUMMARY

New fluorimetric determination of urinary testosterone by thin-layer densitometry

Testosterone and *epi*-testosterone were separated on thin layers of aluminum oxide. After heating the plates for 20 min at 180° testosterone and other Δ^4 -3-ketosteroids are characterized in long-wave ultraviolet light (366 nm) by a light blue fluorescence ($\lambda_{\text{max.}} = 440$ nm). This new reaction is very sensitive and allows the determination of small amounts of urinary testosterone by means of thin-layer densitometry without preliminary purification. The lower limit of detection was found to be about 5 ng.

EINLEITUNG

Auf Aluminiumoxid-Platten, die von dem E. Merck-Laboratorium zur Trennung von Testosteron und *epi*-Testosteron empfohlen werden¹, wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass nach dem Erhitzen derselben die Testosteronzonen unter langwelligem UV-Licht eine hellblaue Fluoreszenz aufwiesen. In diesem Falle waren keinerlei Sprühreagenzien verwendet worden. Systematische Untersuchungen ergaben daraufhin, dass es sich hier um eine gruppenspezifische Reaktion auf alle Δ^4 -3-Ketosteroide, wie Testosteron, *epi*-Testosteron, 4-Androsten-3,17-dion, Progesteron und diverse Corticosteroide handelt. Eine erheblich geringere Fluoreszenz zeigten auch Δ^5 -ungesättigte Steroide, wie 5-Androsten-3 β ,17 β -diol, Dehydroepiandrosteron, 5-Pregnen-3 β -ol-20-on und Cholesterin. Von zahlreichen anderen untersuchten Steroiden wurde nur noch das 5 β -Androstan-3,17-dion durch eine schwache Fluoreszenz angezeigt. Auf Kieselgelplatten hingegen konnte kein Steroid durch eine ausschliesslich thermische Behandlung, d.h. ohne Zuhilfenahme von Reagenzien, fluoreszent gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die neue gruppenspezifische Reaktion zur Bestimmung von Testosteron aus dem Urin nach enzymatischer Spaltung und Extraktion herangezogen. Eine sonst notwendige, mit Verlustfaktoren belastete Vorreinigung (siehe Lit. 2, 3 mit weiteren Literaturangaben) erübrigt sich, da die Aufgabemenge sehr klein gehalten werden kann. Diese Methode wird sich wegen

ihrer Einfachheit und geringen Zeitaufwandes bei relativ hoher Messgenauigkeit und guter Reproduzierbarkeit mit Vorteil bei der klinischen Diagnostik einsetzen lassen.

METHODIK

Aufarbeitung

30 ml des kühl aufbewahrten 24 h-Harnes wurden mit Eisessig auf pH 5 eingestellt und mit 2 ml 1 M Acetatpuffer von pH 5, 2 ml β -Glucuronidaselösung mit 10000 Fishman-Einheiten und 2 Tropfen Chloroform versetzt. Anschliessend wurde 15 h bei 45° inkubiert und die freigesetzten Hormone zweimal mit 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden nacheinander je zweimal mit 5 ml 0.1 N NaOH und mit 5 ml 0.1 N HCl gewaschen. Die über Na_2SO_4 getrocknete Lösung wurde im Vakuumtrockenschrank bei 40° eingedampft, der Rückstand mit 2 \times 3 ml Aceton in ein Spitzkölbchen überführt und das Aceton vorsichtig im trockenen Luftstrom abgeblasen.

Bei sehr niedrigen Testosteronwerten muss die Anwesenheit von Enzyminhibitoren angenommen und vor der enzymatischen Spaltung von diesen durch eine Sephadex-Extraktion⁴ oder durch eine Ammoniumsulfatfällung der Steroidkonjugate³ abgetrennt werden.

