

CHROM. 12,972

## Nota

### Konzentrationsabhängige Veränderungen der Methylene Units bei Steroidanalysen (MU-Shift)

K. HERKNER\* und W. SWOBODA

Ludwig Boltzmann Institut für pädiatrische Endokrinologie, Währinger Gürtel 74-76, A-1090 Wien (Österreich)

(Eingegangen am 8. April 1980; geänderte Fassung eingegangen am 22. Mai 1980)

Um in der Gaschromatographie (GC) kostspielige Detektionssysteme, wie sie zum Beispiel IR-Spektrometer und Massenspektrometer darstellen, zu umgehen, und trotzdem qualitativ zuverlässige Aussagen machen zu können, haben sich verschiedene "Identifikationssysteme" wie die Kováts-Indices (KI), die Steroidnummern (SN) oder die Methylene Units (MU) durchgesetzt. Besonders bei Analysen von Steroidhormonen mittels Kapillargaschromatographie dienen derartige Einheiten, speziell die MU- und T-Werte, zur Aufklärung von Molekülstrukturen<sup>1</sup>, da sie sich, abgeleitet aus den relativen Retentionszeiten (RRT), additiv aus dem Retentionsverhalten des Molekülskeletts und der einzelnen funktionellen Gruppen zusammensetzen<sup>2,3</sup>.

Bei der GC Analyse von Steroiden hat sich die qualitative Zuordnung der Peaks eines Chromatogramms über die MU's durchgesetzt. Bei den dafür hauptsächlich verwendeten polaren flüssigen Phasen dienen langkettige aliphatische Kohlenwasserstoffe (KW) als Bezugssubstanzen für die Berechnung der MU-Werte. Dabei wird die Retentionszeit ( $t_R$ ) der KW auf einer logarithmischen Basis verglichen. Bei der praktischen Anwendung dieser Zuordnungsmethode muss jedoch darauf geachtet werden, dass diese Kenngröße nicht uneingeschränkt unter diversen Chromatographiebedingungen, bzw. bei verschiedenen Geräteparametern, verwendet werden kann. Mehrere Komponenten führen zu Veränderungen der MU-Werte für verschiedene Substanzen. In der Literatur wird hauptsächlich auf eine Temperaturabhängigkeit hingewiesen<sup>2-5</sup>.

Die Identifizierung von Substanzen im Chromatogramm einer unbekanntem Probe kann also nur dann vorgenommen werden, wenn die Probe unter identen Temperaturbedingungen wie der Eichstandard analysiert wurde. Eichkurven weisen besonders bei Verwendung eines Flammenionisationsdetektor (FID) oft über einen grossen Konzentrationsbereich ein lineares Verhalten auf, sodass eine Mehrpunkt-eichung in diesem Falle nicht von absoluter Notwendigkeit ist. Es kann aber zu einer Verschiebung der Werte für die MU's in den verschiedenen Konzentrationsbereichen kommen, zum sogenannten "MU-Shift".

In der vorliegenden Arbeit wird nun diesem konzentrationsabhängigen "MU-Shift" Rechnung getragen. Die Kenntnis der Variabilität der MU's in Abhängigkeit von der Konzentration, bei der sie berechnet werden, ist für die Peakidentifizierung wichtig, um bei Chromatogrammen, in denen Substanzen quantitativ sehr unterschiedlich auftreten, keine falschen Zuordnungen zu treffen.

## MATERIAL UND METHODIK

Die GC Retentionswerte wurden mit einem Carlo Erba, Modell Fractovap 2900 Gaschromatograph ermittelt. Detektor war ein FID. Die Auswertung der Chromatogramme und die Zuordnung der relativen und absoluten Retentionszeiten erfolgte über einen Digitalintegrator SP 4100 (Spectra-Physics).

Das Trennsystem war eine Glaskapillare (OV-101; 25 m × 0.5 mm I.D.). Die Temperatur (Injektor und Detektor) war 300°C; Trägergas, N<sub>2</sub>.

Die Analysen erfolgte temperaturprogrammiert gemäss folgendem Schema:

65°C (2 min)  $\xrightarrow{35^\circ\text{C}/\text{min}}$  220°C (15 min)  $\xrightarrow{1.5^\circ\text{C}/\text{min}}$  250°C. Als Probesubstanzen wurden willkürlich gewählte Steroide der Nebennierenrinde eingesetzt, deren Retentionsverhalten ermittelt wurde. Es waren dies:

3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Dihydroxyandrost-5 $\beta$ -an	(1)
3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Dihydroxyandrost-5 $\alpha$ -an	(2)
3 $\beta$ ,17 $\beta$ -Dihydroxyandrost-5 $\alpha$ -an	(3)
3 $\alpha$ -Hydroxyandrost-5 $\beta$ -an-17-on	(4)
3 $\alpha$ -Hydroxyandrost-5 $\alpha$ -an-17-on	(5)
3 $\beta$ -Hydroxyandrost-5 $\alpha$ -an-17-on	(6)
17 $\beta$ -Hydroxyandrost-5 $\alpha$ -an-3-on	(7a)
17 $\beta$ -Hydroxyandrost-5 $\alpha$ -an-3-on	(7b)*
17-Hydroxyandrost-4-en-3-on	(8a)
17-Hydroxyandrost-4-en-3-on	(8b)*
3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Dihydroxyandrost-5 $\beta$ -an-17-on	(9)
3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -Dihydroxyandrost-5 $\alpha$ -an-17-on	(10)
17 $\alpha$ -Hydroxypregn-4-en-3,20-dion	(11)

Alle Reinsubstanzen wurden von Steraloids (Wilton, NH, U.S.A.) bezogen. Die Proben wurden als MO-TMS-Derivate chromatographiert<sup>6,7</sup>.

