Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 235—240, Mai 1970

Bestimmung der 17-Hydroxycorticosteroide im Harn unter Verwendung von Natriummetaperjodat

Von P. DOERR und D. STAMM

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

(Eingegangen am 31. Dezember 1969)

Es werden die Zuverlässigkeitskriterien einer Methode zur Bestimmung der 17-OHCS¹⁾ im Urin untersucht. Die Methode beruht auf der Überführung der C₂₁-Metabolite des Cortisols in 17-Oxosteroide durch Reduktion mit Borhydrid und anschließender Oxydation mit Natriummetaperjodat. Bei der Prüfung der Spezifität werden die gebildeten 17-Oxosteroide nach Abtrennung mit Hilfe der Girard-T-Reaktion dünn-schichtchromatographisch und gaschromatographisch identifiziert. Die Teilschritte der Methode werden diskutiert. Die im 24 Stdn.-Urin ausgeschiedene Menge an 17-OHCS wird an 52 klinisch gesunden erwachsenen Männern und an 47 Frauen ermittelt.

The determination of urinary 17-hydroxycorticosteroids in urine with sodium metaperiodate

The reliability of a method for the determination of 17-OHCS in urine was investigated. The method is based on the conversion of the C₂₁-metabolites of cortisol into 17-oxosteroids by reduction with borohydrite, followed by oxidation with sodium metaperiodate. To test the specificity, the synthesised 17-oxosteroids were separated with the aid of the Girard-T reaction and identified by thin layer and gas chromatography. Each stage of the procedure is discussed. The levels of 17-OHCS in 24 hr. urine samples are reported for 52 healthy adult men and 47 women.

Die von APPLEBY, GIBSON, NORBYMSKI und STUBBS (1) ausgearbeitete Methode zur Gruppenbestimmung der Cortisolmetabolite²⁾ im Harn hatte sich in der klinischen Praxis allgemein durchgesetzt und bewährt. In den letzten Jahren wurden jedoch in zunehmendem Maße Methoden empfohlen (2—8), die sich im wesentlichen von der genannten Methode dadurch unterscheiden, daß die Oxydation mit Perjodat an Stelle von Bismutat durchgeführt wird und daß auf eine heiße Säurehydrolyse verzichtet wird. Fast alle diese Methoden basieren auf der Arbeit von FEW (9) und unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Der Vorteil von Natriummetaperjodat gegenüber Bismutat liegt nach FEW in der größeren Selektivität der Oxydation. Nach Reduktion der 11-, 17- und 20-Oxogruppen von Steroiden der Androstan- und Pregnanreihe mit Borhydrid wird durch Natriummetaperjodat die 17-, 20-Diol- und 17-, 20-, 21-Triolseitenkette der C₂₁-Steroide abgespalten. Dabei entstehen die entsprechenden 17-Oxosteroide, ohne daß die 11-Hydroxygruppe teilweise wieder oxydiert wird, wie dies bei Verwendung von Bismutat der Fall ist. Die 17-Hydroxygruppe der ursprünglich im Urin vorhandenen 17-Oxosteroide bleibt in jedem Fall reduziert. Außerdem erübrigt sich bei Gebrauch

von Natriummetaperjodat eine heiße Säurehydrolyse, da die Glucuronsäurekonjugate oxydativ gespalten werden. Neben dem freien Steroid soll noch der entsprechende Formiatester entstehen, der leicht alkalisch verseift werden kann. Die bei der heißen Säurehydrolyse entstehenden Artefakte werden daher vermieden. Treffen die genannten Voraussetzungen zu, so ist zu erwarten, daß sämtliche Cortisolmetabolite der 5 β -Pregnanreihe in 11 β -Hydroxyätiolcholanolon, die der 5 α -Pregnanreihe in 11 β -Hydroxyandrosteron überführt werden.

Zweck dieser Arbeit ist es nicht, den bereits gemachten Vorschlägen zur Bestimmung der 17-OHCS noch eine weitere, eigene Modifikation hinzuzufügen; vielmehr sollen die Zuverlässigkeitskriterien, insbesondere die Spezifität, die von den meisten Autoren nicht untersucht wurde, geprüft werden. Unter den gemachten Vorschlägen, die Methode von FEW den Bedürfnissen der klinischen Routine anzupassen, entspricht die hier beschriebene Methode am meisten dem Vorschlag von WILSON und LIPSETT (2). Auf die einzelnen Teilschritte soll nur dann eingegangen werden, wenn sich unsere Ergebnisse von den in der Literatur mitgeteilten unterscheiden.

Methodik

Reagenzien und Geräte

Soweit nicht anders vermerkt, werden Reagenzien der Fa. Merck A. G., Darmstadt, vom Reinheitsgrad p. a. benutzt.

