

CHROM. 3520

EINE DIREKTE, FLUOROMETRISCHE, QUANTITATIVE, DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHISCHE ROUTINEMETHODE ZUR BESTIMMUNG VON FREIEM CORTISOL, CORTISON, CORTICOSTERON UND COMPOUNDS IM PLASMA

A. UETTWILLER UND M. KELLER

Universitäts-Frauenklinik Basel (Schweiz)*

(Eingegangen den 4. März 1968)

SUMMARY

A direct, fluorometric, quantitative routine thin-layer chromatographic method for determination of free cortisol, cortisone, corticosterone and compound S in plasma

A description is given of a reliable, quantitative routine thin-layer chromatographic method for the simultaneous determination of the free corticoids, cortisol, cortisone, corticosterone and compound S in human blood plasma. The separated corticoid spots show fluorescence quenching on the thin-layer chromatogram. Direct quantitative determination of the spots is possible by measurement of the reflectance. The reliability criteria of the method are given.

Erste quantitative Corticoidbestimmungen im Plasma wurden von NELSON UND SAMUELS¹ durchgeführt. Die Methoden wurden seither vielfach verbessert und vereinfacht. Leider erwiesen sich aber die meisten Analysenverfahren immer noch als zu kompliziert, arbeitsintensiv und vor allem als zu wenig spezifisch. Die fluorometrische Bestimmung der Plasmacorticoide^{2,3} hat sich in den letzten Jahren als Fortschritt erwiesen. Das Verfahren beruht auf der gemeinsamen Fluoreszenzentwicklung von Cortisol und Corticosteron in einem Schwefelsäurerereagenz. Uns erschienen auch diese fluorometrischen Methoden für viele Problemstellungen als zu wenig spezifisch. Wir denken dabei z.B. an Funktionsteste mit Adrenocorticostatica. Es wurde deshalb eine direkte, quantitative, dünnenschichtchromatographische Methode ausgearbeitet, die es erlaubt, auf einer Platte Cortisol, Cortison, Corticosteron und Compound S getrennt zu erfassen.

METHODIK

Sämtliche Lösungsmittel wurden vor Gebrauch getrocknet und nach den üblichen Verfahren destilliert. Die für die Wiedergewinnungsversuche und Standardlösungen verwendeten Steroide wurden chromatographisch auf ihre Reinheit geprüft.

* Direktor: Prof. Dr. Th. KOLLER; Leiter der Laboratorien: Dr. M. KELLER.

Extraktion

5 bis 10 ml heparinisiertes Plasma werden zweimal mit 100 ml Äther-Methylenchlorid (4:1) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 10 ml NaOH (0.1 N) und mit zweimal 50 ml Wasser gewaschen. Rasches Arbeiten ist sehr wichtig. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei 40° abdestilliert und der Rückstand am Vakuum getrocknet.

Säulenchromatographische Isolierung der Corticoidfraktion

Die Säule wird mit 2 g Florisil (60/100 mesh, Dr. Bender und Dr. Hobein AG, Zürich) in einem Gemisch von Äther-Chloroform (1:1) bereitet. Säulendurchmesser 1 cm. Lösen des Extraktionsrückstandes in 1-2 ml des Gemisches und auf die Säule geben. Eluieren mit 20 ml Chloroform. Verwerfen dieser Fraktion. Anschliessend eluieren mit 40 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (3:1) und Einengen am Rotationsverdampfer bei 40°. Trocknen des Rückstandes am Vakuum.

Dünnschichtchromatographie

Glasplatten: 20 × 20 cm (auf einer Platte können vier komplette Analysen ausgeführt werden). Sorptionsmittel: MN-Kieselgel G-HR UV₂₅₄. Aktivierungszeit: zuerst lufttrocknen (60 Min.), dann bei 120° (60 Min.). Schichtdicke: 0.3 mm. Fliessmittel: Chloroform-Methanol-Eisessig (90:5:5). Laufstrecke: 15 cm. Laufzeit: 45 Min. $R_F \times 100$ -Werte: Cortisol 20, Cortison 36, Corticosteron 47, Compound S 57.

Auftragung

Die Corticoidfraktion der Säulenchromatographie wird mit 1-2 ml Chloroform-Methanol-Gemisch 3:7 in ein Spitzröhrchen überführt, eingeengt und am Vakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 60 µl des gleichen Lösungsmittelgemisches gelöst und davon 5, 10, 20 µl Mengen mit Microcaps-Pipetten sorgfältig auf die Schicht aufgetragen.

