

CHROM. 8295

FLUORIMETRISCHE TESTOSTERONBESTIMMUNG AUF Al_2O_3 DURCH DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER TRIMETHYLSILYLÄTHER

H. HUCK

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

(Eingegangen am 19. November 1974; geänderte Fassung eingegangen am 4. März 1975)

SUMMARY

Fluorimetric determination of testosterone on Al_2O_3 by thin-layer chromatographic separation of the trimethylsilyl ether derivatives

Small quantities (parts per 10^9) of testosterone were determined in the presence of large amounts of other steroids in urine samples obtained during pregnancy by subjecting their trimethylsilyl derivatives to spectrofluorimetry on alumina after purification by thin-layer chromatography on silica gel. The activity of the alumina and the fluorescence reactions are discussed.

EINLEITUNG

Chromatographische Bestimmungen von Spurenbestandteilen neben einem grossen Überschuss anderer Substanzen werden oft durch Überlagerungen gestört. Dieses Problem ist besonders aktuell bei der Hormonbestimmung aus biologischem Material, die meistens erst nach einer Vorfraktionierung (Vorreinigung), Derivatisierung und dem Einsatz spezifischer Nachweisverfahren ermöglicht wird. Während in der Gaschromatographie (GC) die Derivatisierungstechnik weit verbreitet ist, ist sie in der Dünnschichtchromatographie (DC) erst vereinzelt angewandt worden, wie z. B. bei der Eluierung der Corticosteroide als Acetate auf Al_2O_3 zur Vermeidung von Nebenreaktionen^{1,2}. Die Derivatisierung ist für die DC aber auch im Hinblick spezifischer Trennungen interessant. So konnte nach dieser Arbeit Testosteron im ppb-Bereich aus dem Urin während der Schwangerschaft, bei der es zu einem starken Anstieg der ausgeschiedenen Steroidmetabolite kommt, erst nach Silylierung des dünn-schichtchromatographisch vorgereinigten Extraktes dünn-schichtchromatographisch bestimmt werden. Entwickelt wurde auf Al_2O_3 -Platten mit nachfolgender Al_2O_3 -Fluoreszenzdetektion für 3-Keto- Δ^4 -steroide, die erstmals zur Testosteronbestimmung aus dem Urin^{3,4} und inzwischen auch zur Progesteronbestimmung aus dem Plasma⁵ eingesetzt wurde.

Voruntersuchungen zeigten, dass auch die 17-Hydroxycorticosteroide Cortisol und Cortison nach Abspaltung der polaren Seitenkette durch Wismutatoxydation

(Cortisol \rightarrow 4-Androsten-11 β -ol-3,17-dion, Cortison \rightarrow 4-Androsten-3,11,17-trion) oder Chromsäureoxydation (Cortisol, Cortison \rightarrow 4-Androsten-3,11,17-trion)⁶ und die 20-Dihydrocorticosteroide nach Perjodsäureoxydation der Glycerolseitenkette⁷, als weitere von der GC her bekannte Derivatisierungstechniken, auf Al₂O₃ bestimmt werden können.

EXPERIMENTELLES

Dünnschichtchromatographische Trennung der Trimethylsilyläther auf Al₂O₃

Bei den Trimethylsilyl (TMS)-äthern ist die Wechselwirkung der Hydroxylgruppen mit dem Adsorbens aufgehoben. Eine Folge davon ist, dass nach Tabelle I die R_F -Werte der Steroide von der Anzahl der Ketogruppen bestimmt wird (wie in der GC bei polaren Phasen!). Gelegentlich wurden mit dem Laufmittel Dichlormethan zu hohe R_F -Werte festgestellt. Zur Testosteronbestimmung bewährte sich dann das Laufmittelgemisch Dichlormethan-Cyclohexan (70:30). Beim TMS-Testosteron war die Nachweisempfindlichkeit gegenüber freiem Testosteron auf Al₂O₃, Typ T (Merck) um 34% erhöht (beim Acetat um 65%, gleiche Laufzeiten vorausgesetzt). Dagegen wurden die mit * bezeichneten Derivate der Tabelle I unter Schweifbildung zersetzt, nicht aber auf dem stärker basischem Typ E, der bei faktisch unveränderten R_F -Werten eine wesentlich kürzere Laufzeit aufwies. Im Falle der Testosteronbestimmung wirkte sich die Zersetzung einiger TMS-Derivate günstig aus, da dadurch Überlagerungen vermieden wurden. Diese Zersetzung trat nicht auf, wenn zuvor die Lewis-Säurezentren durch Pyridindämpfe deaktiviert worden waren, was jedoch mit einer Verminderung der Trennleistung erkauft werden musste. Fig. 1 zeigt ein Chromatogram von TMS-5 β -Pregnen-3 β -ol-20-on mit ausgeprägtem Tailing zwischen den Peaks von Derivat und freiem Steroid (ein Beispiel für Reaktionschromatographie⁸⁻¹⁰ bzw. "Simultan-Reaktionschromatographie"¹¹).