Zur Routinebestimmung der 17-OHCS werden benötigt:

Reagenzien: Diäthyläther (peroxydfrei), Chloroform, Äthanol, absol. rein (Reinigung: 1 l Äthanol wird mit 4 g *m*-Phenylen-diammoniumdichlorid versetzt, 10—14 Tage bei gelegentlichem Umschütteln im Dunkeln aufbewahrt und dann destilliert), Essigsäure 96proz., Natriumhydroxidplättchen, Kaliumhydroxidplättchen, Natriumborhydrid, Natriummetaperjodat, Kaliumhydrogenphosphat, Natriumsulfat (wasserfrei), 1,3-Dinitrobenzol

¹⁾ 17-OHCS = 17-Hydroxycorticosteroide; 17-KS = 17-Oxosteroide; DHEA = Dehydroepiandrosteron; THE = Tetrahydrocortison; THF = Tetrahydrocortisol; allo-THF = Allotetrahydrocortisol.

²⁾ Um möglichen Mißverständnissen vorzubeugen sei darauf hingewiesen, daß in der vorliegenden Arbeit der Begriff 17-Hydroxycorticosteroide (17-OHCS) im Sinne von NORBYMSKI und Mitarbeitern verwendet wird. Im englischen Sprachbereich werden die Hydroxycorticosteroide, die nach vorangegangener Reduktion der endogenen 17-Oxosteroide als 17-Oxosteroide nachgewiesen werden, als „ketogene Steroide“ bezeichnet (C. H. GRAY, D. N. BARON, R. V. BROOKS und V. H. T. JAMES).

zur 17-Oxosteroid-Bestimmung, Dehydroepiandrosteron (3β -Hydroxy-5-androsten-17-on).

Lösungen: Natronlauge 0,1N, 2,5N und 5N, Kalilauge 5N (titrimetrisch einstellen), Phosphatpuffer pH 7 1M, Essigsäure 25proz., Natriumborhydrid 10proz. in 0,1N NaOH (für jede Bestimmung frisch ansetzen), Natriummetaperjodat 10proz. (für jede Bestimmung frisch ansetzen), 1,3-Dinitrobenzol 2proz. in absol. Äthanol, DHEA-Stammlösung 1 mg/ml Äthanol, DHEA-Gebrauchsstandard 50 µg/ml Äthanol.

Geräte: Spektralphotometer PMQ II³⁾, Rotationsverdampfer, Schüttelmaschine mit rotierender Achse, an der bis zu 24 Spitzreagenzgläser mit NS 29-Schliff, Fassungsvermögen etwa 110 ml, befestigt werden.

Zur Bestimmung der Zuverlässigkeitskriterien werden zusätzlich benötigt:

Äthanol (absolut), Äthylacetat, Benzol, Cyclohexan, Dichlormethan, Essigsäure 99–100proz., Toluol, Salzsäure (rauchend), Kaliumcarbonat, Girards Reagenz T (Trimethylacet-hydrazid-ammoniumchlorid), Kieselgel G ohne Fluoreszenzindikator, Träger und stationäre Phasen für die Gaschromatographie⁴⁾: Aeropak 30, 100/120 mesh, SE-30, OV-17, QF-1; Nachweisreagenzien für die Dünnschichtchromatographie: Zimmermann-Reagenz: a) 2proz. 1,3-Dinitrobenzollösung in Äthanol, b) 2,5N methanolische KOH; die Lösungen a) und b) werden direkt vor Gebrauch gemischt; Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach LISBOA (10).

Steroide: Androsteron (3α -Hydroxy-5 α -androstan-17-on), Epiandrosteron (3β -Hydroxy-5 α -androstan-17-on), Tetrahydrocortison (3α , 17 α , 21-Trihydroxy-5 β -pregnan-11, 20-dion), Tetrahydrocortisol (3α , 11 β , 17 α , 21-Tetrahydroxy-5 β -pregnan-20-on), Pregnatriol (3α , 17 α , 20 α -Trihydroxy-5 β -pregnan), Cholesterin (3β -Hydroxy-cholest-5-en); die folgenden Steroide werden von der Fa. Ikapharm⁵⁾ bezogen: Ätiocholanolon (3α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on), 11 β -Hydroxyätiocholanolon (3α , 11 β -Dihydroxy-5 β -androstan-17-on), 11 β -Hydroxyandrosteron (3α , 11 β -Dihydroxy-5 α -androstan-17-on), 11-Oxoätiocholanolon (3α -Hydroxy-5 β -androstan-11, 17-dion), 11-Oxoandrosteron (3α -Hydroxy-5 α -androstan-11, 17-idon), Allotetrahydrocortisol (3α , 11 β , 17 α , 21-Tetrahydroxy-5 α -pregnan-20-on).

