

MASTER

De identificatie van steroid-hormonen met behulp van capillaire gaschromatografie

Snijders, M.W.M.

Award date:
1969

[Link to publication](#)

Disclaimer

This document contains a student thesis (bachelor's or master's), as authored by a student at Eindhoven University of Technology. Student theses are made available in the TU/e repository upon obtaining the required degree. The grade received is not published on the document as presented in the repository. The required complexity or quality of research of student theses may vary by program, and the required minimum study period may vary in duration.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Technische Hogeschool Eindhoven
Afdeling der Scheikundige Technologie
Laboratorium voor Instrumentele Analyse

DE IDENTIFICATIE VAN STEROID-HORMONEN MET

BEHULP VAN CAPILLAIRE GASCHROMATOGRAPHIE

M.W.M.Snijders

10 sept 1969

Afstudeerhoogleraar: prof.dr.ir.A.I.M.Keulemans

Afstudeercoach: ir.H.Groenendijk

Onderwerp : De identificatie van steroidhormonen met behulp van capillaire gaschromatografie.

Hoogleraar : prof.dr.ir.A.I.M.Keulemans.

Laboratorium : Instrumentele Analyse.

Datum : 10 sept 1969

Samenvatting : Steroiden zijn van steraan afgeleide verbindingen. Van de circa 10.000 bekende steroiden komen er ongeveer 200 voor in het menselijk lichaam, waar zij als hormonen een belangrijke rol spelen bij de regeling van de diverse functies in het organisme. Het steroidmengsel in de lichaamsvloeistoffen is zeer verdund en complex. De voor de analyse hiervan vereiste hoge resolutie en lage detectiegrens worden in het bijzonder bereikt door de gaschromatografie, en wel vooral bij het gebruik van capillaire kolommen.

Twee grote problemen bij de capillaire gaschromatografie zijn op bevredigende wijze opgelost, enerzijds door de toepassing van een nieuwe vaste stof-injectiemethode voor de splitloze intröductie van de vereiste submicrogram hoeveelheden, anderzijds door de ontwikkeling van speciale coatprocedures voor het prepareren van hoog scheidende kolommen.

Met behulp van dergelijke kolommen, gecoat met de stationaire fases QF-1 en SE-30, zijn van een aantal klinisch chemisch belangrijke steroidhormonen de retentie-indices bepaald, met gebruikmaking van het hiervoor geschreven ALGOL-60 computerprogramma "RETENTION DATA".

Een ALGOL-60 programma "IDENTIFICATION" is ontwikkeld voor de automatische identificatie van de componenten in een mengsel op grond van hun retentie-indices op één of meerdere stationaire fases en/of temperaturen.

De invloed van de kolomtemperatuur op de retentie-grootheden is nagegaan. De relatieve retentie blijkt exponentieel te variëren met de reciproke absolute temperatuur; de retentie-index varieert aanzienlijk en nagenoeg lineair met de temperatuur, evenals het steroid number, dat slechts voor de steroidkernen vrijwel temperatuuronafhankelijk is.

Het is voorts vrijwel onmogelijk gebleken uit de structuur van een steroid zijn retentie-index te voorspellen voor een polaire fase, terwijl dit voor apolaire fases kan gebeuren met een onnauwkeurigheid van kleiner dan 1 %.

Tenslotte is een tabularium samengesteld van de relatieve retenties van steroiden en sterolen, zoals die voorkomen in de verzamelde steroid-literatuur.

Inhoudsopgave.

	<u>pag</u>
1. <u>INLEIDING.</u>	1
2. <u>DE CHEMIE VAN STEROIDEN.</u>	
2.1. Biosynthese	3
2.2. Chemie	3
2.3. Stereoisomerie	4
2.4. Nomenclatuur	5
3. <u>DE CAPILLAIRE GASCHROMATOGRAFIE VAN STEROIDEN.</u>	
3.1. Inleiding	6
3.2. Apparatuur	6
3.3. De modificatie van het injectiesysteem	6
3.4. Een simpele vaste stof-injectiemethode bij kwalitatief werk	7
3.5 Het prepareren van capillaire kolommen	8
3.5.1. De stationaire fase	
3.5.1.1. SE-30	
3.5.1.2. QF-1	
3.5.2. De wijze van coaten	
3.6. Vluchtige steroid-derivaten	9
3.7. Het meten van retentietijden	10
4. <u>DE IDENTIFICATIE OP GROND VAN RETENTIE-INDICES.</u>	
4.1. Inleiding	11
4.2. Het berekenen van retentie-indices	11
4.2.1. De methode Kovats	
4.2.2. De methode Groenendijk-van Kemenade	
4.3. Indices op QF-1	12
4.4. Het ALGOL-60 programma "IDENTIFICATION"	12
4.5. De automatische analyse van een testmonster	13
5. <u>TEMPERATUURSINVLOEDEN OP RETENTIE-GROOTHEDEN.</u>	
5.1. Inleiding	15
5.2. De relatieve retentie	15
5.3. De retentie-index	16
5.4. Het steroid number	16
5.5. Conclusie	17
6. <u>HET VERBAND TUSSEN STRUKTUUR EN RETENTIE.</u>	
6.1. Inleiding	18
6.2. Voorbeelden	18
6.3. Opmerkingen	19

LITERATUURVERWIJZINGEN.

BIJLAGEN I t/m XI.

1. INLEIDING.

In principe bestaan er vele instrumentele analyse-methoden, waarmee men voldoende nauwkeurig een onbekend mengsel kan analyseren en / of een onbekende stof identificeren.

Bij de steroid-analyse in de klinische chemie echter worden verscheidene methoden al snel ontoereikend, daar men immers in de lichaamsvloeistoffen circa 200 verschillende steroid-hormonen kan aantreffen, in hoeveelheden variërend van 1 ng tot 1 mg stof per dag. Slechts van de gaschromatografie is de detectiegrens dermate laag dat zelfs op nanogramschaal componenten uit een mengsel eenduidig aantoonbaar zijn.

Meestal heeft men dan echter een zo geringe hoeveelheid zuivere stof verkregen, dat een verdere identificatie met de gebruikelijke spectroscopische methoden niet meer uitvoerbaar is, daar deze toch minstens 0,1 milligram zuivere stof vereisen.

Ondanks het feit dat met een snel scannende massaspectrometer, gekoppeld aan een capillaire kolom, de laatste jaren interessante resultaten zijn geboekt, is deze koppeling economisch toch niet zo zeer verantwoord, dat zij algemeen in de praktijk uitvoerbaar zal zijn. De identificatie van een stof aan de hand van retentie-waarden lijkt zinvoller.

Hierdoor worden hoge eisen gesteld aan het scheidend vermogen van de gebruikte kolommen; immers hoe groter het oplossend vermogen, des te zekerder wordt de identificatie. Dit is dus wel een duidelijke hint in de richting van capillaire kolommen. Maar zelfs op de tegenwoordige, zeer efficiënte, non-selectieve capillaire kolommen worden verschillende epimere steroid-hormonen tegelijkertijd geëluëerd. Men zal dan slechts een volledige identificatie kunnen bereiken door gelijktijdige analyse op meerdere stationaire fases, bijvoorbeeld op een non-selectieve zowel als op een selectieve fase, in dit onderzoek resp. SE-30 en QF-1.

