

CHROM. 6896

BESTIMMUNG VON PROGESTERON IM PLASMA DURCH DÜNN- SCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE DIREKTAUSWERTUNG

D. EGG

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

(Eingegangen am 13. März 1973; geänderte Fassung am 18. Juni 1973)

SUMMARY

Determination of progesterone in plasma by thin-layer densitometry

A method for the determination of progesterone in plasma by thin-layer densitometry without preliminary purification is described. After extraction with light petroleum (b.p. 40–60°) and separation on thin layers the quantitative determination of progesterone is carried out by thin-layer densitometry of a specific fluorescence for Δ^4 -3-ketosteroids. The sensitivity of the method is 0.005–0.01 μg of progesterone. Amounts of the pure progesterone down to 0.002 μg can easily be detected. The measurement of levels of progesterone in plasma as low as 1.0 μg per 100 ml is possible.

EINLEITUNG

Seit der Isolierung von Progesteron aus menschlicher Plazenta im Jahre 1952¹⁻³ und der Isolierung und Identifizierung im Plasma schwangerer Frauen⁴ sind zahlreiche Methoden zur Bestimmung von Progesteron im Plasma beschrieben worden. Für exakte Messungen im unteren Nanogrammbereich und Subnanogrammbereich sind sowohl die diversen Radioisotopenmethoden⁵⁻⁹ als auch gaschromatographische Methoden mit ECD¹⁰ bestens geeignet.

Mit einer Nachweisempfindlichkeit von ca. 0.005 μg ist die vorliegende Methode etwa mit gaschromatographischen Methoden mit FID^{11,12} und spektralfluorimetrischen Methoden¹³ vergleichbar, zeichnet sich jedoch durch den geringen materiellen und zeitlichen Aufwand aus, da weder eine Vorreinigung noch eine Derivatbildung notwendig ist. Während Methoden zur Bestimmung von Progesteron im Plasma durch dünn-schichtchromatographische Direktauswertung der Fluoreszenzlöschung eine Empfindlichkeit von 0.1 μg erreichen¹⁴, sind mit der hier beschriebenen Methode, basierend auf einer spezifischen Fluoreszenzreaktion für Δ^4 -3-Ketosteroide, Messungen bis in den Nanogrammbereich möglich. Über diese spezifische Reaktion wurde im Rahmen einer Methode zur Bestimmung von Testosteron im Urin berichtet¹⁵.

Inzwischen konnte auch der Ablauf dieser Fluoreszenzreaktion im Einzelnen geklärt werden¹⁶. Die blauen Fluoreszenzchromogene, die beim Erhitzen von Δ^4 -3-Ketosteroiden auf Aluminiumdünn-schichtplatten gebildet werden, konnten als

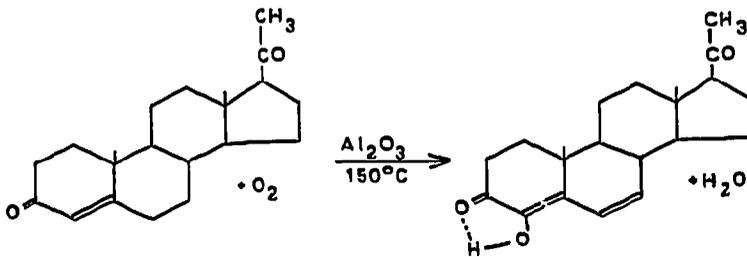


Fig. 1. Schema der Aluminiumoxidfluoreszenzreaktion.

Oberflächenverbindungen mit 4-Hydroxy-3-oxo- $\Delta^{4,6}$ -steroiden identifiziert werden, wobei das Aluminiumoxid als Oxydationskatalysator für eine aktivierte Methylengruppe reagiert. Eventuelle Veränderungen nichtkonjugierter Seitengruppen haben keinen direkten Einfluss auf die Fluoreszenz. Es wurde vorgeschlagen, für diese Reaktion die Bezeichnung "Aluminiumoxidfluoreszenz" zu verwenden.

In Anbetracht ihrer ausgezeichneten Selektivität erübrigen sich Vorreinigungsschritte weitgehendst. Wie sich inzwischen herausstellte, kann die Selektivität der Reaktion durch eine Senkung der zum Erhitzen der Dünnschichtplatten ursprünglich angegebenen Temperatur von 180° auf 150° gesteigert werden. Es wurde nämlich festgestellt, dass die Empfindlichkeit für Δ^4 -3-Ketosteroide im Bereich von 150 – 180° konstant bleibt, die Selektivität jedoch mit abnehmender Temperatur zunimmt, da die Empfindlichkeit für die ebenfalls angezeigten 3-Hydroxy- Δ^5 -steroiden dabei stark abnimmt.

