

CHROMBIO. 027

HOCHDRUCK-FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNGSMETHODE FÜR FREIES CORTISOL IM URIN

G. SCHWEDT, H.H. BUSSEMAS und CH. LIPPMANN

*Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (Geschäftsführender
Institutsleiter: Prof. Dr. H.G. Wenzel), Ardeystrasse 67, D-46 Dortmund (B.R.D.)*

(Eingegangen am 30. Juni 1976; geänderte Fassung eingegangen am 30. September 1976)

SUMMARY

Determination of free cortisol in urine by high-pressure liquid chromatography

The possibilities were examined for the high-pressure liquid chromatographic analysis of cortisol with methods of adsorption, distribution and reversed-phase chromatography. Free cortisol in urine can be determined by extraction with chloroform and subsequent adsorption chromatography on silica gel with a mobile phase consisting of 1.5% methanol and 0.2% water in chloroform.

The time needed for this chromatographic analysis is 10–15 min; the limit of determination is 3 ng of cortisol for one injection.

EINLEITUNG

Über die Trennung von Corticosteroiden durch die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) ist bereits eine grössere Zahl von Arbeiten veröffentlicht worden, jedoch nur in wenigen Fällen wird eine quantitative Analyse von Cortisol durchgeführt (Tabelle I).

Für arbeitsphysiologische Untersuchungen zur tagesperiodischen Schwankung der Cortisolausscheidung im Urin war es unser Ziel, eine schnelle quantitative hochdruck-flüssigkeitschromatographische Methode zu entwickeln. Dafür werden in Abständen von 2–3 Stunden Urinproben gesammelt, darin der Gehalt an freiem Cortisol bestimmt und auf die Ausscheidung pro Minute umgerechnet.

Die Abtrennung von Cortisol aus Urin erfolgt durch die Extraktion mit

TABELLE I

HOCHDRUCK-FLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE VON CORTISOL UND ANDEREN CORTICOSTEROIDEN (LITERATURÜBERSICHT)

Trennmaterien	Mobile Phase	Anwendung	Literatur
Kieselgel (SIL-X, Perkin-Elmer, Überlingen, B.R.D.)	Chloroform-Methanol (100:1)	Serum (qual.)	1
Kieselgel (10 μ m, Varian, Darmstadt, B.R.D.)	Chloroform-Dioxan (100:5)	Pharmaceutica	2
Kieselgel (10 μ m, Partisil 10, Reeve Angel, Clifton, N.J., U.S.A.)	<i>n</i> -Heptan-Äthanol (75:25)	-	3
Kieselgel Vydac-101 SI (30-44 μ m, Macherey, Nagel & Co., Düren, B.R.D.)	<i>n</i> -Hexan-Chloroform-Methanol (60:38:2)	-	4
Kieselgel (10-15 μ m)	ternäres Gemisch: 2,2,4-Trimethylpentan-Äthanol-Wasser	Serum (quant.)	5
Kieselgel (4-8 μ m, Pechiney, St. Gobain, Frankreich)	ternäres Gemisch: Dichlormethan-Äthanol-Wasser	Serum (quant.)	6
ODS-Kieselgel (SIL-X(RP), Perkin Elmer)	Methanol-Wasser (40:60)	-	1
ODS-Kieselgel (CO:Pell ODS 41 μ m, Reeve Angel)	Methanol-Wasser (50:50)	-	7
Amberlite LA-1 [<i>n</i> -Dodecyl-(trialkylmethyl)amin] (Rohm & Haas, Darmstadt, B.R.D.) auf Kieselgelen	Wasser	-	8
1% BOP (β,β' -Oxydipropionitril) auf Kieselgel (25-37 μ m, DuPont, Bad Nauheim, B.R.D.)	Tetrahydrofuran-Heptan (20:80)	-	9
1% BOP (β,β' -Oxydipropionitril) auf Kieselgel (25-37 μ m, DuPont)	5% Essigsäureäthylester + 0.2% Acetonitril in <i>n</i> -Hexan	Pharmaceutica	10
1% ANH (Cyanoäthylsilicon) auf Kieselgel (25-37 μ m, DuPont)	1% Methanol in Wasser	Pharmaceutica	11

Chloroform, die organische Phase wird mit Natronlauge und Wasser gewaschen. Dieses Verfahren hat sich in der Analytik der 17-Hydroxycorticosteroide bewährt (siehe z.B. Lit. 12) und sollte zur Anreicherung für die anschließende HPLC-Analyse eingesetzt werden.