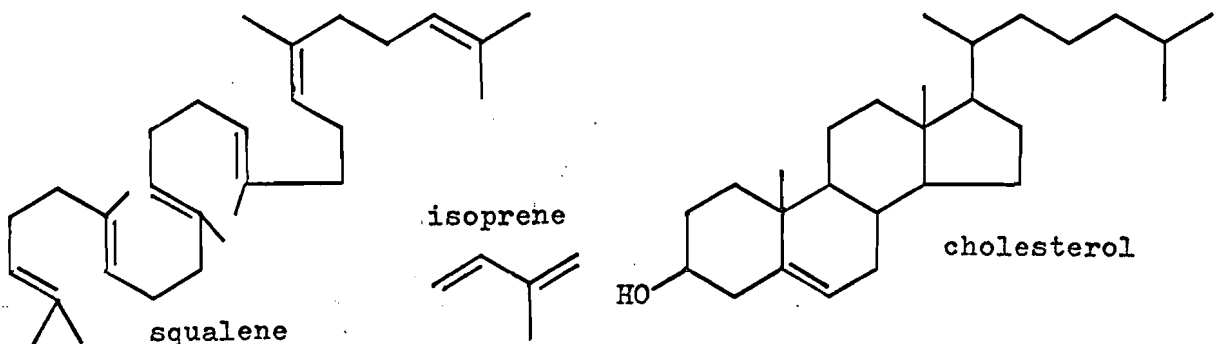
Daartoe moeten eerst nauwkeurig isotherme retentie-indices van vele klinisch chemisch belangrijke steroid-hormonen worden bepaald, welke indices dan met de namen van de desbetreffende stoffen worden opgeslagen in het geheugen van een computer. Een ALGOL-60 computerprogramma is verder ontwikkeld, dat uit de bruto-retentietijden van

de componenten uit een natuurlijk analyse-monster de retentie-indices berekent, en na vergelijking met de indices in het geheugen, de namen van de geïdentificeerde stoffen in het mengsel afdruckt. Voorts is nagegaan in hoeverre de temperatuur-afhankelijkheid van de retentie-waarden deze identificatie-methode kan beïnvloeden, en eventueel karakteristiek kan zijn voor de beschouwde stof. Ook wordt het interessant te onderzoeken of retentie-grootheden voorspelbaar zijn uit de grootte en de structuur van de steroïden.

2. DE CHEMIE VAN STEROIDEN.

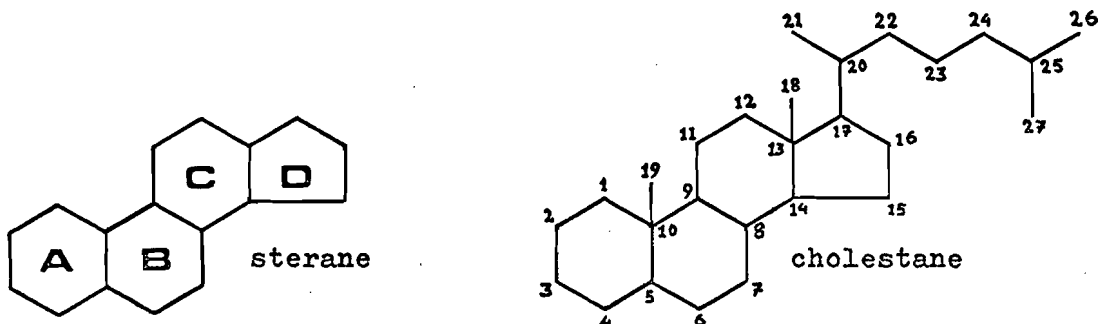
2.1. Biosynthese.

Bij de biosynthese van steroiden wordt allereerst, uitgaande van acetaten, het sterk onverzadigde squalene gevormd, dat men opgebouwd denkt uit isoprene-eenheden. Door ringsluitingen en oxidatie gaat het olefinische squalene over in een C-30-sterol, lanosterol genaamd, dat door verspringen van dubbele bindingen en door verlies van drie angulaire methyl-groepen, cholesterol oplevert. Cholesterol nu staat aan het begin van de gehele steroid-metabolisme in het menselijk organisme.



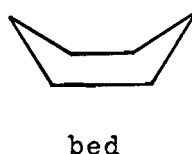
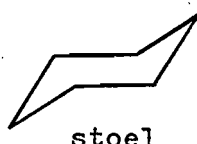
2.2. Chemie.

Chemisch gezien kan men de steroiden afgeleid denken van perhydrocyclopentano-phenanthrene, een 4-ringen-structuur, waarvoor men ook vaak de naam sterane tegenkomt. De ringen worden aangeduid met de letters A, B, C en D; de C-atomen worden genummerd zoals aangegeven.



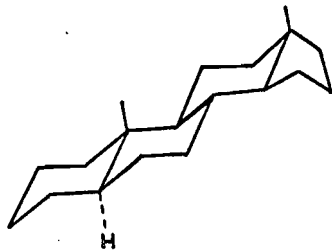
Tenzij het tot twee ringen behoort, bevat elk koolstofatoom twee H-atomen, die gewoonlijk niet in de structuurformules worden aan-

gegeven, wanneer men niet uitdrukkelijk is geïnteresseerd in de configuratie. Aan de 10- en 13-plaats kunnen methyl-groepen aangehecht zijn, aan het C-17-atoom is vaak een langere koolwaterstofketen bevestigd. De zesringen komen meestal voor in de thermodynamisch stabielere stoel-vorm.

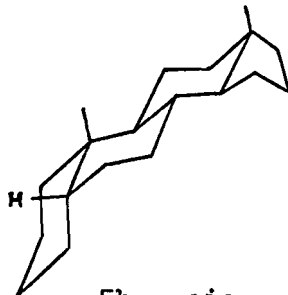


2.3. Stereoisomerie.

Stereoisomerie kan voorkomen als gevolg van de ruimtelijke ordening van de ringen onderling. De twee meest voorkomende structuren van natuurlijke steroiden verschillen slechts door de wijze van koppeling van de A- en B-ring op de 5-plaats.



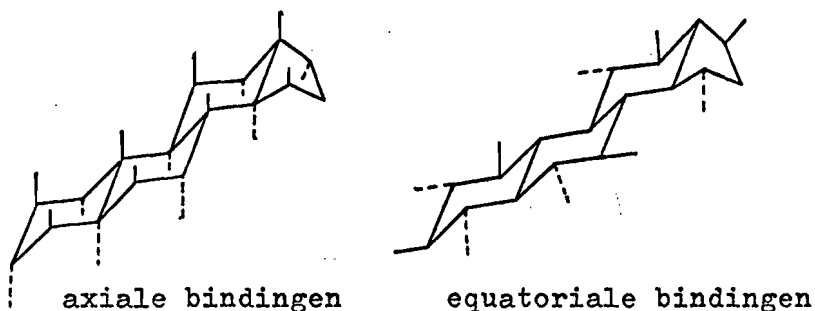
5a - trans



5b - cis

Het eerste geval geeft de 5a- of trans-configuratie weer, het andere de 5b- of cis-configuratie. Alle andere ringen zijn altijd trans met elkaar verbonden.

Stereoisomerie wordt ook veroorzaakt door de orientatie van functionele groepen aan het skelet, die zich onder (alfa) of boven (beta) het vlak van de ring kunnen bevinden. De a-bindingen geeft men aan met een stippellijntje; de b-bindingen met eeg gewoon streepje; de methyl-groepen aan C-10 en C-13 worden per definitie in de b-stand getekend. Eveneens kan men onderscheid maken tussen equatoriale en axiale bindingen, waarvan de eerste ongeveer in het vlak van de ring liggen, en de laatste min of meer loodrecht daarop.



2.4. Nomenclatuur.

Bij het benoemen van steroiden wordt in het vervolg uitsluitend de angelsaksische nomenclatuur aangehouden. Men gaat hierbij uit van enige fundamentele structuren, zoals:

- estrane: C-18-steroiden, bv estrogenen,
- androstane: C-19-steroiden, bv androgenen,
- pregnane: C-21-steroiden, bv progestagenen en corticosteroiden,
- cholestane: C-27-sterolen.