Bei der Dünnschichtchromatographie werden 200 × 200 mm Glasplatten benutzt. Die Beschichtung erfolgt mit dem automatischen Beschichtungsgerät 21602⁶⁾.

Zur Gaschromatographie wird das Modell 2120 der Fa. Varian MAT mit zwei Flammenionisationsdetektoren benutzt.

Durchführung der Routinebestimmung der 17-OHCS

10 ml Urin werden in ein Spitzreagenzglas mit Schliff (Fassungsvermögen etwa 110 ml) pipettiert und auf pH 7 mit 0,1N NaOH (Kontrolle mit pH-Papier, Bereich 6–8) eingestellt. Anschließend wird 1 ml der Natriumborhydridlösung zugegeben. Mit etwa 1 ml Diäthyläther kann übermäßige Schaumbildung leicht vermieden werden. Nach einer Stunde Reduktion bei Raumtemperatur wird Natriumborhydrid durch Ansäuern mit 0,8 ml 25proz. Essigsäure zerstört. Nach einer weiteren Viertelstunde pipettiert man in jedes Glas 4 ml der Natriummetaperjodatlösung und stellt das Reaktionsgemisch mit 2,5N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7,0 ein. Die Reaktionsgefäße werden in ein Wasserbad von 37° gestellt. Nach Ablauf einer Stunde wird das Reaktionsgemisch mit 0,5 ml 5N NaOH alkalisch gemacht. Nach weiteren 20 Min. werden die Spitzreagenzgläser aus dem Wasserbad genommen, unter Leitungswasser abgekühlt und die gebildeten 17-Oxosteroide mit 80 ml Äther unter Verwendung der Schüttelmaschine (etwa 60 U./Min.) ausgeschüttelt. Die Ätherphase wird jeweils mit 5 ml 2,5N NaOH, 5 ml Phosphatpuffer und 3 ml demin. Wasser gewaschen. Die Unterphase wird mit Hilfe

einer 20 ml-Rekordspritze mit aufgesetzter Punktionsnadel abgesaugt. Die mit Natriumsulfat getrocknete Ätherphase wird quantitativ in einen 150 ml-Birnenkolben überführt und am Rotationsverdampfer im Wasserbad von 45° abgedampft. Bei Verwendung einer Destillationspinne können 4 Birnenkolben gleichzeitig abgedampft werden. Analog den Urinproben werden als Leerwert 10 ml Wasser durch den gesamten Analysengang geführt. Es genügen insgesamt 3 Leerwertansätze.

Nach Abdampfen des Äthers wird der Rückstand der Proben und Leerwerte in 2,5 ml des gereinigten Alkohols aufgenommen. 1 ml Lösung wird zur Zimmermann-Reaktion benötigt. Normalerweise wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Zimmermann-Reaktion

In Schliffreagenzgläser (NS 14,5, 15–20 ml Fassungsvermögen) werden pipettiert: 1 ml des in Äthanol aufgenommenen Rückstandes der Proben (P), 1 ml des Leerwertes (TRL), 1 ml des DHEA-Gebrauchsstandards (St), 1 ml des gereinigten Äthanol als Reagenzienleerwert der Farbreaktion (RL). In jedes Reagenzglas werden zusätzlich pipettiert: 1 ml Äthanol, 2 ml der 1,3-Dinitrobenzollösung und 2 ml 5N KOH. Der Reaktionsansatz bleibt 90 Min. im abgedunkelten Wasserbad bei 25°. Anschließend gibt man 2 ml demin. Wasser und 5 ml Chloroform hinzu, schüttelt 10–15 Sek. und läßt etwa 5–10 Min. zur Phasentrennung stehen. Die gelblichbraune Oberphase wird abgesaugt und verworfen, die Chloroformphase in ein Zentrifugenglas filtriert. Die Extinktionen (E) der Proben (P), der Leerwerte (TRL, RL) und des Standards (St) werden bei 510 nm gegen Chloroform in 1 cm-Schichtküvetten gemessen.

Berechnung

$$\frac{(E_P - E_{TRL}) \cdot 50 \cdot 1,34 \cdot 1,19 \cdot 2,5 \cdot \text{Harnmenge in l}}{(E_{St} - E_{RL}) \cdot 10} = \frac{(E_P - E_{TRL}) \cdot 19,9 \cdot \text{Harnmenge in l}}{E_{St} - E_{RL}} \quad \text{mg 17-OHCS in THE-Äquivalenten}$$

Zur Berechnung:

1,34: Faktor zur Umrechnung des prozentualen Extinktionskoeffizienten von 11 β -Hydroxyätiocholanolon (Hauptbestandteil der Probe) in den des Standards

1,19: Faktor zur Umrechnung von mg DHEA in mg THE.