Dünnschichtchromatographische Trennung

Die dünnschichtchromatographische (DC)-Trennung wurde auf lufttrockenen Aluminiumoxidplatten F₂₅₄ (Typ T) der Fa. E. Merck, Schichtdicke 0.25 mm, in einer Trogkammer durchgeführt. Als Laufmittel bewährte sich Benzol-Essigsäureäthylester (1:1). Zur optimalen Trennung von Testosteron und *epi*-Testosteron empfiehlt es sich, ohne Kammersättigung bei nur einer Platte im Trog zu arbeiten. Unter diesen Bedingungen hatten die eingangs genannten Steroide folgende R_F -Werte: Corticosteroide einschliesslich Aldosteron 0, *epi*-Testosteron 0.34, Testosteron 0.42, 4-Androsten-3,17-dion 0.74, Progesteron 0.81; 5-Androsten-3 β ,17 β -diol 0.28, Dehydroepiandrosteron 0.48, 5-Pregnen-3 β -ol-20-on 0.52, Cholesterin 0.64 und 5 β -Androstan-3,17-dion 0.81. Daraus lässt sich die gute Abtrennung des Testosterons von den übrigen durch Fluoreszenz angezeigten Verbindungen entnehmen*.

Zur Testosteronbestimmung wurde der Abdampfrückstand in 100 μ l Äthanol gelöst, davon 4 μ l (2 \times 2 μ l unter Zwischentrocknung) mittels einer 10- μ l Hamiltonspritze auf die DC-Platte aufgetragen, ausserdem 0.1 μ g Testosteron als Standard. Entwickelt wurde bis zu einer Laufstrecke von 12 cm.

Um Testosteron anschliessend unter optimalen Bedingungen in eine fluoreszierende Verbindung zu überführen, wurde die lufttrockene Platte 20 min bei 180° auf einer abgedeckten Laborheizplatte mit einer Abmessung von 24 \times 24 cm² erhitzt.

Quantitative Direktauswertung der Fluoreszenz

Zur Abtastung der unter einer Quarzlampe markierten Fluoreszenz wurde ein "Camag-Z-Scanner"⁵ in Kombination mit einem Zeiss PMQ-II-Spektralphotometer mit Quarzoptik eingesetzt. Die Geräteeinstellung war folgende: Anregungswellenlänge 366 nm (durch Filter ausgesonderte Hg-Linie), Emissionswellenlänge 440 nm,

* Eine nahezu vollständige Trennung von Testosteron und *epi*-Testosteron konnten wir durch Zweifach-Entwicklung in der Reihenfolge Diäthyläther-Benzol (80:20), Benzol-Essigsäureäthylester (1:1) im abgedichteten Trog erreichen.