Quantitative Auswertung der DC-Platten

Die Tatsache, dass die meisten Steroide kurzwelliges U.V.-Licht absorbieren, jedoch kein sekundäres Licht im sichtbaren Bereich aussenden, veranlasste uns, die Fluoreszenzauslöschmethode als direkte Auswertungsmöglichkeit auf Dünnschichtplatten anzuwenden. Das von uns zu diesem Zweck leicht abgeänderte Chromoscan-Densitometer mit Zusatz zur Dünnschichtauswertung (Firma Joyce, Loeb und Co. Ltd., Gateshead-on-Tyne 11, England) eignet sich dafür gut. Wir haben das Verfahren bereits erfolgreich zur quantitativen Bestimmung von Plasmaprogesteron angewendet⁴. Das Schema des Strahlenganges für die Reflexionsmessung ist in der Fig. 1 dargestellt. Wir möchten ausdrücklich betonen, dass unsere quantitative Auswertung nur mit Reflexionslicht ausgeführt wird, da aus verständlichen Gründen eine quantitative Auswertung von Dünnschichtplatten mit durchfallendem Licht keine vernünftigen Resultate liefern kann. Unsere Messtechnik ist einfach. Die Flecken werden unter einer U.V.-Lampe (254 nm) sichtbar gemacht und markiert (Fig. 2). Zur Auswertung der Flecken verwenden wir einen Lichtpunkt (Durchmesser 2.5 mm). Eventuell vorhandene "background"-Störungen werden behoben, durch Abtasten der Flecken senkrecht zur Laufrichtung des Chromatogramms. Wir stellten keinerlei Streulichteffekte fest. Grundbedingung für die quantitative Auswertung

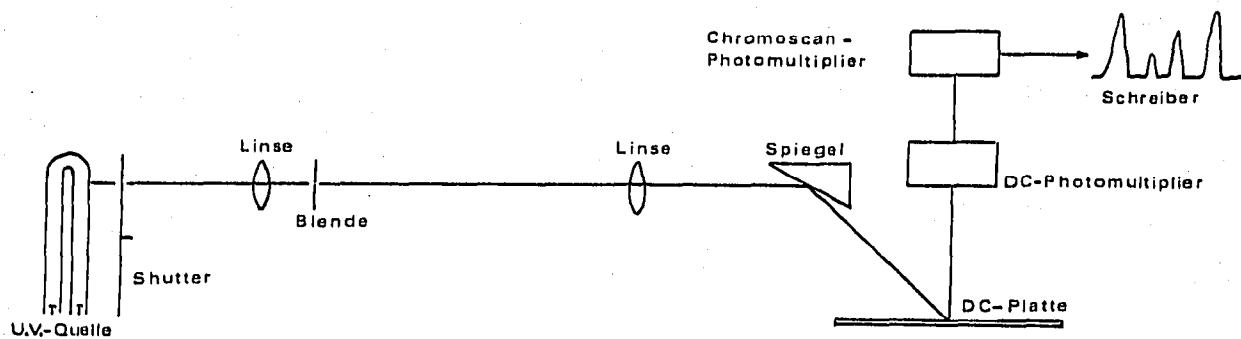


Fig. 1. Schema der apparativen Anordnung für die Reflexionsmessung.