Prüfung der Spezifität

Zur Untersuchung der Spezifität der beschriebenen Methode werden die alkoholischen Steroide mit Hilfe von Girards Reagenz T aus dem sogenannten Harnextrakt (Rückstand nach Abdampfen der Ätherphase) abgetrennt, bevor die gebildeten 17-Oxosteroide dünnschichtchromatographisch und gaschromatographisch identifiziert werden. Abweichend von der Vorschrift von Pincus und PEARLMAN (11) wird das Reaktionsgemisch mit einer Kaliumcarbonatlösung und Phosphatpuffer innerhalb weniger Sekunden neutralisiert, so daß ein rasches Arbeiten bei niedrigen Temperaturen nicht nötig ist.

Girard-Trennung: Der in ein Spitzreagenzglas überführte neutrale Harnextrakt wird in 0,5 ml Eisessig gelöst und mit etwa 50 ml Girards Reagenz T versetzt. Nach Erhitzung des Reaktionsgemisches im Glycerinbad auf 100° für 25 Min. werden die Gefäße im kalten Leitungswasser abgekühlt und das Reaktionsgemisch mit 3 ml 1,2N K₂CO₃ und mit 5 ml 0,5M Phosphatpuffer, pH 7, neutralisiert. Die alkoholischen Steroide werden mit 80 ml Äther ausgeschüttelt und verworfen. Die Hydrazone der 17-Oxosteroide werden nach vorsichtiger Zugabe von 3 ml rauchender Salzsäure im Wasserbad bei 37° in eineinhalb Stunden wieder hydrolysiert. Anschließend Ausschütteln mit 80 ml Äther oder 40 ml Dichlormethan, Waschen der organischen Phase mit 3 ml 2,5N NaOH zur Entfernung der Essigsäure und Waschen mit demin. Wasser bis zur Neutralität. Zur Durchführung der Dünnschichtchromatographie oder Gaschromatographie wird der Rückstand in ein geeignetes Gefäß überführt und in 40 µl Toluol aufgenommen.

³⁾ Fa. C. Zeiss, Oberkochen/Württ.

⁴⁾ Fa. Varian MAT, Walnut Creek, Calif., USA.

⁵⁾ Fa. Ikapharm, Ramat-Gan, Israel.

⁶⁾ Fa. Camag, Muttenz, Schweiz.

Dünnschichtchromatographie: Zur Trennung der $C_{19}O_2$ -17-Oxosteroide wird das System Cyclohexan/Äthylacetat 50:50 (v/v), zur Trennung der $C_{19}O_3$ -17-Oxosteroide das System Chloroform/Äthanol 95:5 (v/v) benutzt. Beide Systeme wurden in gleicher oder nur wenig abweichender Zusammensetzung von LISBOA (10) zur Trennung von Steroiden angewandt und sind dort ausführlich diskutiert.

Gaschromatographie: Die Gaschromatographie wird als weiteres Verfahren zur Trennung und Identifizierung der 17-Oxosteroide des neutralen Harnextrakts benutzt. Die $C_{19}O_2$ - und $C_{19}O_3$ -17-Oxosteroide werden sowohl als freie Steroide wie auch als Trimethylsilyläther chromatographiert. Sollen $C_{19}O_2$ - und $C_{19}O_3$ -17-Oxosteroide zugleich getrennt werden, erfolgt die Chromatographie der Verbindungen als freie Steroide auf OV-17.

Ergebnisse und Diskussion

Untersuchung der einzelnen Teilschritte der Methode

Reduktion der Oxogruppen

An reinen Lösungen (10 ml Wasser + 100 oder 200 μ g THE) war die Reduktion der 11-Oxo-Gruppe im Gegensatz zum Urin bei den Bedingungen der angegebenen Methode unvollständig. Die dünnschichtchromatographische und gaschromatographische Auftrennung des Rückstandes der eingedampften Ätherphase zeigte neben 11 β -Hydroxyätiöcholanolon noch eine weitere Substanz mit gleichem Verhalten wie 11-Oxoätiöcholanolon, die etwa 30–50% der Gesamtmenge ausmachte. Wurde die Reduktionszeit oder die Borhydridkonzentration verdoppelt oder die Temperatur des Reaktionsgemisches auf 37° erhöht, so fand sich nur noch 11 β -Hydroxyätiöcholanolon. Daß es sich um eine unvollständige Reduktion und nicht um eine nachträgliche Oxydation mit Natriummetaperjodat handelt, folgt aus den entsprechend durchgeführten Versuchen mit THF. Hier wurde bei sämtlichen Reduktionsbedingungen nur 11 β -Hydroxyätiöcholanolon gefunden.