Für die Bestimmung von Cortisol im Serum wurde von Meijers et al. [5] sowie Hesse et al. [6] ein ternäres Gemisch als System für eine Verteilungschromatographie verwendet. Wendet man dieses Verfahren für Urinextrakte an, so erscheinen nach dem Cortisol-Peak noch eine Reihe von Substanzen mit langen Retentionszeiten, die sich bei den nachfolgenden Analysen störend bemerkbar machen. Weitere Reinigungsschritte des Extraktes würden jedoch die Anwendbarkeit der Analysenmethode für die Routine einschränken.

An Kieselgel sind bisher in erster Linie Trennungen aus reinen Lösungen beschrieben worden. Die qualitative Analyse eines Plasma-Extraktes von Touchstone und Wortmann [1] ist nicht befriedigend. Als Mobile Phasen werden Gemische unpolarer Lösungsmittel wie Chloroform oder *n*-Heptan bzw.

n-Hexan mit geringen Prozentgehalten an Methanol oder Äthanol verwendet (Tabelle I).

Auch Trennmaterialien mit chemisch gebundenen Phasen sollten wegen der weniger kritischen Elutionsbedingungen für die Auftrennung von Urinextrakten zur Bestimmung von Cortisol geprüft werden.

EXPERIMENTELLES

Material

HPLC-Geräte: Hochdruckpumpe M-6000 A (Waters Assoc.), Probeninjektionssystem U 6 K (Waters Assoc.), und Zweistrahl-Mehrwellenlängen-UV/VIS Photometer M 440 (Waters Assoc.).

Sonstige Geräte: Schüttelmaschine, Fraktionenschnellverdampfer (Ed. Bühler), 50-ml Schütteltrichter, Spitzgläser (Höhe 9.5 cm, I.D. 2.3 cm, Fassungsvermögen ca. 30 ml), Faltenfilter (Durchmesser 9 cm, Selecta), und Injektionspritze Pressure Lok, Series B-110 (Precision Sampling, Baton Rouge, La., U.S.A.).

Chemikalien: Chloroform p.a. (Merck, Darmstadt, B.R.D.) (Wassergehalt unter 0.01%), und Natriumhydroxid p.a. (Merck).

Analysenvorschrift

Vier ml Urin werden auf pH 6.0 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 10 ml verdünnt. Je 5 ml dieser Lösung werden in einem 50-ml Schütteltrichter mit je 10 ml Chloroform 3 min auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Die wässrige Phase wird verworfen, die organische Phase dreimal mit je 2 ml 0.1 N Natriumhydroxid, dann dreimal mit je 2 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Die vollständige Trennung der Phasen muss jeweils abgewartet werden.

Nach dem Waschen wird die Chloroform-Phase über ein trockenes Faltenfilter in ein Spitzglas abgelassen, das Filter zweimal mit je 2 ml Chloroform nachgewaschen. Am Fraktionenschnellverdampfer wird das Lösungsmittel bis zur Trockene ohne Heizung verblasen. Die Innenwände des Glases wäscht man nach dem Eindampfen mit 1 ml Chloroform und verbläst nochmals bis zur Trockene. Danach werden die Spitzgläser in Eiswasser gestellt und der Rückstand in 200 μ l Chloroform gelöst.

Zur HPLC-Analyse an Kieselgel (Bedingungen siehe Fig. 1) werden 25 μ l in das Probeninjektionssystem gespritzt. Bereits nach maximal 15 min kann die nächste Bestimmung durchgeführt werden. Bei geringen Cortisolgehalten (z.B. Mittagsurin oder grossen Urinvolumina in kurzen Zeitintervallen) können je Analyse ohne Schwierigkeiten grössere Urinmengen unter Berücksichtigung der Volumenverhältnisse bei der Extraktion eingesetzt werden. Auch lässt sich das Einspritzvolumen für die HPLC-Analyse erhöhen. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgt über die Peakhöhe.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Anwendung der Adsorptionschromatographie (siehe Tabelle I) auf Urinextrakte zeigte, dass mit Materialien von 5 μ m Teilchengrösse (porös) eine gute Abtrennung des Cortisols von störenden Substanzen erzielt wird (Fig. 1).

