

Fluorometrische Mikro-Bestimmung von Δ^4 -3 Ketosteroiden mit der Lithiumhydroxyd-Reaktion

Von E. NOWOTNY¹⁾, R. ABRAHAM und Hj. STAUDINGER

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger)

(Der Schriftleitung zugegangen am 4. Juni 1964)

Eine neue quantitative Bestimmungsmethode für Δ^4 -3 Ketosteroide wird beschrieben, die auf der Messung der Fluoreszenzchromogene auf Lithiumhydroxydoberflächen beruht. Die Methode ist empfindlich (10^{-7} g) für Δ^4 -3 Ketosteroide spezifisch und hinreichend genau ($\pm 10\%$).

A new quantitative method for the determination of Δ^4 -3 oxosteroids is described. It involves the measurement of the fluorescence chromogens on lithium hydroxide surfaces. The method is sensitive (10^{-7} g), specific for Δ^4 -oxosteroids and sufficiently accurate ($\pm 10\%$).

Trägt man Δ^4 -3 Ketosteroide auf eine Lithiumhydroxydoberfläche auf, so entwickelt sich nach Erwärmen eine spezifische und empfindliche Fluoreszenz (1). Es schien lohnend, diese Beobachtung zu einer quantitativen Methode zur Bestimmung von Δ^4 -3 Ketosteroiden auszuarbeiten. Die bisher bekannten Bestimmungen sind meist weniger empfindlich oder nicht so spezifisch. Auch die Fluoreszenzmessung in konzentrierter Schwefelsäure hat einige Nachteile (2).

Versuche

Herstellung der Lithiumhydroxyd-Preßlinge

Die Lithiumhydroxyd-Preßlinge werden mit einer hydraulischen Presse (Fa. Perkin-Elmer) hergestellt. Sie sind 2–2,1 mm stark und haben einen Durchmesser von 13 mm. In der Mitte haben sie eine konische Vertiefung von 1,4 mm (1,8 mm Durchmesser unten, 2 mm Durchmesser oben, siehe Abb. 1). 400 mg \pm 2 mg fein zerriebenes Lithiumhydroxyd²⁾ werden bei 250 kg/cm² zwei Minuten lang mit einem Spezialstempel gepreßt (Abb. 2). Der Zapfen des Stempels und der Boden der Presse müssen dabei immer ganz sauber sein. Einwaage, Druck der Presse und Zeit sind genau einzuhalten, damit die Preßlinge ganz gleichmäßig werden.

Eichkurven

Stammlösungen und Verdünnungen

Die verschiedenen Δ^4 -3 Ketosteroide werden in eiskaltem, frisch destilliertem Chloroform unter Zusatz von 2% Äthanol, gelöst.

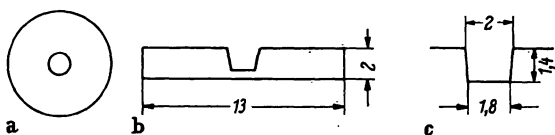


Abb. 1: Schema und Maße eines Lithiumhydroxyd-Preßlings:
A: Sicht von oben. B: Querschnitt. C: Maße der Vertiefung

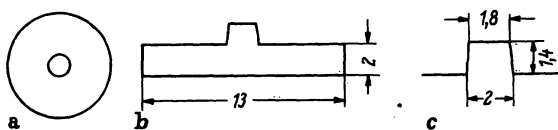


Abb. 2: Schema und Maße des Stempels zur Anfertigung der Lithiumhydroxyd-Preßlinge

A: Sicht von oben. B: Querschnitt. C: Maße des Zapfens

¹⁾ Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung.

²⁾ Lithiumhydroxyd etwa 98% LiOH (Merck u. Co., Darmstadt).

Die Konzentration der Stammlösungen ist in allen Fällen 1 mg/ml. Aus den Stammlösungen werden Verdünnungen von 0,05–0,10–0,30–0,50–0,80 μ g in 5 μ l Chloroform hergestellt. Die Lösungen müssen während des Arbeitsganges eiskalt gehalten werden, da sonst durch Lösungsmittelverluste Konzentrationsänderungen eintreten. Die Steroidlösungen in Chloroform sind nur begrenzt haltbar.