Während bei der eingangs erwähnten Testosteronbestimmung im Urin, infolge ungünstiger Trennverhältnisse, doch unter Umständen Überlagerungen auftreten können (hauptsächlich bei Testosteronbestimmungen während der Schwangerschaft oder bei älteren Personen), und somit eine Vorreinigung auf Kieselgel notwendig wird, konnte bei den bisher über 100 von uns durchgeführten Progesteronbestimmungen keine Überlagerung festgestellt werden. Auch die Kontrollversuche durch multiple Chromatographie und gaschromatographische Doppelbestimmung bestätigen diese Ergebnisse.

MATERIAL

Die Messungen wurden mit einem "Camag-Z-Scanner"¹⁷ in Kombination mit einem Zeiss PMQ-II-Spektralphotometer mit Quarzoptik durchgeführt. Alle verwendeten Reagenzien waren von höchstem Reinheitsgrad (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.) und wurden keiner zusätzlichen Reinigung unterzogen. Die dünn-schichtchromatographische Trennung wurde auf lufttrockenen Aluminiumoxidplatten F_{254} (Typ T) der Fa. E. Merck, Schichtdicke 0.25 mm, ausgeführt.

METHODE

Extraktion

Das abgenommene Blut wird sofort zentrifugiert und das Plasma bis zur weiteren Verwendung bei -15° aufbewahrt. 5 ml Plasma werden mit 1 N NaOH auf

pH 10 gebracht und zweimal mit 20 ml Petroläther (b.p. 40–60°) ausgeschüttelt, wobei das Progesteron nahezu vollständig in die Ätherphase übergeht.

Der Ätherextrakt wird durch wasserfreies Na_2SO_4 in einen Rotationsverdampferkolben filtriert und im Rotationsverdampfer zur Trockene abgedampft. Der Trockenrückstand wird in *ca.* 3 ml Äthanol gelöst, in ein Spitzkölbchen oder Fingerröhrchen überführt und zur Trockene abgeblasen.

DC-Trennung

Der Rückstand im Spitzkölbchen wird in 100 μl Äthanol gelöst und 10 μl werden mittels einer Hamiltonspritze unter Zwischentrocknung auf eine Aluminiumoxidplatte F_{254} , Typ T, aufgetragen. Seitlich werden 2 μl einer äthanolischen Standardlösung von Progesteron mit einer Konzentration von 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ appliziert. Die Platte wird dann im Trog mit reinem Dichlormethan als Laufmittel bis zu einer Laufstrecke von *ca.* 12 cm entwickelt.

Es erwies sich als sehr günstig, ein schwach polares Laufmittel zu verwenden, da sich dadurch eine ausgezeichnete Trennung des Progesterons von den polaren Δ^4 -3-Ketosteroiden ergibt. Unter diesen Bedingungen wurden die in Tabelle I angeführten R_F -Werte gemessen.

TABELLE I
 R_F -WERTE DIVERSER STEROIDE
Laufmittel: Dichlormethan.

<i>Steroide</i>	<i>R_F-Werte</i>
Aldosteron	0.00
11-Desoxycorticosteron	0.02
17-Hydroxyprogesteron	0.04
Epitestosteron	0.04
Testosteron	0.06
5-Pregnenolon	0.08
Dehydroepiandrosteron	0.08
Cholesterin	0.16
Androstendion	0.29
Progesteron	0.40
Cholesterinester	1.00

Die lufttrockene Platte wird auf einer Laborheizplatte 20 min bei 150° erhitzt, wodurch das Progesteron in eine fluoreszierende Verbindung übergeführt wird. Um eine gleichmäßige Erhitzung der Dünnschichtplatte zu gewährleisten, empfiehlt es sich, eine Abdeckung aus Asbest im Abstand von *ca.* 1 cm zu verwenden.

Quantitative Auswertung der Fluoreszenz

Die Platte sollte vor der quantitativen Auswertung gut ausgekühlt sein, da die Intensität der Fluoreszenz beim Abkühlen zunimmt, um dann für einige Tage konstant zu bleiben. Die Geräteeinstellung war folgende: Anregungswellenlänge 366 nm, Emissionswellenlänge 440 nm, Blendenöffnung des Scanners und des Monochromators jeweils 2 mm. Zur Eliminierung der Untergrundstrahlung wird immer in der Laufrichtung ausgewertet.