TABELLE I

R_F -WERTE EINIGER DURCH FLUORESZENZ ANGEZEIGTER STEROIDE NACH SILYLIERUNG AUF Al₂O₃, TYP T (MERCK)

Laufmittel: Dichlormethan.

<i>Verbindungen</i>	<i>R_F-Werte</i>
4-Androsten-3,11,17-trion	0.18
4-Androsten-3,17-dion	0.34
TMS-4-Pregnen-11 α -ol-3,20-dion*	0.40
Progesteron	0.44
TMS-Epitestosteron*	0.54
TMS-Testosteron	0.58
TMS-5 β -Pregnen-3 β -ol-20-on*	0.71
TMS-Dehydroepiandrosteron*	0.72
TMS-Cholesterin*	0.84

MATERIAL UND METHODE

Sämtliche Reagenzien (p.a.), Kieselgel 60 GF₂₅₄, Al₂O₃-DC-Platten 150 F₂₅₄, Typ T und 60 F₂₅₄, Typ E waren von Merck. Ein Camag-Chromatocharger, ein Camag-

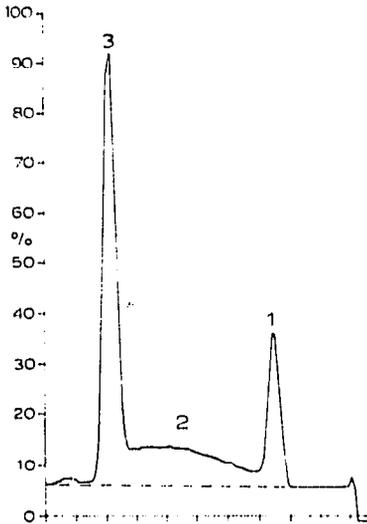


Fig. 1. Chromatogramm von TMS-5 β -Pregnen-3 β -ol-20-on auf Al_2O_3 (Typ T) durch Fluoreszenzdetektion. Laufmittel: Dichlormethan. 1 = Freies Steroid; 2 = Tailing durch Zersetzung während der Eluierung; 3 = TMS-Derivat.

Z-Scanner zum Zeiss Spektralphotometer PMQ II und ein Desaga-DC-Streichgerät wurden verwendet. Bezüglich der allgemeinen methodischen Ausführungen (Aufarbeitung des Urins, Fluoreszenzreaktion und DC-Direktauswertung) wird auf die vorausgehende Arbeit³ Bezug genommen. Zur zusätzlichen DC Reinigung des Rohextraktes und anschließender Silylierung wurde der Trockenrückstand des Rohextraktes in 0.3 ml Aceton gelöst und mittels des Chromatochargers bei einer Strichlänge von 14 cm auf eine selbstgefertigte und bei Raumtemperatur getrocknete Kieselgelplatte aufgetragen und mit 0.2 ml Aceton nachgespült. Nach der Eluierung mit Chloroform-Essigsäureäthylester-Cyclohexan (30:20:10) wurde die durch einen seitlich, punktförmig aufgetragenen Testosteronstandard und unter kurzwelligem UV markierte Zone auf eine Breite von 20 mm abgekratzt, mit 3×2 ml Aceton über einer Glasfritte in ein Spitzkölbchen eluiert, und das Aceton im Wasserbad von 50° abgeblasen. Letzte Reste von Wasser wurden nach Zugabe von 0.5 ml Äthanol beim nochmaligen Abdampfen entfernt. Silyliert wurde mit 0.5 ml Hexamethyldisilazan und fünf Tropfen Trimethylsilylchlorid während 1 h bei 60°. Anschließend wurden die überschüssigen Reagenzien mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die durchströmende Luft wurde durch je eine Waschflasche mit konz. H_2SO_4 und NaOH-Plätzchen getrocknet. Der Rückstand wurde in 100 μl Äthanol gelöst, wovon $2 \times 5 \mu\text{l}$ (eingesetzte Harnmenge 50 ml) unter Zwischentrocknung (kalter Föhn!) punktförmig auf eine Al_2O_3 -Platte, Typ T, zusammen mit einer Probe mit 0.2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Testosteron als innerer Standard aufgetragen wurden. Unmittelbar danach (TMS-Testosteron auf Al_2O_3 zersetzt sich allmählich beim Lagern!) wurde mit Dichlormethan, bzw. bei zu hohen R_F -Werten mit Dichlormethan-Cyclohexan (70:30) eluiert, 20 min auf 170–180° erhitzt und mittels Chromatogramm-Spektralphotometer ausgewertet.