Die Versuche, bei denen 200 μ g THE zu 10 ml Urin aufgestockt wurden, zeigten bei der gaschromatographischen Trennung des Rückstandes nach der Girard-T-Trennung nur einen recht kleinen, aber noch über der Nachweisgrenze gelegenen Peak mit der gleichen relativen Retentionszeit wie 11-Oxoätiöcholanolon. Wurde die Reduktionszeit oder die Konzentration an Borhydrid verdoppelt, so verschwand dieser Peak. Von praktischer Bedeutung scheint der offenbar sehr geringe, nicht reduzierte Anteil der 11-Oxo-Gruppe nicht zu sein: 1. Eine Stichprobe von 10 Sammelurinen, deren Gehalt an 17-OHCS an der oberen Grenze unseres Normalkollektivs lag, wurde zusätzlich unter Verwendung der doppelten Borhydridkonzentration analysiert. Die Differenz der arithmetischen Mittel der unterschiedlich aufgearbeiteten Proben betrug 2% und war statistisch nicht signifikant (Signed-Rank-Test nach WILCOXON). 2. Auch die Tatsache, daß die Wiederauffindungsraten von THE und THF im Urin (s. Tab. 2) sich im Rahmen der durch Zufallsfehler bedingten Vertrauensgrenzen nicht unterscheiden, spricht dafür, daß die Reduktionsbedingung der angegebenen Methode ausreichend ist.

Die 17-Oxo-Gruppen wurden vollständig reduziert. Die entstandenen 17-Hydroxy-Gruppen wurden durch Natriummetaperjodat unter den angegebenen Bedingungen nicht wieder oxydiert. 10 Urinproben wurden teils mit 100 μ g Ätiöcholanolon, teils mit 100 μ g 11 β -Hydroxyätiöcholanolon aufgestockt. In den nicht aufgestockten und den aufgestockten Proben wurden gleich viel 17-OHCS gemessen.

Oxydation

Hinsichtlich der Reaktionsbedingungen bei der Natriummetaperjodatoxydation stimmten unsere Ergebnisse mit den in der Literatur (2, 4, 9) mitgeteilten überein.

Wahl des organischen Lösungsmittels zum Ausschütteln der gebildeten 17-Oxosteroide

Äther hat den Vorteil, daß beim Ausschütteln von Urin keine Emulsionen auftreten. Zusätzlich läßt sich die zu verworfende Unterphase in einem großen Spitzenreagenzglas gut absaugen. Der Verteilungskoeffizient der $C_{19}O_3$ -17-Oxosteroide ist jedoch bei anderen Lösungsmitteln günstiger als bei Äther. So wurden nach Einstellen des Verteilungsgleichgewichts zwischen gleich großen Volumina wäßriger und organischer Phase 99–100% von 11 β -Hydroxyätiöcholanolon in der Dichlormethanphase und nur 90% in der Ätherphase gefunden.

Zuverlässigkeitskriterien

Präzision in der Serie und von Tag zu Tag

Aus dem frisch gesammelten Urin mehrerer klinisch gesunder, medikamentfreier Individuen wurden nach gründlichem Durchmischen 200 Proben von etwa 25 ml in kleine Kautexflaschen abgefüllt und in der Tiefkühltruhe bei –18° eingefroren. Mit jeder Analysenserie wurde zunächst eine Doppelbestimmung und später nur noch eine Einfachbestimmung durchgeführt. Das Ergebnis der Berechnung der Präzision in der Serie aus 24 Doppelbestimmungen und der Präzision von Tag zu Tag gibt die Tabelle 1 wieder.

Tab. 1
Präzision der Methode

		Präzision in der Serie	Präzision von Tag zu Tag
arithm. Mittel	$\bar{x}$	12,5 mg/l 17-OHCS	12,4 mg/l 17-OHCS
Anzahl	n	24 Doppelbestimmungen	34 Einzelbestimmungen
Standardabweichung	s	0,28	0,73
Variationskoeffizient	v	2,3%	5,9%

Nachweisgrenze

Aus der Standardabweichung der Leerwertextinktionen (E_{TRL}) an 24 verschiedenen Tagen wurde die Nachweisgrenze berechnet (12).

Nachweisgrenze

$$= \frac{19,9 \cdot 0,0064 \cdot 3}{0,250}$$

$$= 1,53 \text{ mg/l 17-OHCS als THE-Äquivalente}$$

0,0064: Standardabweichung der Leerwertextinktionen bei $n = 24$ und $\bar{x} = 0,071$

0,250: Extinktion des DHEA-Gebrauchsstandards

19,9: Ableitung dieses Faktors siehe unter Methodenbeschreibung

Wiederauffindungsraten

100 und 200 μg THE, 200 μg THF, 100 und 200 μg allo-THF und 116 μg Pregnantriol (entsprechend 100 μg Ätiocholanolon) wurden jeweils zu 10 ml eines Poolurins in 100 μl Äthanol hinzugegeben. Aus Tabelle 2 sind die wiedergefundenen Mengen in Prozent der eingesetzten ersichtlich. Die Berechnung von THE und THF erfolgt nach der Angabe bei der Methodenbeschreibung. Im Falle von allo-THF wurden die Zimmeräquivalente von 11 β -Hydroxyandrosteron berücksichtigt, die bei der benutzten Farbreaktion um 11,4% niedriger lagen als für 11 β -Hydroxyätiocholanolon. Zur Bestimmung der Wiederauffindungsrate von Pregnantriol wurde an Stelle des DHEA-Gebrauchsstandards eine alkoholische Lösung von Ätiocholanolon, 50 μg /ml, benutzt.