Allo-verbindingen verschillen van de typische in de natuur voorkomende steroiden door een andere orientatie van het 5-H-atoom: vergelijk allopregnanediol (5a) en pregnanediol (5b). Het voorvoegsel epi- wordt gebruikt bij configuratie-afwijkingen op alle andere plaatsen: epiandrosterone (3bOH) en androsterone (3aOH). Het suffix -ane geeft aan dat de kern volledig verzadigd is; -ene duidt op één dubbele band, -diene op twee, etc. Wanneer zo'n dubbele binding ligt tussen twee opeenvolgend genummerde C-atomen, wordt de plaats aangegeven met het laagste C-atoom; in andere gevallen met de nummers van begin- en eind-atoom: estra-1,3,5(10)-trien-3-ol-17-one (estrone). Keto-functies worden aangegeven met het achtervoegsel -one, -dione, etc; alcoholen door -ol, -diol, -triol. Het voorvoegsel dehydro- duidt op een onverzadiging: dehydroandrosterone; terwijl dihydro- (tetrahydro-) de aanwezigheid van twee (vier) extra H-atomen betekent: dihydrocortisol. Het voorvoegsel nor- geeft aan waar een methyl-groep ontbreekt: 19-nortestosterone.

3. DE CAPILLAIRE GASCHROMATOGRAFIE VAN STEROIDEN.

3.1. Inleiding.

Het feit dat men na een publicatie van Chen en Lantz (1) in 1960 verder geen enkele literatuur aantreft over een zo voor de hand liggende zaak als de capillaire steroid-chromatografie, kan niet veroorzaakt zijn door een gebrek aan interesse. Veeleer lijkt dit te komen doordat men geen antwoord heeft gevonden op de vragen die rijzen bij de ontwikkeling van adequate injectie-methodes voor vaste stoffen. Daarnaast speelt ook de wijze waarop een capillaire kolom gecoat wordt een overheersende rol. Op deze twee zaken zal dan ook wat dieper worden ingegaan.

3.2. Apparatuur.

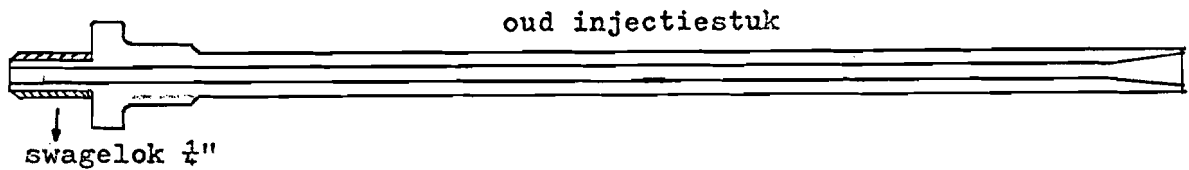
Alle chromatogrammen zijn opgenomen met capillaire kolommen in een dual-column-chromatograaf, de ene kolom gecoat met de non-selectieve stationaire fase SE-30, de andere met de selectieve fase QF-1. De gebruikte apparatuur bestaat uit:

- Een F & M 5750 Research Chromatograph van Hewlett-Packard, samengesteld uit:
 - een thermostaat-oven met injectieblok en vlamdetectors,
 - een temperatuurregel- en programmeereenheid,
 - een versterker-unit voor de vlamionisatie-detectors.
- Een Becker gasstroomregelaar (type 5125) voor de toevoer van het draaggas (stikstof), en waterstof en lucht voor de vlam, alles via zuiveringsfilters en constant-flow regelventielen.
- Een Leeds & Northrup "Speedomax" H Azar 5mV recorder, later vervangen door een Hewlett-Packard Moseley 7100BM two-channel 2mV recorder.
- Een chromel-alumel thermokoppel, waarmee met behulp van een digitale voltmeter de kolomtemperatuur tot op $\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ nauwkeurig afleesbaar is.

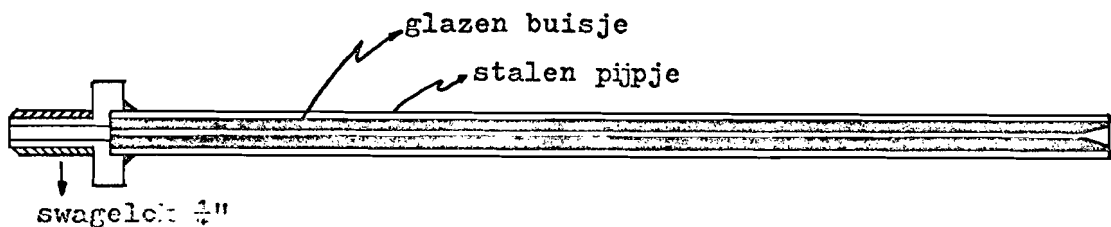
3.3. De modificatie van het injectiesysteem.

Het standaard injectieblok van de F & M 5750 chromatograaf is uitgevoerd in roestvrij staal en ontworpen voor de toepassing van gepakte kolommen. De dode ruimte in het injectiestuk, dat voor deze

kolommen goed is gedimensioneerd, voldoet echter niet bij het gebruik van capillaire kolommen. Door de veel geringere volumesnelheid door een $\frac{1}{4}$ mm capillair wordt de verblijftijd in het injectiestuk te



groot, hetgeen resulteert in een vergroting van de injectiebreedte, alsmede in een sterk toegenomen degradatie van de componenten aan de stalen wand. Dit alles kan voldoende worden tegengegaan door het injectiestuk te veranderen, zoals hier getekend:



In de plaats van het oude injectiebuisje is een stalen pijpje gekomen (uitwendig 6, inwendig 4 mm), waarin een glazen buisje is ingepast (uitw -4, inw 0,65 mm), dat aan de voorzijde conisch uitgevijld is. Op het stalen pijpje is een swagelok $\frac{1}{8}$ " koppeling gesoldeerd, waaraan de capillaire kolom zodanig wordt vastgeschroefd, dat hij nog circa 10 mm in het glazen buisje is geschoven.

3.4. Een simpele vaste stof-injectiemethode bij kwalitatief werk.

Het introduceren van steroid-oplossingen op een capillaire kolom geeft vele problemen. Het toepassen van de gebruikelijke splitter veroorzaakt, door de brede range van kookpunten in het mengsel, ongetwijfeld fractionering en vereist een veel grotere hoeveelheid monster dan voor de eigenlijke analyse noodzakelijk is. Direkte injectie lijkt hier dus een belangrijke winst. Echter hebben we in de klinische chemie te doen met sterk verdunde complexe mengsels van steroiden in een veelal zeer grote overmaat oplosmiddel, die de kolom mogelijk zal overladen en daardoor de gemeten retentiewaarden dubieus maakt. De bij het onderzoek toegepaste injectiemethode berust op de selectieve verdamping van dat oplosmiddel. Hiertoe wordt uit een ca 0,2 %-ige steroid-oplossing slechts de naald van

een Hamilton 10 μ l injectiespuit gevuld. De volle naald brengt men daarne enige seconden in een oventje, waarvan de temperatuur circa 120°C bedraagt. Terwijl het oplosmiddel nu verdampt blijven de veel minder vluchtige steroïden in de naaldpunt achter; bij binnenbrengen in het 280° warme injectieblok van de gaschromatograaf verdampen zij vrijwel momentaan en bereiken direkt de kolom, zodat de injectiebreedte voldoende gering blijft (ongeveer 0,4 sec).

3.5. Het prepareren van capillaire kolommen.

3.5.1. De stationaire fase. Waar men voor de steroïd-analyse de beschikking heeft over circa 20 verschillende stationaire fases, worden er toch maar enkele algemeen toegepast, daar het wenselijk is het aantal gebruikte fases, zoals trouwens ook het aantal gebruikte temperaturen, zo gering mogelijk te houden. Daarom hebben wij ons ook beperkt tot de twee meest gebruikte stationaire fases, te weten SE-30 en QF-1, waarvan in de literatuur de meeste retentiegegevens beschikbaar zijn.