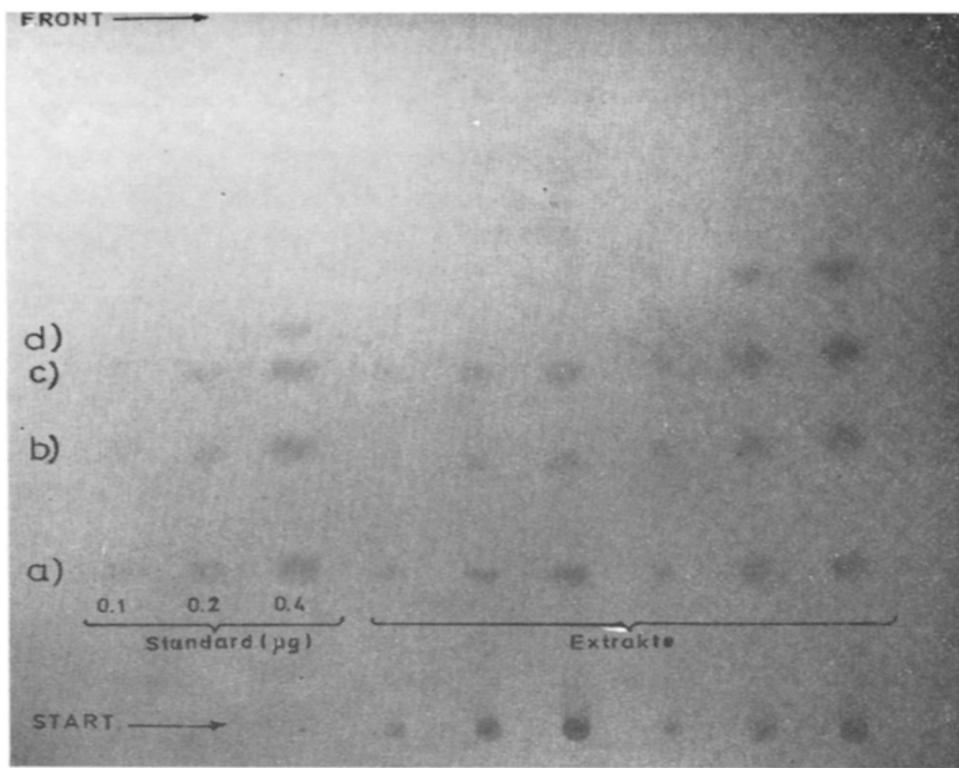


Fig. 2. Dünnenschichtchromatogramm der Corticoidfraktion, aufgenommen im kurzweligen U.V.-Licht. a = Cortisol; b = Cortison; c = Corticosterone; d = Compound S.

eines Dünnenschichtchromatogramms ist die Tatsache, dass die Peakfläche (planimetrisch bestimmt) eines Analysenflecks ein Mass für die vorhandene Konzentration ist. Die Fig. 3 zeigt am Beispiel von reinem Cortisol die Auswertungskurven einer Verdünnungsreihe. Die bestehende Flächenproportionalität wird an den Beispielen von Cortisol, Cortison und Corticosterone (Fig. 4) gezeigt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die günstigsten Auswertbereiche für Cortisol und Corticosterone zwischen 0.1 und 0.7 µg und für Cortison zwischen 0.2 und 0.8 µg pro Fleck liegen.

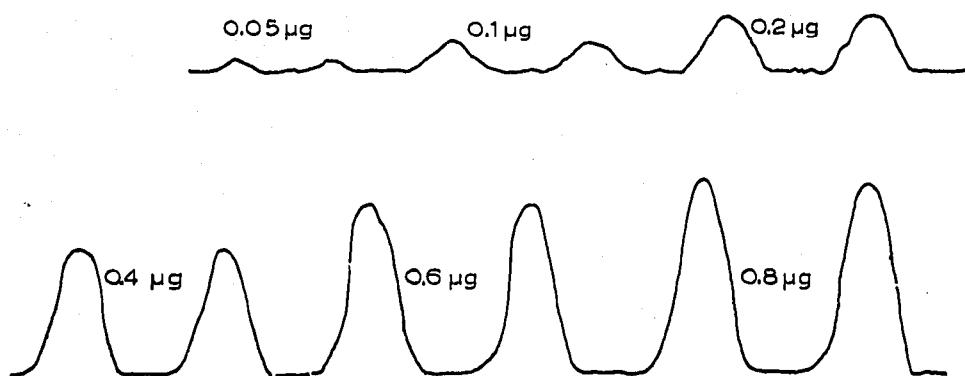


Fig. 3. Quantitative reflektometrische DC-Auswertung. Auswertungskurven einer Cortisol Konzentrationsreihe (0.05–0.8 μg).

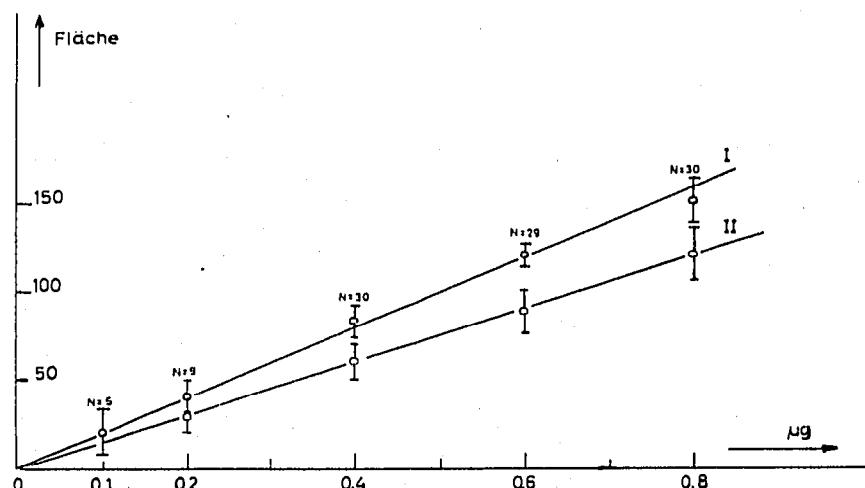


Fig. 4. Flächenproportionalität. I = Cortisol und Corticosteron; II = Cortison.