Auftragung der Lösungen auf die Lithiumhydroxyd-Preßlinge

Die Eichlösungen werden mit einem Mikropipettiergerät (3) auf die Lithiumhydroxyd-Preßlinge aufgetragen. Man benutzt eine „Colodur-Blaubrand“ 10 μ l-Pipette mit kapillarförmig ausgezogener Spitze. Man trägt auf jeden Preßling, von direktem Tageslicht geschützt, 5 μ l innerhalb von 2–3 Minuten auf. Es empfiehlt sich, die Lösungen in Portionen von 0,2–0,3 μ l aufzutragen und das Lösungsmittel durch Anblasen jeweils zu verdunsten. Die Lösung darf nicht über den Rand der Tablettenvertiefung steigen. Damit die später auszuleuchtende Fläche homogen wird, dreht man die Tablette, nachdem man etwa $\frac{1}{4}$ der 5 μ l aufgetragen hat, um 45°. Ebenfalls wird ein Leerwert mit 5 μ l Chloroform aufgetragen. Damit die Streuungen klein bleiben, muß man die Lösungen immer kalt halten und schnell auftragen.

Entwicklung der Fluoreszenz

Die so vorbereiteten Preßlinge gibt man schnell in eine auf 100° vorgewärmte Petrischale und hält diese 20 Min. im Trockenschrank bei 100°. Bei höheren Temperaturen erzielt man eine stärkere Fluoreszenz (Abb. 3), doch sind die Fluoreszenzintensitäten dann schlecht reproduzierbar und man erhält keine brauchbare Eichkurve. Bei 100° bleibt die Fluoreszenzintensität zwischen 5–30 Minuten Erwärmungszeit etwa konstant (vgl. Abb. 4). Die Zeitspanne zwischen Auftragen und Erwärmen soll nicht länger als 2 Stunden betragen, da sonst Verluste in der Fluoreszenzintensität entstehen.

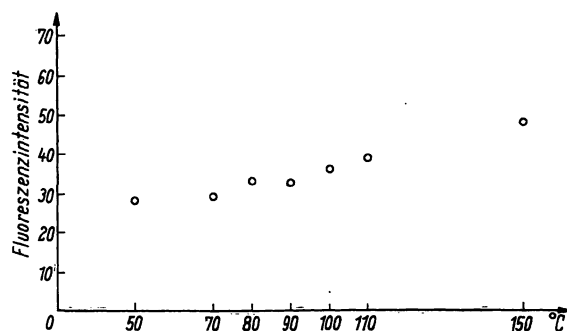


Abb. 3: Temperaturabhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität für Cortisol, 0,3 μ g. — Dauer des Erwärmens 20 Minuten — (Mittel aus 3 Messungen)

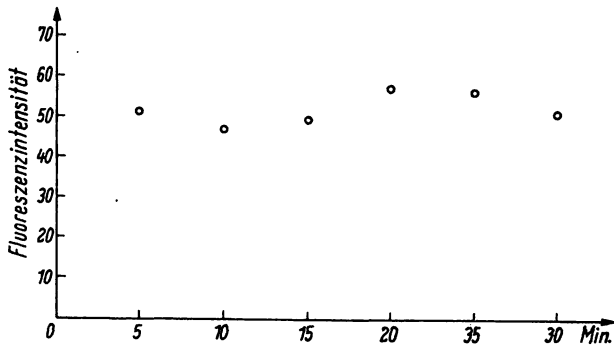


Abb. 4: Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der Dauer des Erwärms auf 100° C, Cortisol 0,5 µg (Mittelwert aus 3 Messungen)

Messung der Fluoreszenz

Die Preßlinge prüft man qualitativ im UV-Licht auf ihre Homogenität. Die ungleichmäßig aufgetragenen Tabletten werden verworfen. Die Fluoreszenzintensitäten werden mit dem Fluoreszenzzusatz zum Eppendorf-Photometer gemessen (Primärfilter 405 + 436 mµ, Sperrfilter 530—3000 mµ). Um die durch die Inhomogenität der fluoreszierenden Oberfläche hervorgerufenen Meßfehler möglichst klein zu halten, mißt man die Preßlinge 6—8 mal aus. Dieses erreicht man durch Drehen der Preßlinge im Halter um 45—60° (Abb. 5). Man errechnet das arithmetische Mittel. Es empfiehlt sich zur besseren Kontrolle dreifache Bestimmung von jedem Wert zu machen. Die Preßlinge kann man in einer braunen Flasche längere Zeit aufheben, ohne daß sich die Fluoreszenzintensität ändert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung für Aldosteron, Cortisol, Testosteron und Progesteron sind in der Tabelle 1 sowie in Abbildung 6 zusammengestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die Empfindlichkeit der neuen Methode ausreicht um Mengen bis zu 5×10^{-8} g Steroid zu bestimmen. In allen Fällen läßt sich eine Konzentration von 0,05 µg noch gut vom Leerwert unterscheiden. Progesteron und Testosteron geben eine etwas stärkere Fluoreszenz als Aldosteron und Cortisol. Progesteron und Testosteron sind im Vergleich zu Aldosteron und Cortisol stabiler. Vielleicht werden sie während des Erwärms weniger stark zerstört. Die Genauigkeit der Methode ist ausreichend ($\pm 10\%$). Sie ist für Δ^4 -3 Ketosteroide spezifisch (1). Da jedoch alle

Vertreter dieser Gruppe reagieren, muß für Bestimmungen einzelner Steroide dieser Gruppe im biologischen Material eine chromatographische Trennung vorhergehen. — Wir sind zur Zeit damit beschäftigt, diese Mikro-Bestimmung auf biologisches Material anzuwenden.