3.5.1.1. SE-30. Dit is een van de beste non-selectieve fases. Het is een dimethylsiloxane-polymeer, bruikbaar tot 300°. Bij de analyse op een dergelijke apolaire fase komen de verschillen in molecuulgrootte en molecuulbouw goed tot uiting.

3.5.1.2. QF-1. Wil men een mengsel analyseren op grond van functionele groepen en orientaties in het molecuul, dan maakt men bij voorkeur gebruik van een polaire, selectieve, fase, zoals QF-1. Dit is een fluoroalkylsiloxane-polymeer, waarvan de thermische stabiliteit helaas vrij gering is: boven 250° is de fase niet langdurig houdbaar.

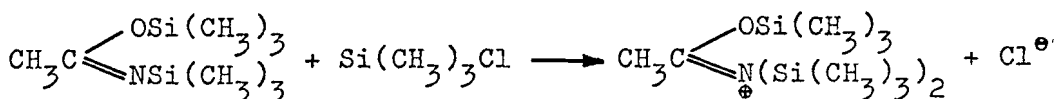
3.5.2. De wijze van coaten. Capillairen met een hoog scheidend vermogen worden veelal bereid door roestvrij stalen kolommen met een lengte van ca 20 m en een inwendige diameter van $\frac{1}{4}$ mm te voorzien van een inwendige dunne film van de stationaire fase. Hiertoe wordt de kolom eerst gezuiverd door doorspoelen met tri, aceton, benzeen en hexaan, telkens ca 10 ml; daarna met het oplosmiddel waarmee de coatoplossing is geprepareerd. Dan wordt 2 ml van een 20 %-ige coat-

oplossing van de stationaire fase door de kolom geleid met een snelheid van 10 cm per seconde. De aldus verkregen film kan men nog homogeniseren door nogmaals een plugje van 0,2 ml van dezelfde oplossing door de kolom te persen. Hierna worden de restanten oplosmiddel verwijderd door onder dezelfde lage draaggasstroom de temperatuur te verhogen tot 100° en deze temperatuur een uur lang te handhaven. Dan sluit men het draaggas af en verwarmt gedurende vijf uur op 20° onder de ontledingstemperatuur van de fase, waarna de temperatuur verlaagd wordt tot 10° boven de werkteperatuur en hierop gehandhaafd blijft gedurende 24 uur, terwijl nu het draaggas weer toegelaten wordt. De kolom vertoont nu een snel afnemende "bleeding". Wanneer de nulstroom door de detector een aanvaardbaar en constant niveau heeft gekregen, kan men de kolom gaan testen met een standaardserie n-alkanen, bv C₂₄, C₂₈ en C₃₂. Is het scheidend vermogen te laag, dwz blijft men onder de 2000 schotels per meter, en / of "tailen" de pieken te sterk, dan herhaalt men de gehele coatings-procedure, uitgezonderd het reinigen. In het andere geval is de kolom geschikt voor gebruik.

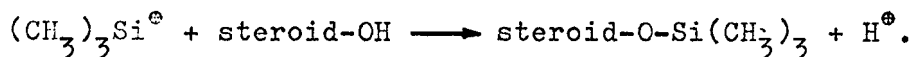
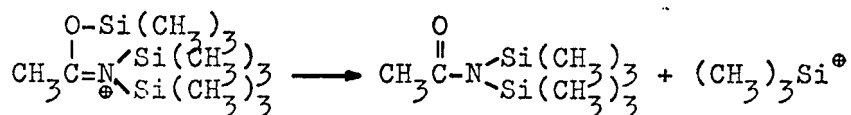
In de praktijk blijkt het coaten met SE-30 in iso-oktaan redelijk gemakkelijk te verlopen, terwijl dat met QF-1 in aceton een vrij moeilijke zaak is, waar men pas na herhaald overcoaten een acceptabele kolom verkrijgt.

3.6. Vluchtige steroid-derivaten.

Daar vrije steroiden pas dicht onder hun ontledingstemperatuur voldoende vluchtig zijn voor de gaschromatografie, is men wel haast genoodzaakt ze om te zetten in vluchtiger derivaten. Zoals in een scriptie van Kneepkens (2) tot uitdrukking komt, is het vaak voldoende de hydroxy-groepen in het molecuul te veretheren. Dit gebeurt meestal door bewerking met een mengsel van 10 % trimethylchlorosilane (TMCS) in N,O bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA). Waarschijnlijk katalyseert het TMCS de reactie door eerst met BSA een imonium-ion te vormen:



Hierna verloopt de reactie als volgt:



Deze vrij snelle reactie wordt meestal uitgevoerd in een langwerpig glazen buisje van geringe inwendige diameter, afgesloten met een Beckman serumkapje, en waarin zich de steroiden bevinden. De aldus gevormde trimethylsilyl- (TMS-)ethers zijn bij uitstek geschikt voor de gaschromatische analyse. Zij zijn thermisch stabiel, en wegens het ontbreken van waterstofbruggen veel vluchtiger dan de overeenkomstige vrije hydroxysteroiden. Echter veroorzaken sporen water momentane hydrolyse bij zowel reagentia als trimethylsilylethers.

3.7. Het meten van retentietijden.

Voor het bepalen van de retentietijden wordt gebruik gemaakt van elektronische apparatuur:

- een Infotronics CRS-43R 3-kanaals tape-recorder,
- een Infotronics CRS-40TSR play back system,
- een Infotronics CRS-11HB/41 digital readout system,
- een Addo-X digitale printer.

De op de recorder opgenomen chromatogrammen worden afgespeeld op het play-back system. Het hieraan gekoppelde readout system bepaalt per piek de retentietijd en het oppervlak, waarna de printer deze waarden, gegeven in arbitraire (infotronics-)eenheden, afdruckt.

4. DE IDENTIFICATIE OP GROND VAN RETENTIE-INDICES.

4.1. Inleiding.

Wanneer men stoffen wil identificeren op grond van de algemeen aanvaarde retentie-indices (waarop in 4.2. verder wordt ingegaan), dan zal men eerst van zoveel mogelijk steroïden deze indices moeten meten. Dit is gedaan door Edelbroek (3) op o.a. SE-30. Uit bijlage I blijkt al snel dat hierbij sommige pieken samenvallen, bv 11-ketoandrosterone en 11-ketoetiocholanolone. Een éénduidige identificatie is hier dus niet mogelijk. Daarom zijn van vele klinisch chemisch interessante steroïd-hormonen óók de retentie-indices bepaald op QF-1. Met deze beide verschillende kolommen lijkt een goede identificatie mogelijk. Mede ter vergelijking is uit de door Edelbroek verzamelde literatuur een tabularium samengesteld van relative retenties op QF-1.

4.2. Het berekenen van retentie-indices.

4.2.1. De methode Kovats. Bij het berekenen van de retentie-index volgens de methode van Kovats stuiten we op de onmogelijkheid de methaantijd (t_M) exact te meten, daar bij de gebruikte hoge temperaturen (ca 250°) ook het oplosmiddel vrijwel onvertraagd door de kolom gaat en niet van het methaan wordt gescheiden. De benadering van t_M met t_R van het begin van de oplosmiddelpiek, zoals gedaan door bv F.A. Vandenheuvel en S.A. Court (4), lijkt evenmin ideaal, daar deze tijd afhankelijk is van de geïnjecteerde hoeveelheid oplosmiddel. Voorts wordt volgens het concept van Kovats logaritmisch geïnterpoleerd tussen de nettotijden t'_R van twee opeenvolgende n-alkanen, wat bij de steroïd-analyse vaak niet mogelijk is door de complexiteit van het te analyseren mengsel, waardoor pieken geheel of gedeeltelijk kunnen samenvallen met de pieken van de standaarden.