Bei der Aufnahme der Eichkurven wurden jeweils $2 \mu\text{l}$ verschieden konzentrierter Standardlösungen auf die AluminiumdünnSchichtplatte aufgetragen, chromatographiert und quantitativ ausgewertet. Es ergab sich eine lineare Beziehung zwischen Peakfläche und Menge im gemessenen Bereich von $0.002\text{--}1 \mu\text{g}$. Bis $0.5 \mu\text{g}$ besteht auch eine lineare Beziehung zwischen Peakhöhe und applizierter Menge (Fig. 2). Da die Einzelaufgabe $0.5 \mu\text{g}$ nie überschreitet, ergibt sich daher eine einfache Auswertung der Chromatogramme durch den direkten Vergleich der Peakhöhe des Standards mit jener der Proben. Die Nachweisgrenze für die äthanolische Standardlösung kann mit $0.002 \mu\text{g}$ Progesteron angegeben werden.

Fig. 3 zeigt das Chromatogramm einer Progesteronbestimmung aus dem Plasma einer graviden Ratte (7. Tag der Gravidität). Die Bestimmung wurde über 4-Androsten-3,17-dion als innerer Standard durchgeführt. Nach Korrektur ergibt sich eine Einzelaufgabe von $0.038 \mu\text{g}$ Progesteron und somit ein Progesteronspiegel von $7.60 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Plasma.

ERGEBNISSE

Reproduzierbarkeit und Wiederfindung

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit wurden 10 Bestimmungen mit je 5 ml Plasma aus einem Plasmapool durchgeführt. Bei einem mittleren Progesterongehalt von $0.186 \mu\text{g}/5 \text{ ml}$ konnten wir eine Standardabweichung von $\pm 0.014 \mu\text{g}$ (7.5%) feststellen (Tabelle II).

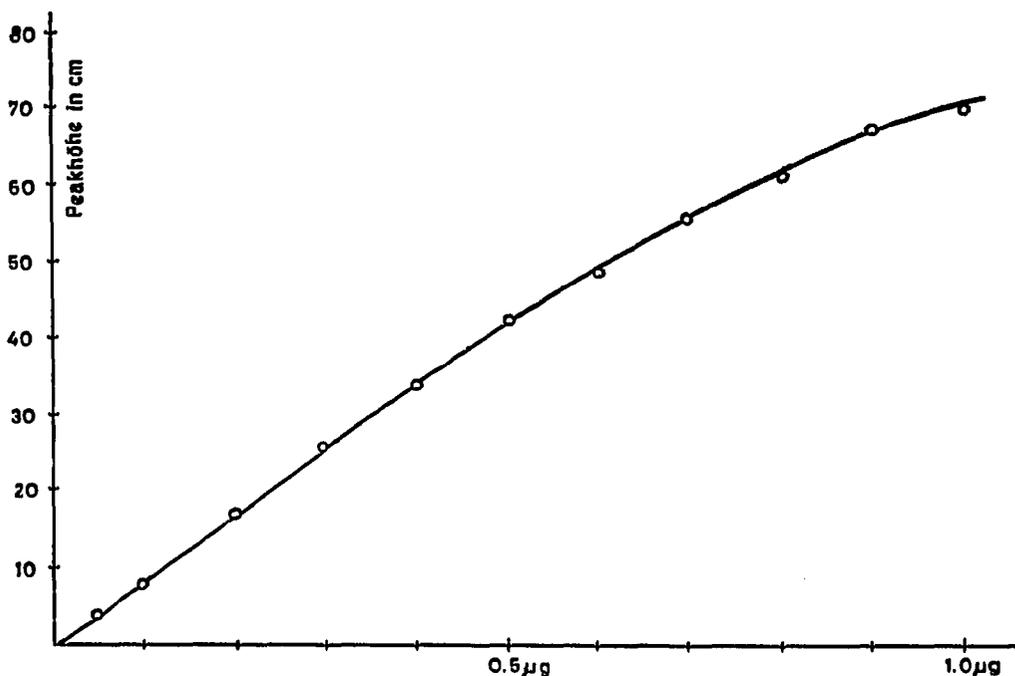


Fig. 2. Eichkurve für die Fluoreszenzmessung im Bereich von $0.05\text{--}1.00 \mu\text{g}$.