Tab. 2

Wiederauffindungsraten von THE, THF, allo-THF und Pregnantriol in Prozent der eingesetzten Mengen. Angegeben ist jeweils die Menge, die 10 ml Urin zugesetzt wurde. $\Delta\bar{x}$ ist der 95% Vertrauensbereich des arithmetischen Mittels

	100 μg THE	200 μg THE	200 μg THF
$\bar{x}$	86,8	84,8	84,7
$\Delta\bar{x}$	$\pm 5,4$	$\pm 3,0$	$\pm 4,2$
n	11	10	8

	100 μg allo-THF	200 μg allo-THF	116 μg Pregnantriol
$\bar{x}$	85,1	87,5	82,6
$\Delta\bar{x}$		$\pm 6,7$	$\pm 1,6$
n	4	8	8

Spezifität

Alle Substanzen, die keine Metabolite des Cortisols sind und einen Beitrag zur Farbreaktion des neutralen Harnextraktes liefern, schränken die Spezifität der Methode ein. Sie können formal unterteilt werden in Chromogene, die nichts mit dem Steroidstoffwechsel zu tun haben, und in Steroide mit Oxogruppen, die nicht vom Cortisolstoffwechsel stammen. Falls die in der Einleitung zusammengefaßten und an anderer Stelle (9) ausführlich begründeten Voraussetzungen hinsichtlich der Reaktionsabfolge Borhydridreduktion — Perjodat oxydation zutreffen, sollten sämtliche Cortisolmetabolite der 5 β -Pregnanreihe in 11 β -Hydroxyätiocholanolon, die der 5 α -Pregnanreihe in 11 β -Hydroxyandrosteron überführt werden. Zur Überprüfung dieser Annahme wird der neutrale Harnextrakt von 10 verschiedenen Normalpersonen sowie der neutrale Harnextrakt eines gepoolten Urins mit und ohne Aufstockzusätze von THE, THF, allo-THF und Pregnantriol hergestellt. Anschließend wird eine Girard-T-Trennung durchgeführt, da hierbei nur Substanzen entfernt werden, die keinen Beitrag zur Zimmermann-Reaktion liefern, aber bei der dünn-schichtchromatographischen und gaschromatographischen Auftrennung der zu erwartenden Steroide stören.

Die dünn-schichtchromatographische Auftrennung des Rückstandes nach der Girard-T-Trennung zeigte bei den einzelnen Normalurinen und dem Poolurin jeweils drei Flecke, die in ihrem Verhalten mit 11 β -Hydroxyätiocholanolon, 11 β -Hydroxyandrosteron und Ätiocholanolon übereinstimmten. Sie hatten in den benutzten Systemen übereinstimmende R_F -Werte mit den Referenzsubstanzen, waren zimmemannpositiv und zeigten die charakteristische Fluoreszenz dieser Substanzen nach Reaktion mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz. In der Region der C_{19}O_3 -17-Oxosteroide konnte das Vorkommen von 11-Oxoätiocholanolon und 11-Oxoandrosteron, in der Region der C_{19}O_2 -17-Oxosteroide das Vorkommen von Androsteron, Epiandrosteron und Dehydroepiandrosteron ausgeschlossen werden. Bei den mit THE und THF aufgestockten Urinen nahm der dem 11 β -Hydroxyätiocholanolon entsprechende Fleck an Größe und Intensität zu, analog führte allo-THF zu 11 β -Hydroxyandrosteron und Pregnantriol zu Ätiocholanolon.

Die Eigenschaften des benutzten gaschromatographischen Systems und die relativen Retentionszeiten der C_{19}O_2 -17-Oxosteroide und der C_{19}O_3 -17-Oxosteroide sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Das Ergebnis der gaschromatographischen Auftrennung des Poolurins (Rückstand nach Girard-T-Trennung) mit und ohne Zusätze von THE, THF, allo-THF und Pregnantriol zeigen die Abbildungen 1a–f.