4.2.2. De methode Groenendijk-van Kemenade. Deze methode maakt gebruik van het gegeven, dat het verband tussen $\log(\text{retentietijd})$ en het koolstofgetal, de "logplot", recht is. Waar Kovats (5) nu gebruik maakt van de methaantijd voor t_M en van verder twee opeenvolgende n-alkanen, wordt in deze con-

ceptie uitgegaan van drie equidistante n-alkanen, meestal C_{24} , C_{28} en C_{32} . Daarvoor geldt:

$$t'_{32}/t'_{28} = t'_{28}/t'_{24}, \text{ of:}$$

$$(t_{32} - t_M)/(t_{28} - t_M) = (t_{28} - t_M)/(t_{24} - t_M).$$

Hieruit kan men een t_M oplossen volgens:

$$t_M = \frac{t_{24} \cdot t_{32} - t_{28} \cdot t_{28}}{t_{24} + t_{32} - 2 \cdot t_{28}}.$$

De index van een steroid wordt dan bepaald door zijn netto-retentietijd t'_R logaritmisch te interpoleren tussen de nettotijden van de hoogste twee n-alkanen, in formule:

$$I = 100 \left(28 + 4 \cdot \frac{\log t'_R - \log t'_{28}}{\log t'_{32} - \log t'_{28}} \right).$$

Deze beide formules vormen de kern van de procedures EXTRA-POL en RETINDEX, waaruit het ALGOL60 procedure-programma RETENTION DATA (zie bijlage III) is ontwikkeld.

4.3. Indices op QF-1.

Om een aantal belangrijke steroid-hormonen te indiceren, zijn bij 224° op QF-1 negen series "identieke" chromatogrammen opgenomen, welke later zijn doorgerekend met het programma RETENTION DATA. Dit levert de nauwkeurige indices van zo'n 30 steroiden, welke men terugvindt in bijlage II. Het "actual program" voor een dergelijke bewerking luidt:

```
nmax := read;
for n := 1 step 1 until nmax do
begin cmax := read; NEW PAGE; COMMENT; NLCR; st := read; r := read;
  for c := 1 step 1 until cmax do
  begin EXTRAPOL; DATAPRINT; RETINDEX; PRINDEX end;
  NEW PAGE; COMMENT; VARALYSIS(I);
end;
```

Een voorbeeld van een chromatogram met uitgeprinte infotonics-retentie-eenheden en een voorbeeld van computer-input en -output treft men aan in bijlage IV.

4.4. Het ALGOL-60 programma "IDENTIFICATION".

Teneinde een computer de identificatie op grond van retentie-indices te laten verrichten, is uit het procedure-programma RETEN-

TION DATA een nieuw programma, "IDENTIFICATION", ontwikkeld. Om een zo groot mogelijke zekerheid te verkrijgen bij de toekenning van een naam aan een component, is het mogelijk de indices van verschillende stationaire fases, of bij verschillende temperaturen, in het geheugen op te slaan. Dit gebeurt door het real array PHASE (1 : pmax, 1 : kmax) te vullen, waar pmax het aantal fases is en kmax het aantal componenten.

Wanneer nu uit een te analyseren mengsel een retentie-index berekend is, dan gaat de procedure SEEK

```
procedure SEEK(I, p, tol); value I, p, tol; integer p; real I, tol;
begin for k := 1 step 1 until kmax do
    begin if I > (PHASE[p, k] - tol) ^ I < (PHASE[p, k] + tol)
        then begin MARK[p, k] := true; IDENTIFIE(k) end;
    end;
end SEEK;
```

na, of deze index binnen een zekere tolerantie "tol" gelijk is aan een index in het geheugen. SEEK kent een geïdentificeerde component een rangnummer toe en maakt het corresponderende element uit het boolean array MARK true. Door het aanroepen van de procedure IDENTIFIE, die het in SEEK toegekende rangnummer als formele parameter bevat, wordt de naam van de stof uitgeprint in maximaal 30 symbolen.

```
procedure IDENTIFIE(k); value k; integer k;
begin SPACE(5);
    for i := 1 step 1 until 20 do PRSYM(NAME[k, i]);
end IDENTIFIE;
```

Deze namen zijn opgeslagen in het twee-dimensionale array NAME (1 : kmax, 1 : 30) als de symboolwaarden van hun letters en cijfers, in dezelfde volgorde als de indices zijn opgeslagen in het array PHASE.

Wanneer dit alles gedaan is voor de fase 1, wordt hetzelfde uitgevoerd voor eventuele andere fases, waarbij ook weer, zo mogelijk, één of meerdere array-elementen van MARK true worden gemaakt. Aan het eind van het programma wordt nagegaan welke componenten op alle (beide) fases of temperaturen mogelijk aanwezig zijn, m.a.w. welke elementen van MARK met gelijk rangnummer in alle (beide) gevallen true zijn, in welk geval weer IDENTIFIE wordt aangeroepen

en de naam van deze component wordt uitgeprint.

```
for k := 1 step 1 until kmax do  
begin for p := 2 step 1 until pmax do  
begin if  $\neg$ MARK[1, k] then goto EXIT;  
if MARK[p - 1, k]  $\wedge$  MARK[p, k] then MARK[p, k] := true  
else MARK[p, k] := false;  
if  $\neg$ MARK[p, k] then goto EXIT;  
end;  
if MARK[pmax, k] then begin NLCR; IDENTIFIE(k) end;  
EXIT: end;
```

Het volledige programma treft men aan in bijlage V.

4.5. De automatische identificatie van een testmonster.

Om de bruikbaarheid van de in het voorgaande beschreven identificatiemethode na te gaan, zijn van een testmonster, bestaande uit de TMS-ethers van een achttal steroiden, drie chromatogrammen opgenomen bij 224°, waarvan pag 1 van bijlage VI een voorbeeld geeft.

De input voor het programma "IDENTIFICATION" heeft de gedaante als weergegeven in bijlage VI, pag 2: nadat aan pmax, kmax en tol een waarde is toegekend, wordt het geheugen gevuld met de namen en desbetreffende indices van de steroiden als getabelleerd in bijlage II. Daarna volgen de chromatogrammen, in dezelfde vorm als benodigd bij het programma "RETENTION DATA". Pag 3 van bijlage VI toont de vorm van de verkregen output.

Doordat we een tolerantie van 2 indexpunten toelaten bij het toekennen van een naam aan een component, kan het voorkomen dat een stof twee namen krijgt toebedeeld: een index 3236,18 kan behoren bij epiandrosteroone (3238 \pm tol) zowel als bij 5b-dihydrotestosterone (3236 \pm tol). Op andere kolommen zijn echter de indices van deze beide stoffen dermate verschillend (zie Edelbroek (3)), dat een dergelijke dubieuze situatie bij de toewijzing van een naam aan een stof uitgesloten moet worden geacht bij het gebruik van twee verschillende kolommen.

Overigens leveren de beide laatste chromatogrammen weinig problemen: de identificatie is hier eenduidig.

5. TEMPERATUURSINVLOEDEN OP RETENTIE-GROOTHEDEN.

5.1. Inleiding.

Nu de identificatie met behulp van de retentie-indices op twee verschillende kolommen goed uitvoerbaar is gebleken, rijst de vraag of een identificatie ook niet mogelijk zou zijn door retentietijden te meten bij twee verschillende temperaturen, in plaats van op twee kolommen. Met andere woorden: kunnen we een stof niet identificeren aan de hand van de temperatuursafhankelijkheid van de retentie-waarden op een bepaalde kolom, en in hoeverre zijn deze afhankelijkheden karakteristiek voor een bepaald steroid?

Om dit na te gaan zijn op SE-30 en op QF-1 bij temperaturen tussen 180° en 240° met behulp van de aangewezen procedures van het ALGOL programma RETENTION DATA de volgende retentie-grootheden berekend:

- de relatieve retentie tot 5a-cholestane,
- de retentie-index,
- het steroid number.