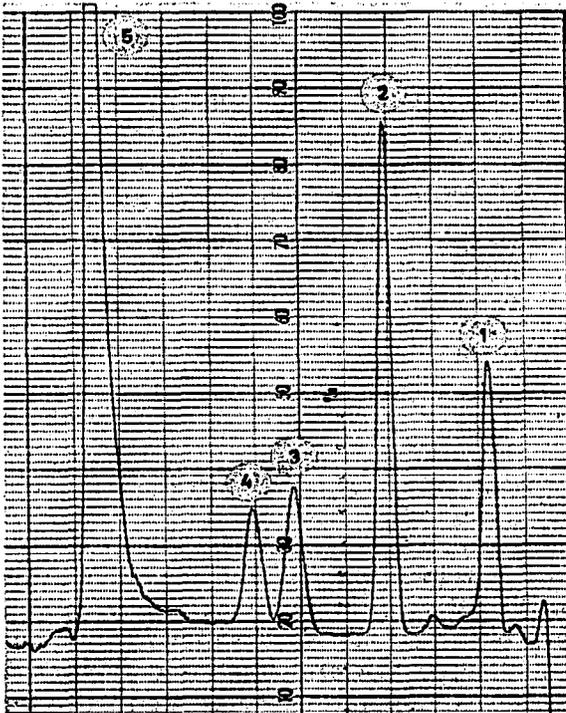


Fig. 3. Chromatogramm einer Plasmaprogesteronbestimmung bei einer graviden Ratte (7. Tag der Gravidität; 4-Androsten-3,17-dion als innerer Standard). 1 = Auftragestelle, 2 = Cholesterin, 3 = Androstendion, 4 = Progesteron, 5 = Laufmittelfront.

TABELLE II

MEHRFACHBESTIMMUNG ZUR FESTSTELLUNG DER REPRODUZIERBARKEIT

Bestimmung No.	μg Progesteron gefunden in 5 ml Plasma (aus Plasmapool)
1	0.176
2	0.195
3	0.165
4	0.205
5	0.187
6	0.195
7	0.175
8	0.203
9	0.170
10	0.185
Mittelwert (μg)	0.186
S.D. (μg)	0.014
S.D. (%)	7.5

TABELLE III
ERMITTLUNG DER WIEDERFINDUNG

Experiment No.	Gefundene Menge Progesteron (μg)		
	5 ml H_2O + 0.100 μg Progesteron	5 ml H_2O + 0.500 μg Progesteron	5 ml Plasma (Mittelwert: 0.065 μg) + 0.200 μg Progesteron
1	0.085	0.505	0.230
2	0.102	0.470	0.255
3	0.074	0.455	0.225
4	0.090	0.490	0.255
5	0.083	0.460	0.240
Mittelwert	0.087	0.476	0.241
S.D. (μg)	0.010	0.021	0.014
S.D. (%)	11.5	4.4	5.8
Wiederfindung	87.0%	95.2%	88.0%

Um die Wiederfindung zu ermitteln, wurde reinem Progesteron sowohl Wasser als auch Plasma mit bekanntem Progesteronspiegel zugesetzt und nach Durchlaufen sämtlicher methodischer Schritte quantitativ bestimmt. Diese Ergebnisse sind aus Tabelle III ersichtlich. In Anbetracht der fehlenden Vorreinigung ist die Wiederfindung sehr gut und liegt im Durchschnitt bei 90%. Um aber vom Verlustfaktor möglichst unabhängig zu werden, empfiehlt es sich, die Bestimmungen über einen inneren Standard durchzuführen.

Bisher wurden mit dieser Methode über 100 Bestimmungen durchgeführt. Wir machten Untersuchungen über den Verlauf des Progesteronspiegels schwangerer Frauen und konnten im wesentlichen eine gute Übereinstimmung mit den von Johansson⁹ angegebenen Werten finden. Bei zehn durchgeführten Nabelschnurblutuntersuchungen ergaben sich Werte zwischen 85.0 μg und 145.0 $\mu\text{g}/100$ ml. Auch die bisherigen Untersuchungen während der Gravidität bei der Ratte stimmen ziemlich genau mit jenen von Wiest¹⁸ angegebenen Ergebnissen überein. Über die Resultate der bisherigen und zur Zeit noch laufenden Untersuchungen wird in absehbarer Zeit zusammenfassend berichtet.