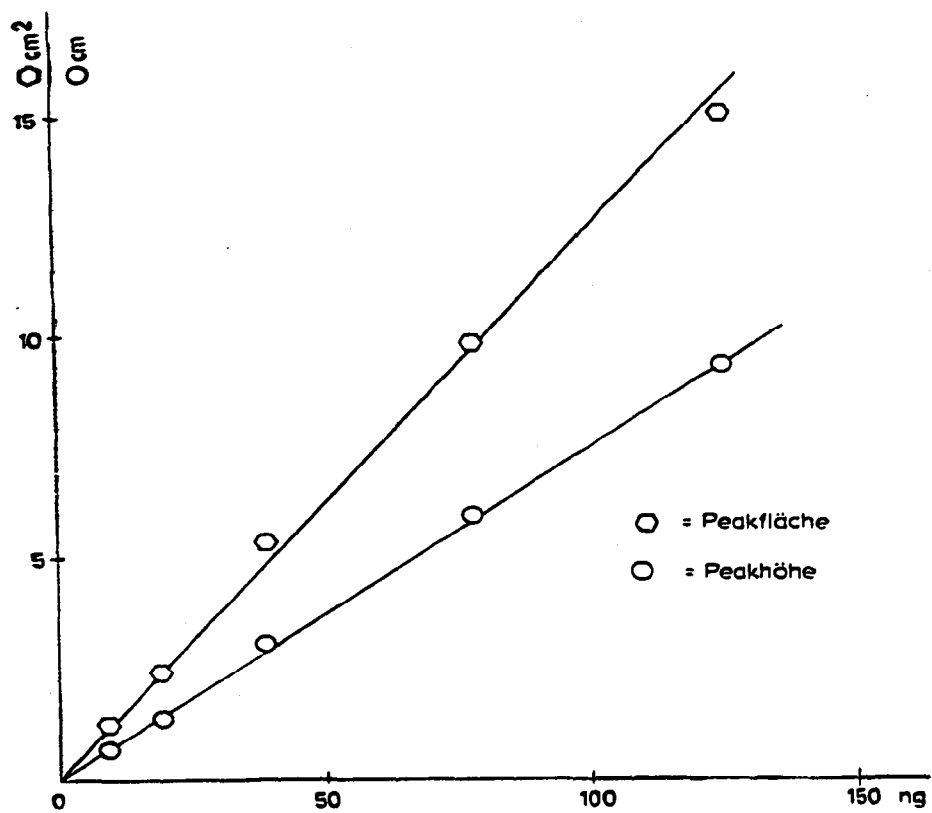


Fig. 1. Eichkurve der Fluoreszenzmessung bis 125 ng Testosteron.

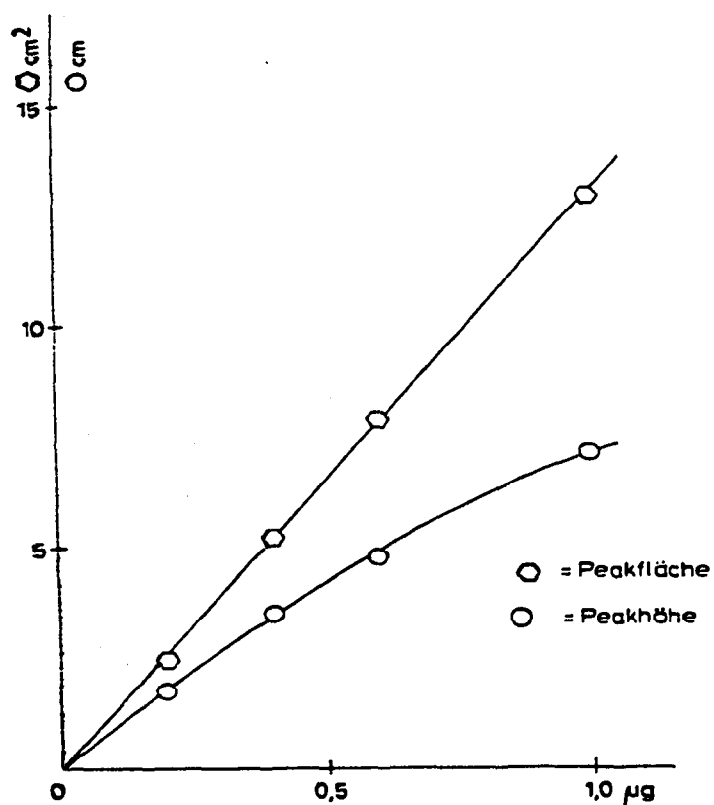


Fig. 2. Eichkurve der Fluoreszenzmessung im Bereich von 0.2-1.0 µg.

Blendenöffnung des Scanners und des Monochromators 1 bzw. 2 mm, Verstärkung bei Aufgabemengen unter 100 ng 1500×, Messvorschub 40 mm/min, Papiervorschub 30 mm/min, Schreibermessbereich 5 mV.