5.2. De relatieve retentie.

De in de literatuur meest voorkomende retentie-grootheid is wel de relatieve retentie tot 5a-cholestane, r . Deze wordt gegeven als het quotient van de nettoretentietijden van de component en die van 5a-cholestane:

$$r = t'/t'_C = (t - t_M)/(t_C - t_M).$$

Voor het verband tussen relatieve retentie en de temperatuur vindt men bij Ettre en Billeb (7) gegeven:

$$\log r = a + b/T.$$

Om dit verband door een computer te laten plotten is het ALGOL-60 programma "RECIPLLOG" ontwikkeld, dat men aantreft in bijlage IX.

Voor een aantal steroiden zijn de relatieve retenties nagegaan over een temperatuurstraject van 60°. Van de zgn steroid-alkanen (kernen) androstane, pregnane en cholestane treft men de meetresultaten aan in bijlage VII, voor zowel SE-30 als QF-1. Een mooie illustratie van het verloop van de relatieve retentie is ook het grafiekje in bijlage VII, pag 4.

Om deze relatieve retenties te berekenen met het programma RETENTION DATA is gebruik gemaakt van het volgende "actual program":

```
nmax := read;
for n := 1 step 1 until nmax do
begin cmax := read; NEW PAGE; COMMENT; NLCR; st := read; r := read;
  for c := 1 step 1 until cmax do
  begin EXTRAPOL; DATAPRINT; STUMBER; PRINDEX; end;
  NEW PAGE; COMMENT; VARALYSIS(tr);
end;
```

5.3. De retentie-index.

Uit de formule voor de berekening van de retentie-index, gegeven in 4.2.2. zien we dat deze index is samengesteld uit een constante waarbij het quotient van twee logaritmes wordt opgeteld. Bij nadere beschouwing blijken deze logaritmes betrekking te hebben op relatieve retenties, en hiervoor geldt:

$$\log r = a + b/T.$$

Dit geeft dan voor de index:

$$I \cong (a + b/T)/(c + d/T).$$

A priori is dus niet te zeggen, hoe het verband is tussen de index en de temperatuur, daar dit afhankelijk is van de constantes a, b, c en d.

Uit onze metingen is vast komen te staan dat de index over een ruim temperatuurstraject recht evenredig is met de temperatuur. Men raadplege bijlage VII en bijlage VIII, pag 2.

5.4. Het steroid number.

Het steroid number volgens vandenHeuvel en Horning (9) is analoog aan de retentie-index; alleen wordt bij deze methode de nettoretentietijd van een component logaritmisches geïnterpoleerd tussen de nettotijden van 5 α -androstane, -pregnane en -cholestane, welke stoffen men de steroid numbers 19, 21 en 27 toekent. De lijn die deze drie punten verbindt is een rechte. In formule wordt dit:

$$SN = 27 - 8 (\log r / \log r_A),$$

waarin r_A voorstelt de relatieve retentie van androstane tot cholestane.

Op dezelfde wijze als bij 5.3. aangeduid, geldt ook voor het steroid number:

$$SN \cong (a + b/T)/(c + d/T).$$

In bijlage VIII, pag 3 vindt men grafisch uitgezet de rechte, die ook de temperatuursafhankelijkheid van het steroid number weergeeft. Ook de steroid numbers kunnen worden berekend met het programma RETENTION DATA en wel door gebruik te maken van het volgende "actual program":

```
nmax := read;
for n := 1 step 1 until nmax do
begin cmax := read; NEW PAGE; COMMENT; NLCR; st := read; r := read;
  for c := 1 step 1 until cmax do
  begin EXTRAPOL; DATAPRINT; STUMBER; PRINDEX end;
  NEW PAGE; COMMENT; VARALYSIS(1);
end;
```

5.5. Conclusie.

Nu gemeten is hoezeer retentiegrootheden gevoelig zijn voor temperatuursinvloeden, is het vrijwel overbodig op te merken hoezeer een perfecte temperatuursbeheersing van belang is. Ter illustratie: 1° temperatuursstijging veroorzaakt op @F-1 een toename van de index met ca 2,5 indexpunt.

Verder is naar voren gekomen dat het steroid number niet dermate temperatuursonafhankelijk is als wel wordt gesuggereerd (9); geldt een onafhankelijkheid nog wel voor de steroidalkanen, voor gesubstitueerde steroiden lijkt dat beduidend minder het geval te zijn. Het moet verder door de gebleken vrij grote temperatuursafhankelijkheden van retentie-waarden niet onmogelijk geacht worden dat een identificatie op grond van temperatuurscoefficienten uitvoerbaar is.

6. HET VERBAND TUSSEN STRUKTUUR EN RETENTIE.

6.1. Inleiding.

De retentie-indices die men meet op een non-selectieve fase, zoals SE-30, zijn een functie van zowel molecuulgewicht als van molecuulbouw, terwijl de polariteit van functionele groepen weinig effect heeft. Daarom worden op SE-30 bv de drie estrogenen ook geëluëerd in de volgorde: estrone, estradiol, estriol, daar ze resp één, twee en drie TMS-groepen bevatten (zie bijlage I). Op QF-1 is die volgorde echter: estradiol, estriol, estrone (bijlage II). Estrone als laatste door de sterke retentie die QF-1 op de keto-functie uitoefent.

Een dergelijke uitgesproken interactie tussen steroiden en een nonselectieve (apolaire) fase bestaat er echter niet, en hierdoor zijn incrementen in de indices als gevolg van de aanhechting van functionele groepen aan de steroid-kernen additief en onafhankelijk;

$$\log r = \log r_n + \sum \Delta \log r_g, \quad n = \text{nucleus}$$

$$I = I_n + \sum \Delta I_g. \quad g = \text{groups}$$

Hierdoor is het mogelijk retentie-indices van vele steroiden zeer nauwkeurig te voorspellen. Het is duidelijk dat dit van groot nut kan zijn bij het identificeren van onbekende pieken in een chromatogram. Nu deze incrementen door onder andere F.A.Vandenheuvel (4) uitvoerig zijn nagegaan op apolaire fases, lijkt het interessant ook voor de bij dit onderzoek veelvuldig gebruikte selectieve (=polaire) fase QF-1 na te gaan, of en in hoeverre incrementen in de index ten gevolge van functionele groepen onafhankelijk en additief zijn.

6.2. Voorbeelden.

Onder 4.3. is al aangegeven, hoe van de TMS-ethers van vele steroiden de retentie-indices op QF-1 zijn bepaald. De hieronder aanwezige epimeren en stereoisomeren bieden een goede gelegenheid om een eventueel verband tussen structuur en retentie op deze fase na te gaan. Uit bijlage II lichten we enige voorbeelden:

de overgang 5a \rightarrow Δ 5:

androsterone \rightarrow dehydroandrosterone:	3111 \rightarrow 3077	-34
epiandrosterone \rightarrow dehydroepiandrosterone	3238 \rightarrow 3172	-66

De overgang 5a → 5b:

androstane → etiocholane:	2289 → 2255	-34
androsterone → etiocholanolone:	3111 → 3145	+34
5a- → 5b-dihydrotestosterone:	3275 → 3236	-39
11b-hydroxy-androsterone → -etio:	3284 → 3329	+45
11-keto-androsterone → -etiocholanolone:	3335 → 3353	+18
5a- → 5b-pregnane-3a,20a-diol:	2965 → 2991	+26
5a- → 5b-pregnane-3b,20a-diol:	3095 → 2975	-120
allopregnane → pregnane:	2475 → 2434	-41

De overgang 3a → 3b:

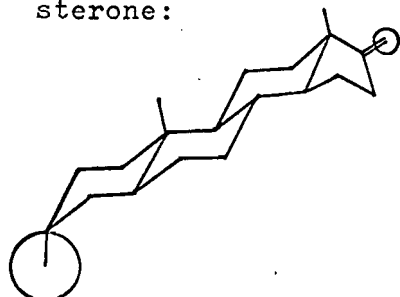
androsterone → epiandrosterone:	3111 → 3238	+127
dehydroandrosterone → dehydroepiandro.:	3077 → 3172	+95
5a-pregnane-(3a → 3b),20a-diol:	2965 → 3095	+130
5b-pregnane-(3a → 3b),20a-diol:	2991 → 2975	-16
5b-pregnane-(3a → 3b),20b-diol:	2957 → 3065	+108