Als Bezugssubstanzen für die Berechnung der RRT und MU dienten die Alkane *n*-C<sub>24</sub>H<sub>50</sub> (*n*-Tetracosane) und *n*-C<sub>32</sub>H<sub>66</sub> (*n*-Dotriacontane) (Applied Science Labs., State College, PA, U.S.A.).

## ERGEBNISSE

Die oben angeführten Steroide wurden in drei verschiedenen Konzentrationen chromatographiert: A, 200 ng/μl; B, 50 ng/μl und C, 25 ng/μl. Für jede Konzentration wurden vierfache Einspritzungen vorgenommen.

In Fig. 1 ist das Chromatogramm des Steroidgemisches zu sehen. Tabelle I gibt die Ergebnisse als MU- und RRT-Werte der einzelnen Komponenten wieder.

In Tabelle II sind die Unterschiede ( $\Delta$ MU- und  $\Delta$ RRT-Werte) zwischen den zu den verschiedenen Konzentrationen einer Substanz gehörenden Werte angegeben.

\* Die MO-TMS-Derivate dieser Steroide erscheinen in Chromatogramm als Doppelpeak. Da das analytische System eine Allglasausführung ist, ist eine Zersetzung nicht zu vermuten. Wahrscheinlicher erscheint die auch in der ref. 6 angeführte Erklärung von *syn-anti*-Isomeren der Methoximinderivate.



TABELLE II

 $\Delta$ MU- UND  $\Delta$ RRT-WERTE BEI PEAKZUORDNUNG IN DREI VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONSBEREICHEN

"—" vor den Zahlen soll die Abnahme des Wertes anzeigen.

Substanz Nr.	$\Delta$ MU/ $\Delta$ RRT (200 $\rightarrow$ 50)	$\Delta$ MU/ $\Delta$ RRT (50 $\rightarrow$ 25)	$\Delta$ MU/ $\Delta$ RRT (200 $\rightarrow$ 25)
1	-0.057/-0.013	-0.007/-0.001	-0.064/-0.016
2	-0.080/-0.019	-0.010/-0.002	-0.090/-0.021
3	-0.100/-0.023	-0.013/-0.003	-0.113/-0.026
4	-0.060/-0.015	-0.016/-0.002	-0.076/-0.017
5	-0.095/-0.022	-0.021/-0.003	-0.116/-0.025
6	-0.082/-0.020	-0.025/-0.003	-0.107/-0.023
7a	-0.062/-0.015	-0.013/-0.002	-0.075/-0.017
7b	-0.065/-0.015	-0.015/-0.002	-0.080/-0.013
8a	-0.002/-0.017	-0.090/-0.002	-0.088/-0.019
8b	-0.075/-0.018	-0.008/-0.001	-0.083/-0.019
9	-0.065/-0.015	-0.005/-0.008	-0.060/-0.008
10	-0.057/-0.014	-0.053/-0.010	-0.110/-0.024
11	-0.024/-0.010	-0.017/-0.016	-0.007/-0.006

langkettige *n*-Alkane, wenn auch z. T. schon andere Moleküle, wie Äther oder Ketone von *n*-Paraffinen vorgeschlagen wurden<sup>8</sup>.

Bei Verwendung der MU-Werte ist auf gleiche Temperaturverhältnisse bei Eichung und Analyse zu achten, da diese Zuordnungsmethode stark temperaturabhängig ist. Neben dieser Variabilität rufen auch Konzentrationsunterschiede einen gewissen "MU-Shift" hervor. Wenn die MU-Differenzen bei den angeführten Konzentrationen auch sehr gering erscheinen (siehe Tabelle II/Ergebnisse), muss man doch beachten, dass benachbarte Substanzen ebenfalls nur sehr geringfügige Unterschiede in den MU-Werten aufweisen. So kann man zwischen den Substanzen 2 und 3 einen MU-Wert-Unterschied von 0.097 feststellen; zwischen 5 und 6 bzw. 8a und 8b betragen die Differenzen 0.054 und 0.080 MU-Einheiten. Auf Grund der Werte für den "MU-Shift" durch Konzentrationsveränderungen (siehe Tabelle II) kann man erkennen, dass die Identifizierung von Probenpeaks dann zu falschen qualitativen Aussagen führen kann, wenn die Eichung, und somit die Berechnung der einzelnen Komponenten in einem anderen Konzentrationsbereich durchgeführt wird. Dieser oben angezeigten Daten wegen muss die Empfehlung abgegeben werden, bei Peakidentifizierung über MU und RRT nach einem Standardchromatogramm unbedingt den Konzentrationsbereich bei Eichung und Analyse zu beachten, um qualitativ richtige Zuordnungen treffen zu können.

## LITERATUR

- 1 W. J. A. VandenHeuvel und E. C. Horning, *Biochim. Biophys. Acta*, 64 (1962) 416.
- 2 W. J. A. VandenHeuvel, W. L. Gardiner und E. C. Horning, *J. Chromatogr.*, 19 (1965) 263.
- 3 W. J. A. VandenHeuvel, W. L. Gardiner und E. C. Horning, *Anal. Chem.*, 36 (8) (1964) 1550.
- 4 W. J. A. VandenHeuvel, W. L. Gardiner und E. C. Horning, *J. Chromatogr.*, 26 (1967) 387.
- 5 R. W. H. Edwards, *J. Chromatogr.*, 154 (1978) 183.
- 6 M. G. Horning, A. M. Moss und E. C. Horning, *Anal. Biochem.*, 22 (1968) 284.
- 7 E. M. Chambaz und E. C. Horning, *Anal. Lett.*, 1 (1968) 201.
- 8 J. Novák und J. Růžičková, *J. Chromatogr.*, 91 (1974) 79.