Zur Aufnahme einer Eichkurve wurden jeweils 2 µl verschieden konzentrierter Standardlösungen aufgegeben. Die Messung der Fluoreszenz nach Entwicklung und thermischer Umwandlung ergab eine streng proportionale Beziehung zwischen registrierter Peakfläche, ausgewertet als Produkt von Höhe und Halbwertsbreite, und der Menge im durchmessenen Bereich von 5 ng–1 µg (Fig. 1 und 2). Zur Auswertung der Peakflächen wurde ein Papiervorschub von 120 mm/min gewählt. Aber auch die Peakhöhe nahm linear bis 0.5 µg zu, sodass die quantitative Auswertung der Chromatogramme sehr einfach durchgeführt werden konnte.

Die Nachweisgrenze, definiert als die Menge beim doppelten Ausschlag des mittleren Nulllinienrauschens, kann mit etwa 5 ng angegeben werden.

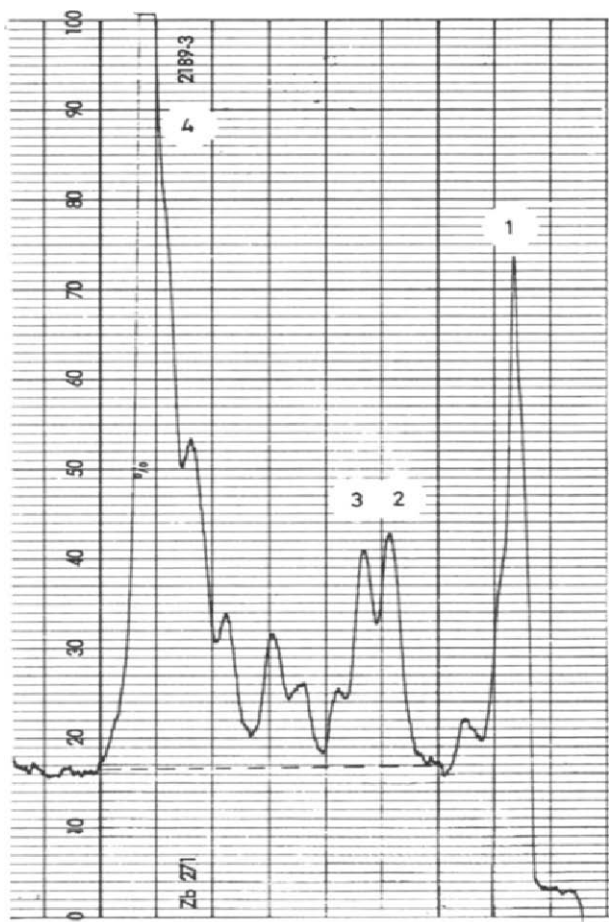


Fig. 3. Dünnschichtchromatogramm eines Urinextraktes, erhalten durch Fluoreszenzmessung. 1 = Auftragsstelle; 2 = *epi*-Testosteron; 3 = Testosteron (33 ng); 4 = Verunreinigung an der Lösungsmittelfront.

Fig. 3 zeigt ein durch Fluoreszenzmessung aufgenommenes Chromatogramm. Um die nach dem Auftragungsort erhöhte Untergrundstrahlung (Nulllinie) zu erfassen, muss in der Laufrichtung ausgewertet werden, aber keinesfalls senkrecht dazu.

Die Peakhöhe des Testosterons entspricht einer Aufgabemenge von 33 ng bei einer Testosteronausscheidung von 42 µg/24 h (Alter der Versuchsperson 35 Jahre).

ERGEBNISSE

Reproduzierbarkeit und Wiederfindung

Um eine Aussage über die Genauigkeit der Methode machen zu können, wurden vom 24 h-Harn einer weiblichen und einer männlichen Versuchsperson zehn bzw. fünf Proben zu je 30 ml entnommen. Die Ergebnisse der Testosteronbestimmungen sind in der Tabelle I aufgeführt. Die angegebenen Zahlenwerte geben auch bis auf eine sehr geringfügige Abweichung die auf die DC-Platte aufgetragenen Testosteronmengen in Nanogrammen an.