ERGEBNISSE

Fig. 2 zeigt ein Chromatogramm mit 63 ng Testosteron entsprechend einer Ausscheidung von $10 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ -Harn. TMS-Epitestosteron, welches nach Tabelle I getrennt angezeigt werden sollte, wurde durch Zersetzung restlos unterdrückt. Vergleichsweise wurden nach GC-Bestimmungen bei Frauen Normalwerte zwischen 2.5 und $9.2 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ Testosteron (freies + Glucuronid) gefunden¹². Die nach dieser Methode gewonnenen Werte lagen bei zwanzig verschiedenen Bestimmungen ebenfalls in diesem Bereich. Die relative Standardabweichung der Einzelmessung, die mit abnehmender Menge zunimmt³, betrug $\pm 10\%$ bei 25 ng Probenaufgabe, entsprechend $5 \mu\text{g}/1000 \text{ ml}$. Da zur Detektion keine Sprühreagenzien benötigt werden, ist der durch Untergrundschwankungen bedingte Fehler relativ klein.

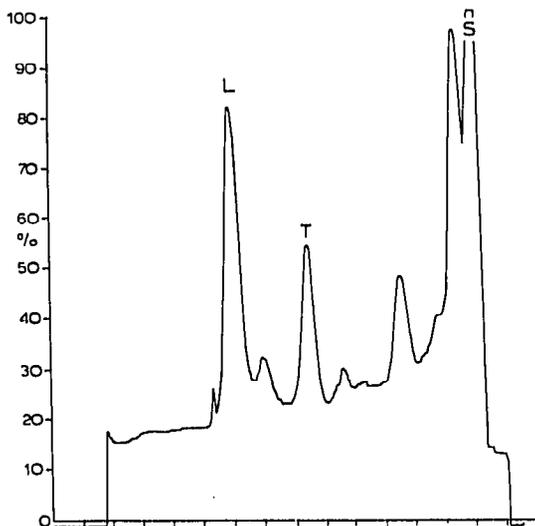


Fig. 2. Dünnschichtchromatographische Fluoreszenzdetektion von Testosteron eines dünn-schichtchromatographisch vorgereinigten Urinextraktes auf Al_2O_3 (Typ T). Laufmittel: Dichlormethan. S = Start; T = TMS-Testosteron (63 ng); L = Laufmittelfront.

Acetate führten im vorliegenden Fall zu weniger guten Trennungen. Sie eignen sich jedoch zu Kontrollbestimmungen bei erhöhten Werten (R_f -Werte unter den Bedingungen der Tabelle I: Testosteron-, 0.37; Epitestosteronacetat, 0.49). Eine GC-Bestimmung von TMS-Testosteron mittels XE-60 war bei nur einer einzigen Vorreinigungsstufe nicht möglich, sodass der Vorzug des geringeren Arbeitsaufwandes dieser Methode (ev. auch gegenüber der radioimmunologischen Testosteronbestimmung aus dem Urin) bestehen bleibt.

DISKUSSION

Reaktionen der Steroide auf Al_2O_3

Beim Einsatz von Al_2O_3 als Adsorbens muss seine katalytische Aktivität berücksichtigt werden. Durch die heterogene Zusammensetzung der Oberfläche, die als

aktive Zentren Hydroxylgruppen, Oxidionen und elektrophile Al^{3+} -Ionen (Lewis-Säure) enthält¹³⁻¹⁵, ergeben sich verschiedene Reaktionsmöglichkeiten. Die Al^{3+} -Ionen als aktivste Zentren sind verantwortlich für die unerwünschten Reaktionen bei der Chromatographie von Steroiden wie Verseifung, Dehydratisierung und Isomerisierung von Alkoholen^{16,17}, Abspaltung der polaren Seitenkette der 17-Hydroxycorticosteroide (von der Auftragsstelle wurden die entsprechenden 17-Ketosteroide eluiert, die sich durch Al_2O_3 -Fluoreszenz nachweisen liessen) und die Zersetzung einiger Silyläther.