Zuverlässigkeitsskriterien der Methode

Spezifität: praktisch absolut. Empfindlichkeit: 0.1 bis 0.2 μg/Fleck. Präzision (Cortisol): $N = 29$, $\bar{X} \pm s = 0.6 \pm 0.06^*$, $VK = 10\%$. Richtigkeit (Wiedergewinnungsversuche): Nach Zusatz von 4 μg und 8 μg der Steroide zu jeweils 20 ml "pool"-Plasma fanden wir die in Tabelle I gegebenen Wiedergewinnungsresultate. Zeitaufwand: Eine Person kann in vier Stunden fünf Einzelbestimmungen ausführen.

TABELLE I

WIEDERGEWINNUNGSRISTULTATE NACH ZUSATZ VON STEROIDEN ZU "POOL"-PLASMA

Steroid	Zusatz (μg/20 ml)	Wieder gefunden	N	Zusatz (μg/20 ml)	Wieder gefunden	N
Cortisol	8	84 %	15	4	90 %	10
Cortison	8	85 %	10	4	88 %	10
Corticosterone	8	85 %	10	4	91 %	10
Compound S	5	95 %	5	4	93 %	10

* $s = \sqrt{\frac{\sum X^2 - N\bar{X}^2}{N-1}}$

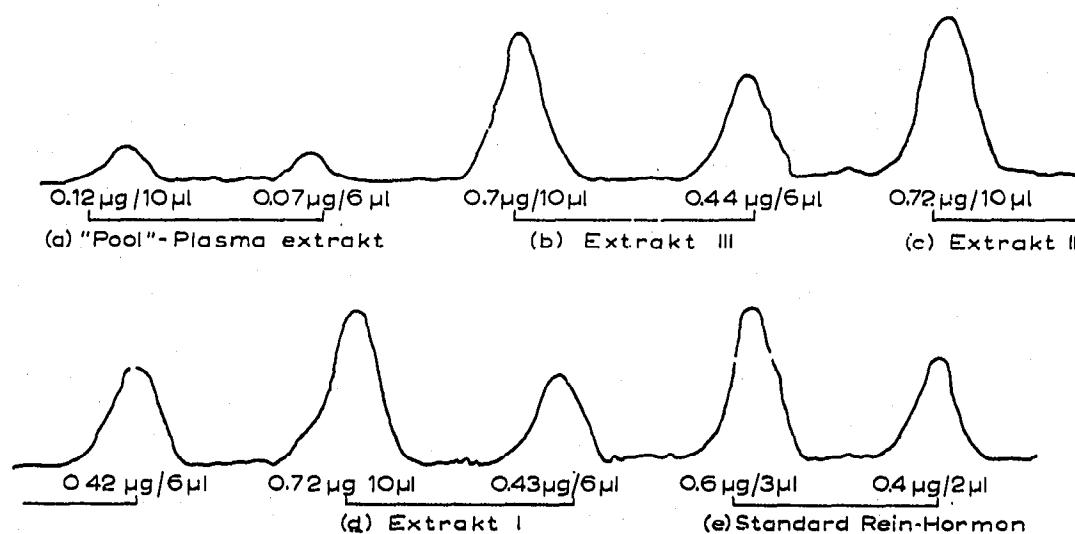


Fig. 5. Typische Auswertekurven eines Dünnschichtchromatogramms von Plasmacortisol (Wiedergewinnungsanalysen). (a) "Pool"-Plasmaextract aus 20 ml Plasma. Es sind zwei Verdünnungen aufgetragen. (b, c, d) Zusatz von je 4 µg Cortisol zu 20 ml des "pool"-Plasmas (Extrakte I, II und III). (e) Standard; Reincortisol. Es wurden von sämtlichen Extracten je zwei Verdünnungen aufgetragen.

Die Fig. 5 zeigt typische Auswertekurven von Plasmaextrakten.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine zuverlässige, quantitative, dünnschichtchromatographische Routinemethode beschrieben, mit welcher gleichzeitig die freien Corticoide Cortisol, Cortison, Corticosteron und Compound S in menschlichem Blutplasma bestimmt werden können. Die aufgetrennten Corticoidflecken zeigen im Dünnschichtchromatogramm Fluoreszenzauslöschung und können durch Reflexionsmessung direkt quantitativ ausgewertet werden. Die Zuverlässigkeitsskriterien der Methode werden angegeben.

LITERATUR

- 1 D. H. NELSON UND L. T. SAMUELS, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 12 (1952) 519.
- 2 M. L. SWEAT, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 773.
- 3 R. SPAETHE, CH. MINNEKER UND H. OTTO, *Z. Klin. Chem.*, 5 (1967) 168.
- 4 M. KELLER UND A. UETTWILLER, *Gynaecologia*, 165 (1968) 385.