TABELLE I

MEHRFACHBESTIMMUNGEN ZUR FEHLERRECHNUNG

Reproduktions- nummer	Menge ($\mu\text{g}/\text{Tag}$)		Menge ($\mu\text{g}/1000\text{ ml}$)
	Harn I	Harn II	Harn I + Standard
1	7.3	32.0	85.0
2	4.6	29.6	82.5
3	6.4	29.0	96.9
4	7.3	32.6	88.7
5	7.4	36.3	94.4
6	5.5		
7	4.6		
8	4.6		
9	7.4		
10	4.6		
Mittelwert	6.0	31.9	89.5
S.D. (%)	± 1.4	± 2.9	± 6.1

Aus Tabelle I geht hervor, dass die Standardabweichung (S.D.) in eigenartiger Weise von der Menge m abhängig ist. Die graphische Darstellung dieses Zusammenhanges in Fig. 4 ergibt eine Gerade, die nicht durch den Nullpunkt geht.

Es gilt demnach folgende mathematische Beziehung:

$$\text{S.D.} = m_0 + km$$

mit $m_0 = 1.1\text{ ng}$ und $k = 0.056$. Die Standardabweichung setzt sich hier aus zwei Anteilen zusammen: m_0 als eine mengenunabhängige Grösse, welche auf das Nulllinienrauschen (Messfehler) zurückgeführt werden kann, und die der Menge proportionale Grösse km des Analysenganges. Bei $km \gg m_0$ nimmt S.D. den konstanten Wert von $\pm 5.6\%$ an. Die praktische Bedeutung dieser Gleichung besteht darin, die erforderliche Aufgabenmenge berechnen zu können, um eine vorgegebene Standardabweichung zu erhalten, wie z.B. 25 ng bei S.D. = $\pm 10\%$.

Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden vor der Extraktion zu fünf 30-ml Proben des Harnes I jeweils 3 μg Testosteron-Standard gegeben, entsprechend 100 $\mu\text{g}/1000\text{ ml}$, und daraus das Testosteron wie beschrieben bestimmt. Nach Tabelle I wurden $89.5 \pm 6.1\ \mu\text{g}/1000\text{ ml}$ wiedergefunden. Nach Abzug des Leerwertes von 5.7 $\mu\text{g}/1000\text{ ml}$ wird der korrigierte Wert von 83.8 $\mu\text{g}/1000\text{ ml}$ erhalten, was einer

Wiederfindung des zugesetzten Testosterons von 83.8 % entspricht. Zur Eliminierung dieses Verlustfaktors empfehlen wir, die quantitative Bestimmung über einen inneren Standard, z.B. 4-Androsten-3,17-dion, durchzuführen.

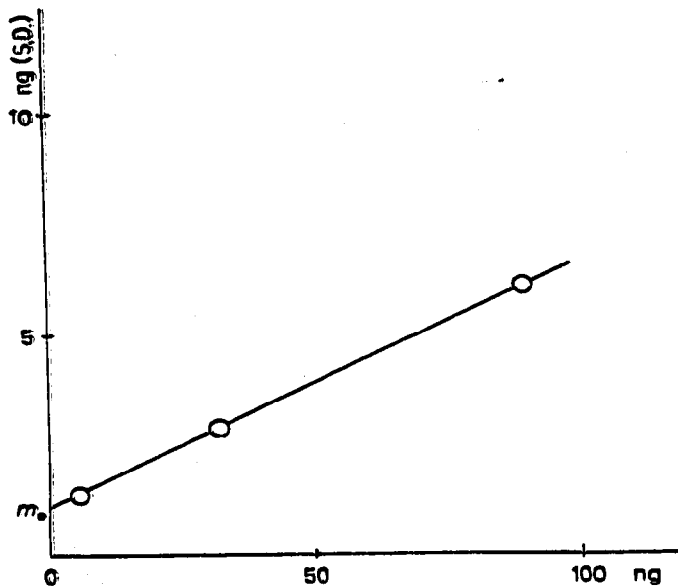


Fig. 4. Standardabweichung in Abhängigkeit von der Aufgabenmenge.