Tab. 3

Relative Retentionszeiten der freien C_{19}O_2 - und C_{19}O_3 -17-Oxosteroide bei den gaschromatographischen Bedingungen: Glassäule 180 cm Länge, 2 mm innerer Durchmesser, Träger Aeropak 30, 100/120 mesh, beladen mit 1% OV-17, Arbeitstemperatur 255° isotherm, Detektor und Injektor 315°, Trägergas Stickstoff, 20 ml/Min., Wasserstoff 20 ml/Min., synthetische Luft 300 ml/Min., Gesamtretentionszeit von Cholesterin 14 Min. 35 Sek.

Ätiocholanolon	0,35
Androsteron	0,38
Epiandrosteron	0,385
Dehydroepiandrosteron	0,39
11-Oxoätiocholanolon	0,48
11-Oxoandrosteron	0,55
11 β -Hydroxyätiocholanolon	0,65
11 β -Hydroxyandrosteron	0,73
Cholesterin	1,00

Das Chromatogramm des Poolurins zeigt drei Peaks, die in ihren relativen Retentionszeiten mit Ätiocholanolon, 11 β -Hydroxyätiocholanolon und 11 β -Hydroxyandrosteron übereinstimmen. Unter Berücksichtigung der dünn-schichtchromatographischen Ergebnisse kann es als gesichert gelten, daß es sich tatsächlich um diese Substanzen handelt. Zumischen von THE und THF führte zu 11 β -Hydroxyätiocholanolon, allo-THF zu 11 β -Hydroxyandrosteron und Pregnantriol zu Ätiocholanolon. Auch die übrigen analysierten Normalurine zeigten die gleichen Peaks, wobei erwartungsgemäß 11 β -Hydroxyätiocholanolon immer die Hauptkomponente darstellte.

Es wurden keine Aufstockversuche mit Cortolen und Cortolonen durchgeführt, da THE, THF und allo-THF nur dann in 11 β -Hydroxyätiocholanolon bzw. 11 β -Hydroxyandrosteron überführt werden, wenn sie zuvor

zu den entsprechenden Cortolen reduziert werden. Es konnte somit gezeigt werden, daß bei der beschriebenen Methode die Cortisolmetabolite der 5β -Pregnanreihe in 11β -Hydroxyätiolanolon, die der 5α -Pregnanreihe in 11β -Hydroxyandrosteron überführt werden. Die Spezifität der Methode wird eingeschränkt durch Metabolite des 17α -Hydroxyprogesterons (im wesentlichen Pregnantriol) und des 11 -Desoxycortisols, die zu Ätiolanolon führen. Der Anteil des Ätiolanolons an den Zimmermannchromogenen soll bei Normalpersonen etwa 15% betragen (9), was nach unseren Chromatogrammen glaubhaft erscheint. Bei pathologischen Zuständen (Adrenogenitales Syndrom) kann dieser Anteil wesentlich größer sein. Hier würde die chromatographische Auftrennung des neutralen Harnextraktes eine zusätzliche Information bringen. Die Spezifität ist andererseits noch durch Metabolite des normalerweise nicht sezernierten 21 -Desoxycortisols eingeschränkt, die zu denselben $C_{19}O_3$ - 17 -Oxosteroide führen wie die Cortisolmetabolite.

Die Frage, ob die Methoden, die Natriummetaperjodat verwenden, im Vergleich zur Methode von APPLEBY, GIBSON, NORYMBERSKI und STUBBS (1) der klinischen Routinediagnostik einen Informationszuwachs bringen, möchten wir trotz ihrer nachweislich höheren Spezifität offen lassen. Immerhin bietet Natriummetaperjodat den Vorteil der guten Wasserlöslichkeit. Außerdem sind wesentliche Unterschiede zwischen den p. a.-Produkten der verschiedenen Hersteller, wie dies für Bismutat der Fall ist, bisher nicht bekannt geworden. Soll der neutrale Harnextrakt zur getrennten Bestimmung von Ätiolanolon, 11β -Hydroxyätiolanolon und 11β -Hydroxyandrosteron weiter aufgearbeitet werden, empfiehlt sich die Verwendung von Natriummetaperjodat.

Normalwerte

52 Männer im Alter von 18 bis 66 Jahren und 47 Frauen im Alter von 18 bis 62 Jahren, die klinisch gesund waren und keinerlei Medikamente zu sich nahmen, sammelten gegen eine Belohnung einen 24-Stdn.-Urin. Auf ein Konservierungsmittel wurde verzichtet, da noch weitere Bestandteile bestimmt werden sollten. Während des Sammelns wurde der Urin im Kühlschrank oder in einer Kühltasche aufbewahrt. Bei der Gewinnung der Normalwerte wurde mit jeder Analysenserie noch eine Doppelbestimmung der Proben des Urinpools durchgeführt, der bereits bei der Ermittlung der Präzision der Methode verwandt wurde. Zeitabhängige systematische Fehler (Trends) traten nicht auf, die Präzision entsprach der für die Methode ermittelten.