Wir danken Prof. Dr., Dr. h. c. A. WETTSTEIN, Basel, für die freundliche Überlassung von Aldosteron.

Der Alexander von Humboldt-Stiftung dankt der eine von uns (EDGAR NOWOTNY) für ein Stipendium, dem Fond der Chemie danken wir für Unterstützung der Arbeiten.

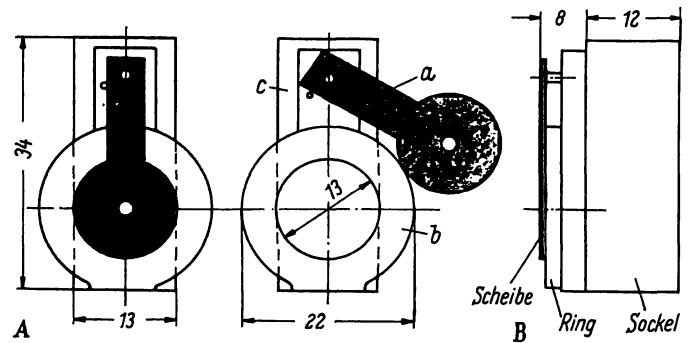


Abb. 5: Schema und Maße des Halters für die Lithiumhydroxyd-Preßlinge für den Fluoreszenzansatz des Photometers Eppendorf. A: Frontansicht a) Mattlackierte schwarze Lochscheibe. b) Ring, der den Preßling aufnimmt. c) Sockel. B: Seitliche Ansicht.

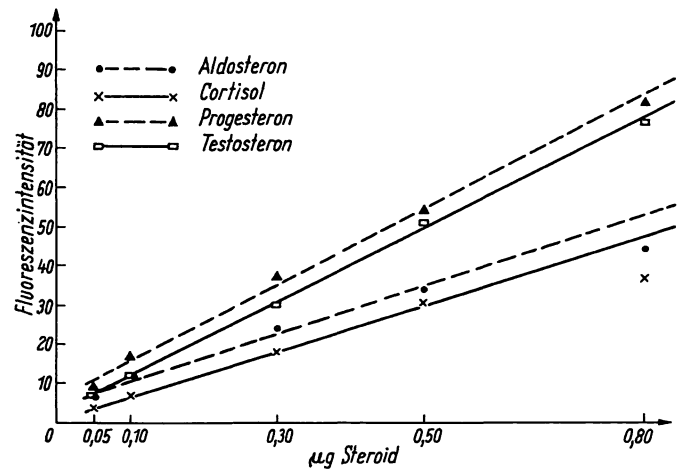


Abb. 6: Eichkurve für Δ^4 -3 Ketosteroide

Tab. 1: Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensität der Steroide aus je 12 Einzelbestimmungen. Werte in Klammern: Standardabweichung ..

Menge in 10^{-6} g	Aldosteron		Cortisol		Progesteron		Testosteron	
Leerwert	19,00	($\pm 1,00$)	19,00	($\pm 1,38$)	17,00	($\pm 2,16$)	17,00	($\pm 1,93$)
0,05	25,50	($\pm 1,78$)	23,00	($\pm 1,68$)	26,00	($\pm 1,93$)	24,00	($\pm 1,72$)
0,10	30,50	($\pm 3,50$)	26,00	($\pm 1,51$)	34,00	($\pm 3,66$)	29,50	($\pm 1,21$)
0,30	43,00	($\pm 2,82$)	37,00	($\pm 3,45$)	55,00	($\pm 5,07$)	47,00	($\pm 4,31$)
0,50	53,00	($\pm 2,91$)	50,00	($\pm 3,16$)	72,00	($\pm 3,10$)	68,50	($\pm 2,80$)
0,80	63,50	($\pm 7,74$)	56,00	($\pm 5,97$)	99,00	($\pm 4,10$)	94,00	($\pm 4,18$)

Literatur

1. ABRAHAM, R. und Hj. STAUDINGER, Z. Naturforsch. 18b, 421 (1963). — 2. ABRAHAM, R. und Hj. STAUDINGER, diese Z. 2, 16 (1964). — 3. BOGUTH, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 285, 93 (1950).

Professor Dr. Hj. Staudinger
Physiol.-chem. Institut der Universität Gießen
63 Gießen, Friedrichstr. 24