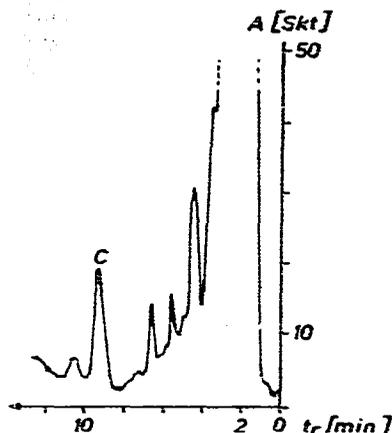


Fig. 1. Adsorptionschromatographische Analyse von Cortisol (C) in Urinextrakten. Säule: Fertigsäule Zorbax-Sil, 25 cm x 2.1 mm I.D., gefüllt mit Kieselgel Zorbax-Sil, polar (5–7 μm); Druck: 3500 p.s.i.; Temperatur: 22°; mobile Phase: Chloroform–Methanol–Wasser (98.3:1.5:0.2); Durchflussgeschwindigkeit: 0.6 ml/min; Probenmenge: 25 μl (entsprechend Extrakt aus 0.25 ml Urin); Detektor: Zweistrahl-Mehrwellenlängen-UV/VIS-Photometer M 440, 254 nm bei 0.02 a.u.f.s.

TABELLE II

VERWENDETE TRENNMATERIALIEN FÜR DIE HOCHDRUCK-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE VON CORTISOL

Trennmateri- (mittlere Korngröße)	Mobile Phasen	Ergebnis
Kieselgele		
Nucleosil 50-5 (5 μm) (Macherey, Nagel & Co.)	1–5% Methanol in Chloroform	quantitative Analyse möglich
Zorbax-Sil (5–7 μm) (DuPont)	1–5% Methanol in Chloroform	quantitative Analyse möglich
Vydac-101 SI (30–44 μm) (Macherey, Nagel & Co.)	1–5% Methanol in Chloroform	} zu geringe Bödenzahlen, keine Abtrennung des Cortisols in Urinextrakten
Perisorb A (30–40 μm) (Merck)	1–5% Methanol in Chloroform	
Chemische-gebundene Phasen		
Nucleosil 10 C ₁₈ (10 μm) (Macherey, Nagel & Co.)	“reversed-phase”: Methanol–Wasser, bis zu 60% Wasser	Trennung in Urinextrakten möglich
Perisorb RP (30–40 μm) (Merck)	“reversed-phase”: Methanol–Wasser, bis zu 60% Wasser	} keine Abtrennung des Cortisols in Urinextrakten
Nucleosil 10 CN (10 μm) (Macherey, Nagel & Co.)	Methanol bzw. Iso- propanol–Chloroform	
	“reversed-phase”: Methanol–Wasser, bis zu 90% Wasser	Trennung in Urinextrakten möglich

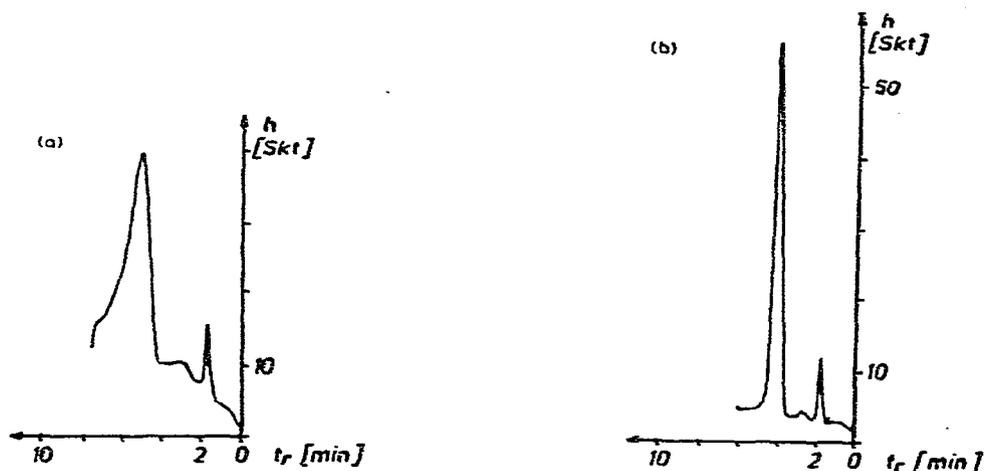


Fig. 2. Einfluss des Wassergehaltes der mobilen Phase auf die Form des Cortisol-Peaks bei der Adsorptionschromatographie, Säule: Fertigsäule Nucleosil 50-5, 20 cm \times 4 mm I.D., gefüllt mit Kieselgel Nucleosil 50-5 ($5 \pm 1.5 \mu\text{m}$); Druck: 1000 p.s.i.; Temperatur: 22°; mobile Phase: (a) Chloroform (über Aluminiumoxid getrocknet)—Methanol (98:2); (b) Chloroform—Methanol—Wasser (97.8:2:0.2); Durchflussgeschwindigkeit: 0.8 ml/min; Probenmenge: 25 μl (entsprechend 100 ng Cortisol); Detektor: wie Fig. 1, bei 0.02 a.u.f.s.