Abb. 1a—f

Die gaschromatographischen Bedingungen sind in Tab. 3 wiedergegeben

a) Testchromatogramm: Reihenfolge der Steroide mit zunehmenden Retentionszeiten: Ätiolanolon, Androsteron, 11 -Oxoätiolanolon, 11 -Oxoandrosteron, 11β -Hydroxyätiolanolon, 11β -Hydroxyandrosteron, Cholesterin. Es wurden etwa $0,5 \mu\text{g}$ von jedem 17 -Oxosteroid und $1,5 \mu\text{g}$ Cholesterin in $1 \mu\text{l}$ injiziert

b)—f) Chromatogramme des Poolurins b) ohne Aufstockung und mit Zusatz von c) THF, d) THE, e) allo-THF, f) Pregnantriol. Die Chromatographie erfolgte nach der Girard-Trennung; Cholesterin diente als interner Standard.

Die Abbildung 2 gibt die Ausscheidung der 17-OHCS in mg THE-Äquivalenten je 24 Stdn. der einzelnen

Abb. 2

Ausscheidung der 17-OHCS in mg/24 Stdn. als THE-Äquivalente
a) 52 klinisch gesunde Männer
b) 47 klinisch gesunde Frauen

Tab. 4

Ausgeschiedene Menge an 17-OHCS in 24 Stdn. bei zwei Normalkollektiven. Angabe in mg THE-Äquivalenten, in () in 11β -Hydroxy-ätiocolanolon-Äquivalenten

	Männer, n = 52	Frauen, n = 47
Median	19,4 (16,3)	13,9 (11,7)
95-Perzentilgrenzen	10,8 u. 25,4 (9,1 u. 21,3)	7,8 u. 19,4 (6,6 u. 16,3)

Individuen beider Kollektive in Abhängigkeit des Alters wieder. Statistisch läßt sich der Geschlechtsunterschied sichern ($p = 0,01$). Um eine Altersabhängigkeit nachweisen zu können, hätte der Umfang der Stichproben wesentlich größer sein müssen. Die Kollektive sollen durch den Median und die 95-Perzentilgrenzen charakterisiert werden (Tab. 4), da bei dem geringen Umfang der Stichproben die Entscheidung, welches theoretische Modell der empirischen Verteilung zugrunde gelegt werden soll, problematisch ist. Für die Beurteilungsgrundlage in der Klinik ist die Kenntnis des Bereichs, innerhalb dessen 95% der Individuen beider Normalkollektive liegen, ausreichend. In Tabelle 2 sind neben den THE-Äquivalenten zum besseren Vergleich mit Angaben in der Literatur noch die 11β -Hydroxy-ätiocolanolonäquivalente aufgeführt.

Die ermittelten Normalwerte liegen im Bereich der von anderen Autoren (3–5, 7, 9) angegebenen. Die im einzelnen vorhandenen Unterschiede dürften einerseits auf sehr kleine, uneinheitliche Kollektive, andererseits aber auch auf die Unterschiede der einzelnen Modifikationen innerhalb der Methoden, die Natriummetaperjodat verwenden, zurückzuführen sein.

Fraulein KATRIN LEMPART sei an dieser Stelle für ihre gewissenhafte Mitarbeit herzlich gedankt.

Herrn Professor Dr. H. BREUER, Bonn, danken wir für die liebenswürdige Durchsicht des Manuskriptes.

Literatur

- APPLEBY, J. I., G. GIBSON, J. K. NORYMBERSKI und R. D. STUBBS, *Biochem. J.* 60, 453 (1955). — 2. WILSON, H. und M. B. LIPSETT, *Analytic. Biochem.* 5, 217 (1963). — 3. METCALF, M. G., *J. Endocrinology* 26, 415 (1963). — 4. RUTHERFORD, E. R. und D. H. NELSON, *J. Clin. Endocr., Springfield* 23, 533 (1963). — 5. JAMES, V. H. T. und E. CAIE, *J. Clin. Endocr., Springfield* 24, 180 (1964). — 6. METCALF, M. G., *Clin. Chem. (New York)* 12, 258 (1966). — 7. WHIGHAM, W. R., *Clin. Chem. (New York)* 14, 675 (1968). — 8. GRAY, C. H., D. N. BARON, R. V. BROOKS und V. H. T. JAMES, *Lancet, London*, I/1969, 124. — 9. FEW, J. D., *J. Endocrinology* 22, 31 (1960). — 10. LISBOA, B. P., *J. Chromatog.* 13, 391 (1964). — 11. PINCUS, G. und W. H. PEARLMAN, *Endocrinology* 29, 413 (1941). — 12. KAISER, H., *Z. analyt. Chem.* 209, 1 (1965).

PD. Dr. Dr. D. Stamm
Abteilung für Klinische Chemie
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
8 München 23, Kraepelinstr. 10