DISKUSSION

Insofern als die beschriebene Analysenmethode von einer gruppenspezifischen Reaktion ausgeht, ist die Wahrscheinlichkeit einer Überlagerung durch andere fluoreszierende Substanzen entsprechend gering. Durch zweidimensionale Entwicklung mit Benzol-Essigsäureäthylester (1:1) einerseits und Chloroform andererseits konnte auch keine weitere Auftrennung des Testosteronflecks beobachtet werden. Auch sprechen die Analysenwerte selbst gegen eine Überlagerung. Bei acht Normalpersonen wurden beispielsweise die in Tabelle II zusammengefassten Werte der Testosteronausscheidung gefunden.

TABELLE II

TESTOSTERONWERTE VON NORMALPERSONEN

Alter	Geschlecht	Menge ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)
15	M	37
16	M	53
30	M	40
35	M	42
40	M	32
33	F	6
34	F	12
55	F	7

Diese und andere bisher bestimmten Werte stimmen mit den mittels spektrophotometrischer und gaschromatographischer Methoden gewonnenen Normalwerten überein^{6,7}.

Andere gruppenspezifische Bestimmungsmethoden der Δ^4 -3-Ketosteroide, die ebenfalls ohne Besprühen der DC-Platte mit Reagenzien durchgeführt werden können, wie die Fluoreszenzlöschung⁸ und die UV-Remission², erfordern wegen ihrer wesentlich geringeren Empfindlichkeit grössere Probenmengen, die nicht mehr ohne säulenchromatographische oder DC-Vorreinigung aufgetragen werden können.

Da die beschriebene Umwandlung in fluoreszierende Verbindungen wohl auf Al_2O_3 nicht jedoch auf SiO_2 eintritt, kann angenommen werden, dass hierzu eine zumindest schwach basische Reaktion des Sorptionsmittels erforderlich ist.

DANK

Unser besonderer Dank gilt Fräulein J. HERMSEN für die gewissenhafte Aufarbeitung der Proben.

ZUSAMMENFASSUNG

Testosteron und *epi*-Testosteron wurden auf Aluminiumoxid DC getrennt. Nach dem Erhitzen der Platten während 20 min bei 180° werden Testosteron und andere Δ^4 -3-Ketosteroide unter langwelligem UV (366 nm) durch eine hellblaue Fluoreszenz ($\lambda_{\text{max.}} = 440 \text{ nm}$) angezeigt. Diese neue, sehr empfindliche Reaktion ermöglicht es, Testosteron aus dem Urin ohne Vorreinigung mittels DC Direktauswertung zu bestimmen. Die Nachweisgrenze kann mit etwa 5 ng angegeben werden.

LITERATUR

- 1 DC-Trennung von Testosteron und 17-*epi*-Testosteron auf Aluminiumoxid "Typ T". E. Merck AG, Darmstadt, Druckschrift 5930/0.3/1167; H. HALPAAP UND W. REICH, *J. Chromatogr.*, 33 (1968) 70.
- 2 H. STRUCK, H. KARG UND H. JORK, *J. Chromatogr.*, 36 (1968) 74.
- 3 J. T. WATSON, *J. Chromatogr.*, 43 (1969) 339.
- 4 D. GUPTA AND J. GOODWIN, *Steroids*, 8 (1966) 195.
- 5 H. KEUKER, *Chromatographia*, 4 (1971) 40.
- 6 Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage, J. R. Geigy A.G., Pharma, Basel, 1968.
- 7 K. B. EIK-NES AND E. C. HORNING, *Gas Phase Chromatography of Steroids*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.
- 8 P. KNAPSTEIN, J. C. TOUCHSTONE, P. MENZEL AND G. W. OERTL, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 190.