Basische Katalyse liegt bei der Fluoreszenzreaktion der 3-Keto- Δ^4 -steroiden vor. Mit zunehmender Basizität des Al_2O_3 konnte die Reaktionstemperatur herabgesetzt werden (180° Typ T, 150° Typ E, Heizdauer 20 min). Der parallele Reaktionsverlauf in alkalischer Lösung und auf Al_2O_3 legt nahe, den Kornblum-De la Mare-Mechanismus¹⁸ für die Oxydation von gelösten Ketonen mit Luftsauerstoff auch der heterogenen Reaktion zu Grunde zu legen. Wie zu erwarten, reagieren die synthetischen 3-Keto- Δ^5 -steroiden mit derselben Empfindlichkeit wie die 3-Keto- Δ^4 -steroiden, da sich nach basenkatalysierter Eliminierung von H^+ von der betreffenden aktivierten Methylengruppe dieselbe mesomere Zwischenstufe ergibt.

Nebenreaktionen traten durch eine teilweise Oxydation von Hydroxy- zu Ketosteroiden auf, z.B. der 3-OH- Δ^5 -steroiden zu 3-Keto- Δ^4 -steroiden, die somit ebenfalls angezeigt wurden. Zusätzliche Nebenreaktionen wurden mit nicht vollständig abgedampften Eluierungsmitteln beobachtet. Durch Äthanol wurden Ketosteroide zu den entsprechenden α,β -isomeren Alkoholen reduziert und durch Aceton umgekehrt Steroidalkohole zu Ketonen oxydiert, die sich durch GC nachweisen liessen (vgl. Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion und Oppenauer-Oxydation).

Photochemische Aspekte der Fluoreszenz

Als Chromophor war eine Oberflächenverbindung von I der Fig. 3 mit Al_2O_3 angesehen worden⁴. Da dieselbe Fluoreszenz auch in Lösung mit Al^{3+} -Ionen unter Chelatbildung auftritt, kann auch der Oberflächenverbindung der Al-Chelatkomplex (II) als chromophore Gruppe zugeordnet werden.

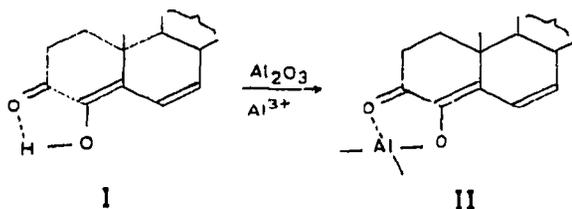


Fig. 3. Der Al-Chelatkomplex (II) der 3-Keto-4-hydroxy- Δ^4,Δ^6 -steroiden (I) als Fluorochrom der Fluoreszenzreaktion der 3-Keto- Δ^4 -steroiden.

Sowohl I als auch II haben in Äthanol ein Absorptionsmaximum bei 317 nm, welches einem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang entspricht⁴. Die $\lambda_{m,ax}$ -Werte von Anregung und Emission der sehr schwachen Fluoreszenz von I in Äthanol betragen 372/458 nm. Mit Alkali trat unter Bildung des hellgelben Enolates eine Zunahme der Fluoreszenzintensität auf das Dreifache auf. Die Bildung des Al-Chelatkomplexes (II) in Äthanol

nach Zugabe einiger Tropfen einer Al-Salzlösung erhöhte dagegen die Fluoreszenz auf das 55-fache mit den λ_{max} -Werten 380/466 nm. Auf Al_2O_3 als stärker polares Medium wurden λ_{max} -Werte im Bereich von 370–380/450–460 nm gemessen, die eine Blauverschiebung anzeigen. Nach semiempirischen Kriterien (geringe absolute Absorptionsintensität, grössere Wellenlänge relativ zum $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang und Blauverschiebung der Absorptionsbande in polaren Medien)¹⁹ liegt bei dieser Anregung ein $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang am Carbonylsauerstoff vor (nicht aber, wie ursprünglich gefolgert wurde, eine Rotverschiebung des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs von 317 auf 370–380 nm⁴, die in diesem Ausmass auch viel zu gross wäre).

