

CHROM. 7486

Note

Gruppentrennung von Steroidhormonen und Stilbenen aus biologischem Material

HANS J. HAUSER und HERBERT O. GÜNTHER

Universität Stuttgart-Hohenheim, Institut für Lebensmitteltechnologie und Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern, Chemische Untersuchungsanstalt, Annastrasse 16, D-89, Augsburg (B.R.D.)

(Eingegangen am 18. März 1974)

Bei der Bestimmung von freien Steroiden und Stilbenen in biologischem Gewebe treten —je nach Herkunft des Materials— erhebliche Schwierigkeiten durch störende Begleitkomponenten auf. So werden z.B. aus Lebergewebe auch grosse Mengen an lipidhaltigen Substanzen (Phospholipide), Gallensäuren und Gallenfarbstoffen mitextrahiert, die sowohl die späteren Trennungen als auch Farbreaktionen stören können.

In der Lebensmittelanalytik werden zudem Methoden benötigt, mit denen im Fleisch von Schlachttieren Androgene und Östrogene nachgewiesen und bestimmt werden können, die auf eine Behandlung der Tiere mit Steroidhormonen hinweisen. Da häufig an Stelle von Östrogenen Anabolika verfüttert werden, wobei der Uterus-Wachstumstest versagt, müssen die komplexen Systeme erst vorgetrennt werden, wenn sie gaschromatographisch bzw. dünn-schichtchromatographisch–densitometrisch analysiert werden sollen.

Bei männlichen Tieren müssen neben den natürlicherweise vorhandenen Androgenen eventuell applizierte Östrogene und bei weiblichen entsprechend neben Östrogenen die applizierten Androgene erfasst werden. Für die Beurteilung sind neben den Hormonen jedoch auch ihre Metaboliten wichtig, bei Testosteron also z.B. Androsteron und Ätiocholanon. Die flüssigchromatographische Auftrennung bis zu den einzelnen Steroiden, wie sie mit Hilfe von Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) im Nanogrammbereich mittels radioaktiv markierten Derivaten realisiert wurde^{1–3}, ist für die Praxis viel zu aufwendig. Es genügt ein Trennverfahren, das zwischen den Androgenen und Östrogenen differenziert, damit anschliessend innerhalb einer Gruppe gaschromatographisch analysiert werden kann. Das hier beschriebene einfache Trennverfahren eliminiert die im biologischen Material in grossem Überschuss vorhandenen Störkomponenten (Triglyceride, Phospholipide, Gallensäuren, Gallenfarbstoffe usw.) und liefert eine Gruppentrennung zwischen Androgenen und Östrogenen.

EXPERIMENTELLES

Vortrennung zur Entfernung der Phospholipide

Da Phospholipide und Triglyceride die Gruppentrennung stören, müssen sie entfernt werden. Bei Triglyceriden geschieht dies durch günstige Wahl des Ex-

traktionsmediums Äthanol. In Extrakten aus Muskelfleisch ist dann der restliche Anteil an störenden Lipiden so gering, dass sie direkt zur Gruppentrennung eingesetzt werden können. Leberextrakte werden dagegen erst in Tetrahydrofuran (THF) gelöst auf eine mit THF äquilibrierte Polyvinylacetatsäule (Merckogel 6000, Merck, Darmstadt, B.R.D.) aufgebracht und mit dem gleichen Lösungsmittel eluiert. Steroide und Stilbene laufen gemeinsam. Publikation in Vorbereitung.

Gruppentrennung mit Sephadex LH-20

7 g Sephadex LH-20 werden in das Elutionsmedium 1 (EM 1) (Heptan-Chloroform-Methanol-Wasser, 100:100:1:1; modifiziert nach Murphy¹) eingerührt und mindestens 2,5 h gequollen, bevor sie in ein Trennrohr von etwa 20 mm Durchmesser eingefüllt werden. Der Rohrdurchmesser sollte 15 mm nicht unterschreiten, da sonst beim Übergang auf das 2. Elutionsmedium (Dichlormethan-Methanol, 95:5) Änderungen im Quellgrad zu Rissen im Gel führen. Von dem Extrakt bzw. dem eingegengten Eluat der Vortrennung werden 2 ml auf die Füllung aufgebracht und mit 50 ml EM 1 die Androgene gemeinsam mit den Gestagenen und anschliessend mit 60 ml EM 2 die Östrogene aus der Säule eluiert.

ERGEBNISSE

Wie die dünnschichtchromatographische Analyse der in einzelnen Portionen aufgefangenen beiden Elutionsfraktionen zeigt (Fig. 1), sind die Östrogene vollständig von den beiden anderen Hormongruppen getrennt worden. Für Routineuntersuchungen werden jedoch nur die beiden Gesamtfractionen gesondert aufgefan-