DISKUSSION

Die vorliegende dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung von Progesteron im Plasma, basierend auf einer spezifischen Fluoreszenzreaktion für Δ^4 -3-Ketosteroide auf Aluminiumoxiddünnschichtplatten, zeichnet sich durch geringen materiellen und zeitlichen Aufwand aus. Von einer Person können bis zu 20 Bestimmungen pro Tag durchgeführt werden. In der beschriebenen Form scheint die Methode vor allem für Routineuntersuchungen während der Schwangerschaft gut geeignet zu sein, da mit ausreichender Genauigkeit Progesteronspiegel ab 2.0 $\mu\text{g}/100$ ml bestimmt werden können. Durch Verwendung grösserer Plasmamengen, sowie durch stärkere Anreicherung vor der Dünnschichtchromatographie kann diese Grenze noch beträchtlich unterschritten werden. Inwieweit die Methode unter diesen

Umständen für Untersuchungen über die Plasmaprogesteronverhältnisse im normalen Zyklus geeignet wäre, könnte zur Diskussion gestellt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Bestimmungen wurden ausnahmslos auf Aluminiumoxidplatten Typ T (E. Merck, Charge No. 1438 669) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Aktivität des Aluminiumoxids verschiedener Chargen starken Schwankungen unterworfen ist. Platten höherer Aktivität zeichnen sich durch niedrigeren R_F -Wert, niedrigere optimale Fluoreszenzreaktionstemperatur und höhere Fluoreszenzausbeute aus. Diese Unterschiede sind zwischen Aluminiumoxidplatten Typ T und Typ E besonders stark ausgeprägt.

DANK

Herrn Dr. H. Huck möchte ich für die fachliche Unterstützung meinen Dank ausdrücken.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird hier eine quantitative dünnschichtchromatographische Methode beschrieben, mit welcher Bestimmungen von Progesteron im Plasma ohne jegliche Vorreinigung bis in den Nanogramm-Bereich durchgeführt werden können.

Nach Ätherextraktion und DC-Trennung erfolgt die quantitative Bestimmung des Progesterons durch dünnschichtchromatographische Direktauswertung einer spezifischen Fluoreszenzreaktion für Δ^4 -3-Ketosteroide. Die Nachweisempfindlichkeit kann mit 0.005–0.01 μg Progesteron angegeben werden. 0.002 μg reines Progesteron kann leicht bestimmt werden. In der beschriebenen Form können Plasmaspiegel ab 1.0 $\mu\text{g}/100$ ml ermittelt werden.

LITERATUR

- 1 H. A. Salhanick, M. W. Noall, M. F. Zarrow und L. T. Samuels, *Science*, 115 (1952) 708.
- 2 E. Diczfaluzi, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, 10 (1952) 373.
- 3 W. H. Pearlman und E. Cerceo, *J. Clin. Endocrinol.*, 12 (1952) 916.
- 4 J. Zander und H. Simmer, *Klin. Wochenschr.*, 32 (1954) 529.
- 5 C. A. Woolever und A. Goldfien, *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.*, 14 (1963) 163.
- 6 A. Riondel, J. F. Tait, S. A. S. Tait, M. Gut und B. Little, *J. Clin. Endocrinol.*, 25 (1965) 229.
- 7 B. P. Murphy, *J. Clin. Endocrinol.*, 27 (1967) 973.
- 8 W. G. Weist, *Steroids*, 10 (1967) 257.
- 9 E. D. Johansson, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, 61 (1969) 592.
- 10 H. J. van der Molen und D. Groen, *J. Clin. Endocrinol.*, 25 (1965) 1625.
- 11 M. E. Yannon, D. B. Mc. Comas und A. Goldfien, *J. Gas Chromatogr.*, 2 (1964) 30.
- 12 M. Luisi, G. Gambassi, V. Marescotti, G. Savi und F. Polvani, *J. Chromatogr.*, 18 (1965) 278.
- 13 R. V. Short, *J. Endocrinol.*, 25 (1962) 239.
- 14 M. Keller und A. Uettwiller, *Gynaecologia*, 165 (1968) 385.
- 15 D. Egg und H. Huck, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 349.
- 16 H. Huck, *Chromatographia*, 6 (1973) 46.
- 17 H. Keuker, *Chromatographia*, 4 (1971) 40.
- 18 W. G. Wiest, *J. Endocrinol.*, 87 (1970) 43.