Die Frage, ob die Emission von einem Singulett- (Fluoreszenz) oder Triplettzustand (Phosphoreszenz) ausgeht, wurde nicht experimentell entschieden. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass bei diesen Wellenlängen wie bei anderen Carbonylverbindungen^{19,20} eine Singulett–Singulett-Absorption und eine Triplett–Singulett-Emission erfolgt.

Für die Erhöhung der Bandenintensität der Lumineszenz durch Komplexbildung kommen prinzipiell zwei Möglichkeiten in Betracht: Die Erhöhung der Übergangswahrscheinlichkeit der Absorption (bzw. der Dipol- oder Oszillatorenstärke) als eine Folge eines gelockerten Übergangsverbotes durch den störenden Einfluss von Al^{3+} oder/und durch eine Erhöhung der Quantenausbeute der Emission bei einer Verminderung strahlungsloser Desaktivierung durch intermolekulare Prozesse (Abschirmung der chromophoren Gruppe). Das letztere scheint überwiegend der Fall zu sein, da die Lumineszenz der Al-freien Verbindung in Alkohol–Äther–Glas bei 77°K stark zunimmt, beim Al-Chelatkomplex auf Al_2O_3 dagegen konstant bleibt. Mit einer Koordinationszahl 6 des Al^{3+} können maximal drei Liganden gebunden werden. Ob die Übertragung elektronischer Energie zwischen zwei symmetrisch angeordneten, gleichen Liganden (Resonanzfall) bei der Intensitätszunahme ebenfalls eine Rolle spielt (im Sinne eines "Käfig-Effektes" mit einer verhinderten Übergabe elektronischer Energie an einen Quencher) bleibt dahingestellt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die niedrigen Testosteronmengen im ppb-Bereich neben einem grossen Überschuss anderer Steroide im Schwangerschaftsharn wurden nach dünnschichtchromatographischer Vorreinigung auf Kieselgel als Trimethylsilyläther durch Chromatogramm-Spektralfluorimetrie auf Aluminiumoxid bestimmt. Die Aktivität des Aluminiumoxides und die Fluoreszenzreaktion werden diskutiert.

LITERATUR

- 1 T. Reichstein und C. W. Shoppee, *Discuss. Faraday Soc.*, 7 (1949) 305.
- 2 I. E. Bush, *Biochem. J.*, 50 (1952) 370.
- 3 D. Egg und H. Huck, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 349.
- 4 H. Huck, *Chromatographia*, 6 (1973) 46.
- 5 D. Egg, *J. Chromatogr.*, 86 (1973) 151.
- 6 I. E. Bush und M. Willoughby, *Biochem. J.*, 67 (1957) 689.
- 7 K. B. Eik-Nes und E. C. Horning, *Gas Phase Chromatography of Steroids*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.
- 8 R. A. Keller und J. C. Giddings, *J. Chromatogr.*, 3 (1960) 205.

- 9 J. Kallen und E. Heilbronner, *Helv. Chim. Acta*, 43 (1960) 489.
- 10 M. Beroza und R. A. Coad, *J. Gas Chromatogr.*, 4 (1966) 199.
- 11 R. Kramer, *Dissertation*, Innsbruck, 1971; *J. Chromatogr.*, 107 (1975) 241.
- 12 H. J. van der Molen und A. Peterse, *Proc. Symp. Steroid Horm.*, 2nd, 1965, *Excerpta Medica Found. Int. Congr. Ser.*, No. 101 (1966) 1.
- 13 A. V. Deo, T. T. Chuang und I. G. Dalla Lana, *J. Phys. Chem.*, 75 (1971) 234.
- 14 M. G. Neumann und W. Hertl, *J. Chromatogr.*, 65 (1972) 467.
- 15 W. Hertl und A. M. Cuenca, *J. Phys. Chem.*, 77 (1973) 1120.
- 16 H. J. Seebald und W. Schunack, *J. Chromatogr.*, 79 (1973) 364.
- 17 R. Neher, *Chromatogr. Rev.*, 1 (1959) 199.
- 18 N. Kornblum und H. E. de la Mare, *J. Amer. Chem. Soc.*, 73 (1951) 880.
- 19 J. G. Calvert und J. N. Pitts, Jr., *Photochemistry*, Wiley, New York, 1966.
- 20 D. R. Arnold, N. C. Baird, J. R. Bolton, J. C. D. Brand, P. W. M. Jacobs, P. de Mayo und W. R. Ware, *Photochemistry, An Introduction*, Academic Press, New York, London, 1974.