6.3. Opmerkingen.

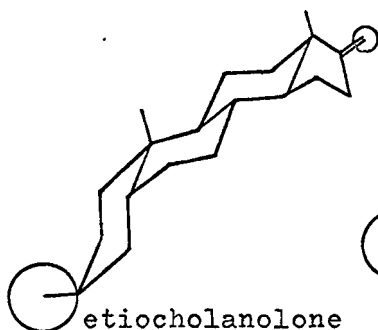
Bij vergelijking van de indices op SE-30 en QF-1 van de steroidkernen, blijken ook deze enigermate polair te zijn. In de grafiek op bijlage VII, pag 3 zien we dat zelfs de 5a- en 5b-steroiden enig verschil in polariteit vertonen; de vlakke 5a-structuur heeft wat meer interactie met de stationaire fase, en wordt daarom iets later geëluëerd dan de overeenkomstige 5b-structuur.

Gesubstitueerde 5a-steroiden blijken echter sneller te zijn dan de 5b-vorm: de grote TMS-groep vervormt het molecuul enigszins; de interactie tussen steroid en stationaire fase wordt anders.

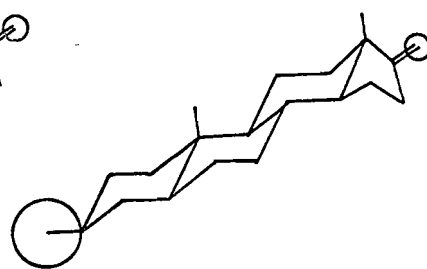
Dit ziet men goed bij bv androsterone, etiocholanolone en epiandrosterone:



androsterone
I = 3111



etiocholanolone
I = 3145



epiandrosterone
I = 3238

Epiandrosterone heeft de vlakste structuur, en dus de hoogste index.

Zoals ook uit de tabel in 6.2. blijkt, zijn deze effecten nauwelijks meer dan kwalitatief aanwijsbaar; kwantitatieve, onafhankelijke incrementen te geven is in tegenstelling tot bij non-selectieve (=a-polaire) fases, hier vrijwel onmogelijk.

Er worden bij polaire fases, zoals QF-1, namelijk sterke interacties geïnduceerd tussen de functionele groepen in het steroid-molecuul en de polaire stationaire fase, welke interacties in grootte variëren met elke verschillende configuratie.

Doordat zo de waarde van elk increment bij elke structuur anders is, is een precieze voorspelling van retentie-indices uit de structuur, met een polaire stationaire fase, een zeer complexe, zo niet onmogelijke opdracht.

LITERATUURVERWIJZINGEN.

1. C.Chen en C.D.Lantz, Biochem.Biophys.Res.Comm. 3(1960),182
2. P.W.J.L.Kneepkens, scriptie Instrumentele Analyse, T.H. (1969)
3. A.J.M.Edelbroek, afstudeerverslag Instrumentele Analyse,
T.H.Eindhoven (1969)
4. F.A.Vandenheuvel en S.A.Court, J.Chromatogr. 38(1968),439
5. E.Kovats, Helv.Chim.Acta, 41(1958),1915
6. H.Groenendijk en A.W.C.van Kemenade, Chromatografia 1(1968),472
7. L.S.Ettre en K.Billeb, J.Chromatog 30(1967),1 & 12
8. R.A.Hively en R.E.Hinton, J.Gaschromatog 6(1968), 203
9. W.J.A.vandenHeuvel en E.C.Horning, Biochem.Biophys.Acta 64(1962),416
en R.J.Hamilton e.a., Biochem.Biophys.Acta 70(1963),679

Bijlage I

Retentie-indices van de TMS-ethers van steroiden.

KOLOM: RVS, 20 m, $\frac{1}{4}$ mm inw
 STATIONAIRE FASE: SE-30
 DRAAGGAS: stikstof
 TEMPERATUUR: 250°C
 GEINJ. HOEVEELHEID: circa 10 nanogram

systematische namen:	triviale namen:	indices:
Estratriene-3,17b-diol	(17b) estradiol	2693 \pm 1
Estratriene-3,16a,17b-triol	estriol	2905 \pm 1
Estratrien-3-ol-17-one	estrone	2629 \pm 1
5a-Androstan-3a-ol-17-one	androsterone	2520 \pm 1
5b-Androstan-3a-ol-17-one	etiocholanolone	2533 \pm 1
Androst-5-en-3a-ol-17-one	dehydroandrosterone	2501 \pm 1
5a-Androstan-3b-ol-17-one	epiandrosterone	2609 \pm 1
Androst-5-en-3b-ol-17-one	dehydroepiandrosterone	2597 \pm 3
5a-Androstane-3a,11b-diol-17-one	11b-hydroxyandrosterone	2713 \pm 2
5b-Androstane-3a,11b-diol-17-one	11b-hydroxyetiochol.	2732 \pm 0
5a-Androstan-3a-ol-11,17-dione	11-ketoandrosterone	2609 \pm 1
5b-Androstan-3a-ol-11,17-dione	11-ketoetiocholanolone	2609 \pm 1

Retentie-indices van de TMS-ethers van steroiden.KOLOM: RVS, 20 m, $\frac{1}{4}$ mm inw

STATIONAIRE FASE: QF-1

DRAAGGAS: stikstof

TEMPERATUUR: 224°C

GEINJ. HOEVEELHEID: ca 10 nanogram

systematische namen:	triviale namen:	indices:
Estratriene-3,17b-diol	(17b-)estradiol	2983 \pm 1
Estratriene-3,16a,17b-triol	estriol	3175 \pm 0
Estratrien-3-ol-17-one	estrone	3321 \pm 1
5a-Androstane	androstane	2289 \pm 3
5b-Androstane	etiocholane	2255 \pm 12
5a-Androstane-3b,17b-diol	androstenediol	2844 \pm 2
5a-Androstan-3a-ol-17-one	androsterone	3111 \pm 0
5b-Androstan-3a-ol-17-one	etiocholanolone	3145 \pm 1
Androst-5-en-3a-ol-17-one	dehydroandrosterone	3077 \pm 1
5a-Androstan-3b-ol-17-one	epiandrosterone	3238 \pm 1
Androst-5-en-3b-ol-17-one	dehydroepiandrosterone	3172 \pm 2
5a-Androstan-17b-ol-3-one	5a-dihydrotestosterone	3275 \pm 4
5b-Androstan-17b-ol-3-one	5b-dihydrotestosterone	3236 \pm 4
5a-Androstane-3a,11b-diol-17-one	11b-hydroxyandrosterone	3284 \pm 1
5b-Androstane-3a,11b-diol-17-one	11b-hydr.etiocholanolone	3329 \pm 1
5a-Androstan-3a-ol-11,17-dione	11-ketoandrosterone	3335 \pm 8
5b-Androstan-3a-ol-11,17-dione	11-ketoetiocholanolone	3353 \pm 8
5a-Pregnane	allopregnane	2475 \pm 1
5b-Pregnane	pregnane	2434 \pm 1
5a-Pregnane-3a,20a-diol	allopregnanediol	2965 \pm 3
5b-Pregnane-3a,20a-diol	pregnanediol	2991 \pm 1
5b-Pregnane-3a,20b-diol		2957 \pm 1
5a-Pregnane-3b,20a-diol		3095 \pm 1
5b-Pregnane-3b,20a-diol		2975 \pm 1
5a-Pregnane-3b,20b-diol		3065 \pm 1