Kieselgele wie Vydac und Perisorb (30–44 μm , "Dünnschicht-Teilchen") lassen sich wegen der geringen Bödenzahlen nicht einsetzen (Tabelle II). Gut reproduzierbare Ergebnisse an Kieselgel sind jedoch nur dann zu erhalten, wenn der Wassergehalt in der mobilen Phase genau eingehalten wird. Werden wasserfreie Lösungsmittel (Trocknung über Aluminiumoxid) eingesetzt, so wird ausser einer geringen Bödenzahl ein Tailing des Cortisol-Peaks beobachtet (Fig. 2a). Durch den Zusatz von 0.2% Wasser zur mobilen Phase wird die Peakform für Cortisol günstig verändert (Fig. 2b) (siehe auch Lit. 13) und eine Trennung von anderen Substanzen erst möglich.

An Nucleosil-CN ist mit der Verteilungschromatographie (Methanol oder Isopropanol in Chloroform) keine Abtrennung des Cortisols von anderen Substanzen in den Urinextrakten möglich. Mit der "reversed-phase"-Chromatographie (Methanol in Wasser) gelingt dies sehr gut. Ebenso geeignet ist Nucleosil 10 C_{18} (ODS) mit Gemischen aus Methanol und Wasser als mobile Phasen (Fig. 3). Eine Übersicht über die verwendeten Trennmaterien und Trennsäulen und deren Eignung für die Analyse von Cortisol in Urinextrakten gibt Tabelle II.

Es wurden verschiedene Urinproben mit der Adsorptions- und der "reversed-phase"-Chromatographie (Bedingungen siehe Fig. 1 und 3) quantitativ analysiert. Tabelle III zeigt die Ergebnisse dieser Bestimmungen. Bis auf eine Probe werden in allen Fällen mit der "reversed-phase"-Chromatographie niedrigere Werte erhalten. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die schlechte Löslichkeit des Urinextraktes in Wasser—Methanol-Gemischen zurückzuführen.

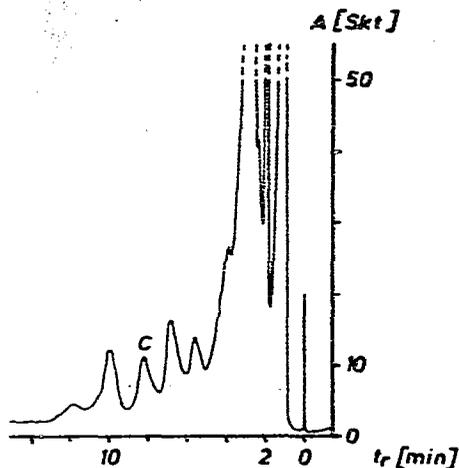


Fig. 3. "Reversed-phase"-chromatographische Analyse von Cortisol (C) in Urinextrakten. Säule: Fertigsäule Nucleosil 10 C₁₈, 20 cm × 4 mm I.D., gefüllt mit Nucleosil 10 C₁₈ (= Octadecylgruppen) (10 ± 1.5 μm); Druck: 1000 p.s.i.; Temperatur: 22°; mobile Phase: Methanol-Wasser (55:45); Probenmenge: wie Fig. 1; Detektor: wie Fig. 1, bei 0.01 a.u.f.s.

TABELLE III

ERGEBNISSE DER BESTIMMUNGEN VON FREIEM CORTISOL IM URIN NACH VERSCHIEDENEN METHODEN (ng/ml)

Die HPLC-Werte sind auf eine Wiederfindung von 100% korrigiert.

No. des Urins	"Reversed-phase"-HPLC	Adsorptions-HPLC	Proteinbindung
1	8.0	8.7	30.3
2	21.5	51.3	68.3
3	23.3	42.3	42.4
4	17.4	56.3	52.6
5	37.4	44.7	43.1

TABELLE IV

ERGEBNISSE DER HPLC-ANALYSE VON FREIEM CORTISOL IM URIN

Bestimmung (N=5)	$\bar{X} \pm S.D.$ (ng/ml)	Wiederfindung (%)
Ohne Zusatz	19.8 ± 1.5	—
Zusatz 100 ng/ml Urin	92.4 ± 3.9	72.6
Bestimmungsgrenze (6-fache Höhe des Rauschpegels)	3 ng (je Einspritzung)	