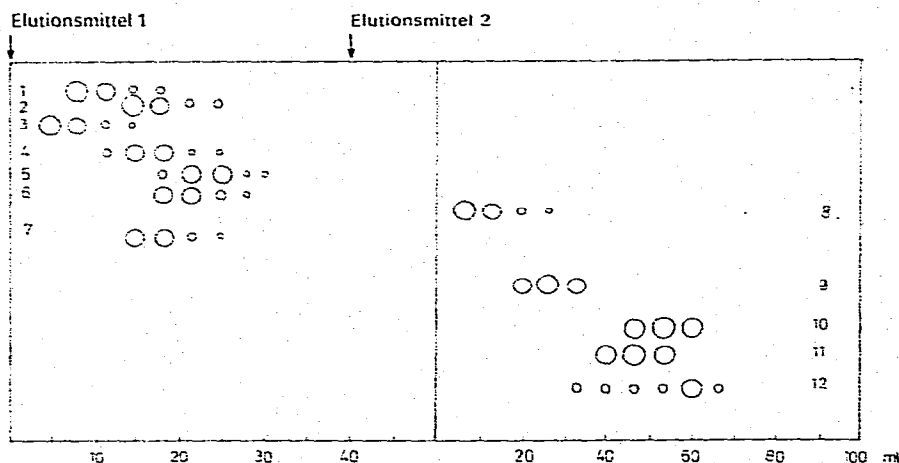


Fig. 1. Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Gruppentrennung Androgene/Östrogene nach Chromatographie mit Sephadex LH-20 aus einem Leberextrakt (Kalb). Zusatz 1 mg je Substanz (freie Steroide). Schicht: Kieselgel_{25,1} (Fertigplatte Merck, Darmstadt, B.R.D.), nicht aktiviert. Laufmittel: EM 1 und EM 2 (s. Text). Nachweis: Sprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Eisessig (1:2:100); erst mit Föhn, dann im Trockenschrank 5 min bei 150° erwärmen und Farbentwicklung beobachten; Zuordnung nach Lit. 7. 1= Androstendion; 2= Progesteron; 3= Cholesterin; 4= Androsteron; 5= 17- α Hydroxyprogesteron; 6= Dihydrotestosteron; 7= Testosteron; 8= Östron; 9= Östradiol; 10= Diäthylstilböstrol; 11= Hexöstrol; 12= Östriol.

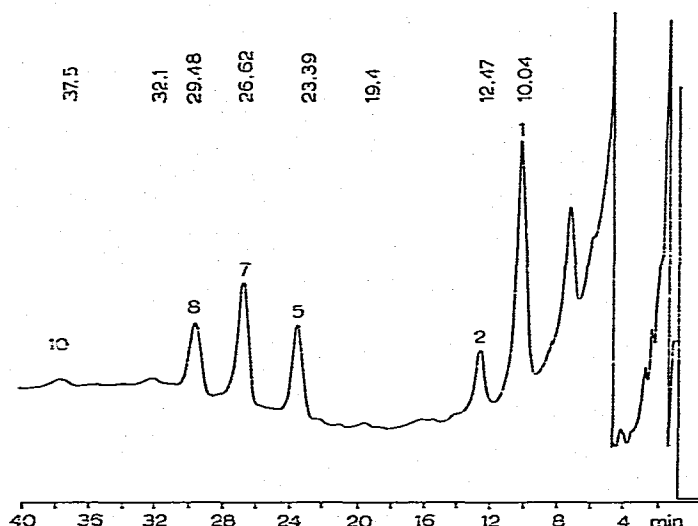


Fig. 2. Gaschromatographische Analyse der Silyläther der Östrogenfraktion aus der Gruppentrennung der Steroide mit Sephadex LH-20 (nach Vortrennung mit Merckogel 6000). Die Östrogene wurden einem Leberhomogenat vor der Extraktion zugesetzt. Trennbedingungen: Temperaturgradient 2.5°/min von 220–270°. Probe: 1 µl; Gasfluss: 40 ml N₂; Empfindlichkeit: 16; Säule: 5 m Glas 1%ig belegt mit Phase OV-17 auf Chromosorb G HP. Vorschub: 0.5 cm/min. Keine Nulllinienkorrektur, ohne Integrator. Peakbezeichnung: 1 = Hexöströl; 2 = Diäthylstilböstrol; 5 = Östron; 7 = Östradiol; 8 = Östriol.

gen und nach Einengen gaschromatographisch analysiert. In Fig. 2 ist das Gaschromatogramm der Östrogenfraktion wiedergegeben. Soll die Methode an ein neuartiges Untersuchungsmaterial adaptiert werden, dann ist im ersten Trennungsgang das Eluat wie in Fig. 1 portionsweise dünnschichtchromatographisch zu kontrollieren.

Da die gaschromatographische Trennung der Steroide in Form ihrer Silyläther an Dünnschichtkapillaren aus Glas² aufwendig und kostspielig ist, empfehlen wir selbstgepackte Glassäulen (Länge 5 m, Durchmesser 1.5–2.0 mm) und 1–3% Belegung mit OV-17-Phase⁵. Werden Metallsäulen benutzt, dann ist bei sauerstoffhaltigen Steroiden mit Artefaktbildung und Verlusten zu rechnen⁶.

Mit diesem Verfahren wurden an Schlachttiere verfütterte Steroide und Stilbene in deren Leber und Muskelfleisch nachgewiesen. Mit Zusätzen von freien und konjugierten Steroiden wurden die Ergebnisse kontrolliert und durch dünnschichtchromatographische Analyse in mehreren Systemen und mit verschiedenen Färbereaktionen⁷ sowie im Falle von Diäthylstilböstrol auch durch Infrarotspektroskopie gesichert. Publikation in Vorbereitung.

LITERATUR

- 1 B. Murphy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 27 (1967) 973; *Nature (London)*, 232 (1971) 21.
- 2 H. van Baelen, W. Heyns und P. de Moor: *J. Chromatogr.*, 30 (1967) 226.
- 3 B. R. Carr, G. Mikhail und G. Flickinger, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33 (1971) 358.
- 4 J. Völlmin, *Chromatographia*, 3 (1970) 233.
- 5 H. O. Günther, *Fleischwirtschaft*, 52 (1972) 625.
- 6 E. Ziegler und H. Günther, *Chromatographia*, 4 (1971) 524.
- 7 D. Kritschewsky und S. A. Tepper, *J. Chromatogr.*, 37 (1970) 361.