Trockene Extrakte wurden mit einem Zusatz an Cortisol zuerst in Chloroform gelöst, wieder eingedampft und anschliessend in Wasser-Methanol (45:55) gelöst. Auch hier wurde das zugesetzte Cortisol (je 100 ng) nicht vollständig wiedergefunden (Verluste zwischen 20 und 50%). Es ist daher zu vermuten, dass Urininhaltstoffe in den Chloroformextrakten beim Lösen mit Wasser-Methanol-Gemischen als eine Art von Spurenfänger in bezug auf das Cortisol wirken. Lösungen der Extrakte in Chloroform können bei der

“reversed-phase”-Chromatographie nicht verwendet werden, da Störungen der mobilen Phase zu beobachten sind.

Der Vergleich der Ergebnisse aus der adsorptionschromatographischen Bestimmung mit den Werten, die nach der Proteinbindungsmethode durchgeführt wurden [14], zeigt eine befriedigende Übereinstimmung bis auf Urin No. 1. Diese Probe wies flockige Fällungen auf und wurde für die HPLC-Analyse filtriert. Als innerer Standard kann wie bei den Serumanalysen nach Hesse et al. [6] Prednisolon zugesetzt werden, das im Chromatogramm nach dem Cortisol auftritt. Da jedoch häufig an dieser Stelle ebenfalls ein Peak aus den Urinextrakten erscheint, wird bei Doppelbestimmungen nur einer Probe Prednisolon zugesetzt, um eine mögliche Störung bei der quantitativen Auswertung berücksichtigen zu können.

Die Ergebnisse der beschriebenen HPLC-Analyse von freiem Cortisol im Urin sind in Tabelle IV zusammengestellt. Die niedrige Wiederfindung ist auf die einmalige Extraktion bei einem Volumenverhältnis von nur 1:2 (Urin zu Chloroform) zurückzuführen. Eine Erhöhung der Wiederfindung durch mehrmalige Extraktion oder ein günstigeres Volumenverhältnis erscheint wegen des grösseren Zeit- bzw. Arbeitsaufwandes beim Extrahieren und Eindampfen nicht sinnvoll.

DANK

Wir danken Herrn Priv. Doz. Dr. H. Wissner, Leiter der Abteilung für klinische Chemie des Robert-Bosch-Krankenhauses, Stuttgart, für die Durchführung der Cortisol-Analysen nach der Proteinbindungsmethode und die Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren, für die Fertigsäule Nucleosil 10 CN (10 μ m).

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Möglichkeiten der hochdruck-flüssigkeitschromatographischen Analyse von Cortisol mit Methoden der Adsorptions-, Verteilungs- und “reversed-phase”-Chromatographie untersucht. Die quantitative Analyse von freiem Cortisol aus Urin in Chloroformextrakten ist adsorptionschromatographisch an Kieselgel mit einer mobilen Phase aus 1.5% Methanol und 0.2% Wasser in Chloroform durchführbar. Die Zeit für eine chromatographische Analyse beträgt 10–15 min; die Bestimmungsgrenze liegt bei 3 ng Cortisol je Einspritzung.

LITERATUR

- 1 J.C. Touchstone und W. Wortmann, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 244.
- 2 E. Gaetani und C.F. Laureri, *Farmaco, Ed. Prat.*, 29 (1974) 110.
- 3 *Liquid Chromatography Source Book*, Bulletin No. 103, Reeve Angel, Clifton, N.J., 1974.
- 4 *High Pressure Liquid Chromatography*, Macherey, Nagel & Co., Düren, Februar 1975, S. 8.
- 5 C.A.M. Meijers, J.A.R.J. Hulsman und J.F.K. Huber, *Z. Anal. Chem.*, 261 (1972) 347.
- 6 C. Hesse, K. Pietrzik und D. Hötzel, *Z. Klin. Chem. Biochem.*, 12 (1974) 193.
- 7 Report No. 6-24, Reeve Angel, Clifton, N.J., 1974.

- 8 S. Siggia und R.A. Dishman, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1223.
- 9 R.A. Henry, J.A. Schmitt und J.F. Dieckman, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 513.
- 10 J.A. Mollica und R.F. Strusz, *J. Pharm. Sci.*, 61 (1972) 444.
- 11 M.C. Olson, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 2001.
- 12 H. Breuer, O. Hamel und H.L. Kruskemper (Herausgeber), *Methoden der Hormonbestimmung*, Thieme, Stuttgart, 1975.
- 13 H. Engelhardt, *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975, S. 97.
- 14 J. Köbberling und A. von zur Mühlen, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 10 (1972) 495.