Bijlage II, pag 2

systematische namen:	triviale namen:	indices:
5b-Pregnan-3a-ol-20-one	pregnanolone	3229 ± 2
Pregn-4-en-3b-ol-20-one	pregnenolone	3300 ± 3
5a-Cholestane	cholestane	3052 ± 2

Lijst van variabelen in de ALGOL-60 programma's.

st	koolstofgetal van de tweede toegevoegde standaard-alkaan
r	verschil in koolstofgetal tussen de standaard-alkanen
nmax (n)	aantal blokken "identieke" chromatogrammen
cmax (c)	aantal "identieke" chromatogrammen in een blok
kmax (k)	aantal componenten in een monster
pmax (p)	aantal phases waarvan retentie-indices in het geheugen zijn opgeslagen (bij IDENTIFICATION)
tol	tolerantie in indexpunten bij IDENTIFICATION
TO	methaantijd van een kolom
Ts	netto-retentietijd van standaard-alkaan C_{st}
Rs	relatieve retentie van twee opeenvolgende standaard-alkanen
tb	bruto-retentietijden
tn	netto-retentietijden
tr	relatieve retentietijden
I	retentie-index
SN	steroid number

Lalgol 04162198 m snyders

```
begin comment 0416 2198 RETENTION DATA
    tape contents procedures EXTRAPOL, DATAPRINT, COMMENT, RETINDEX,
    PRINDEX, VARALYSIS, MEASURED, REGRANAL, STUMBER;
integer st, r, n, nmax, k, kmax, c, cmax;
real TO, Ts, Rs;
array ts, tq[1 : 25], tb, tn, tr, I[1 : 25, 1 : 25];

procedure EXTRAPOL;
begin comment procedure calculates zero-time of a chromatogram
    by extrapolation from three equidistant n-alkanes;
    integer i; array tb, tn[1 : 3];
    for i := 1 step 1 until 3 do tb[i] := read;
    TO := (tb[1] × tb[3] - tb[2] × tb[2]) / (tb[1] + tb[3] - 2 × tb[2]);
    for i := 1 step 1 until 3 do tn[i] := tb[i] - TO;
    Rs := tn[3] / tn[2]; Ts := tn[2];
end EXTRAPOL;

procedure MEASURED;
begin comment procedure calculates chromatographic
    data with a measured zero-time;
    TO := read; Ts := read; Rs := read / Ts;
end MEASURED;

procedure REGRANAL;
begin comment procedure calculates zero-time by regression-analysis
    in a number of measurements;
    integer R, lt, n, p, s1, s2, i, a;
    real t0, t0min, t0max, t0opt, m, v1, t1, t2, x0, y0, k, l, S, Smin, d;
    real array tb, tn, ltn[1 : 25]; lt := read; R := r; st := st - R;
    for n := st step R until lt do tb[n] := read; p := lt - 2 × R; i := ((lt - st) / R) + 1;
    for n := st step R until p do
    begin t0 := (tb[n + R] × tb[n + R] - tb[n] × tb[n + 2 × R]) / (2 × tb[n + R] - tb[n] - tb[n + 2 × R]);
        if n = st then begin t0min := t0; t0max := t0; end;
        if t0 < t0min then t0min := t0;
        if t0 > t0max then t0max := t0;
    end;
end;
```

```

comment REGRANAL continued;
t0 := t0max; m := (t0max - t0min) * m-2; a := 1; d := ln(10);
for t0 := t0 while t0 > t0min do
begin s1 := 0; s2 := 0; v1 := 0; t1 := 0; t2 := 0;
  for n := st step R until lt do
  begin tn[n] := tb[n] - t0; ltn[n] := (ln(tn[n]))/d; s1 := s1 + n; t1 := t1 + ltn[n];
    v1 := v1 + n * ltn[n]; s2 := s2 + n * n; t2 := t2 + ltn[n] * ltn[n];
  end;
  x0 := s1/i; y0 := t1/i; k := (v1 - i * x0 * y0)/(s2 - i * x0 * x0); l := y0 - k * x0; S := 0;
  for n := st step R until lt do S := S + (k * n + l - ltn[n]) ^ 2;
  if t0 = t0max then Smin := S;
  if S < Smin then t0opt := t0; t0 := t0 - m; a := a + 1;
end;
TO := t0opt; Ts := tb[st + R] - TO; Rs := (tb[st + 2 * R] - TO)/Ts;
end REGRANAL;

```

```

procedure DATAPRINT;
begin comment procedure prints zero-time and other standard data
  obtained from a single chromatogram;
  PRINTTEXT(<t0 = >); FIXT(4, 4, TO); NLCR;
  PRINTTEXT(<relst = >); ABSFIXT(2, 4, Rs); NLCR;
  PRINTTEXT(<slope = >); ABSFIXT(2, 4, (ln(Rs)/(r * ln(10)))); NLCR;
  PRINTTEXT(<internal standards: C>); FIXT(2, 0, (-st + r));
  FIXT(2, 0, (-st)); FIXT(2, 0, (-st - r)); NLCR;
end DATAPRINT;

```

```

procedure RETINDEX;
begin comment procedure calculates retention times and indices of
  the components in a chromatogram;
  real b; k := 0;
  for b := read while b ≠ 0 do
  begin k := k + 1; tb[k, c] := b; tn[k, c] := tb[k, c] - TO; tr[k, c] := tn[k, c]/Ts;
    I[k, c] := 100 * (st + r * ln(tr[k, c])/ln(Rs));
  end; kmax := k;
end RETINDEX;

```

```

procedure STUMBER;
begin comment procedure calculates steroid numbers and
      relative retention data to 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol-20-one;
      real b, A, C; k := 0; A := read - T0; C := read - T0;
      for b := read while b  $\neq$  0 do
      begin k := k + 1; tb[k, c] := b; tn[k, c] := tb[k, c] - T0; tr[k, c] := tn[k, c]/C;
      I[k, c] := 100  $\times$  (27 - 8  $\times$  (ln(tr[k, c])/ln(A/C)));
      end; kmax := k;
end STUMBER;

```

```

procedure PRINDEX;
begin comment procedure prints retention times and indices of the components
      in a chromatogram as calculated by RETINDEX or STUMBER;
      PRINTTEXT( (brutotime      nettotime      log(tn)      retime      log(tr)      index      index  $\downarrow$ ); NLCR;
      for k := 1 step 1 until kmax do
      begin ABSFIXT(5, 2, tb[k, c]); SPACE(5);
      ABSFIXT(5, 2, tn[k, c]); SPACE(5);
      ABSFIXT(3, 4, (ln(tn[k, c])/ln(10))); SPACE(5);
      ABSFIXT(3, 4, tr[k, c]); SPACE(5);
      FIXT(3, 4, (ln(tr[k, c])/ln(10))); SPACE(5);
      ABSFIXT(5, 2, I[k, c]); SPACE(8);
      ABSFIXT(4, 0, I[k, c]); NLCR;
      end; NLCR; NLCR;
end PRINDEX;

```

```

procedure VARALYSIS(u); array u;
begin comment procedure calculates and prints the average retention index
      and variance and standard deviation;
      real a; CARRIAGE(3);
      PRINTTEXT( (average      variance      stand.dev      average      name of the component $\downarrow$ ); NLCR;
      for k := 1 step 1 until kmax do ts[k] := tq[k] := 0;
      for k := 1 step 1 until kmax do
      begin for c := 1 step 1 until cmax do
      begin ts[k] := ts[k] + u[k, c]; tq[k] := tq[k] + u[k, c]  $\times$  u[k, c] end;
      if cmax = 1 then a := 0 else a := (tq[k] - ts[k]  $\times$  ts[k]/cmax)/(cmax - 1); SPACE(5);
      ABSFIXT(4, 2, ts[k]/cmax); SPACE(5);
      ABSFIXT(3, 3, a); SPACE(5);
      ABSFIXT(3, 3, sqrt(a)); SPACE(15);
      end;
      end;

```

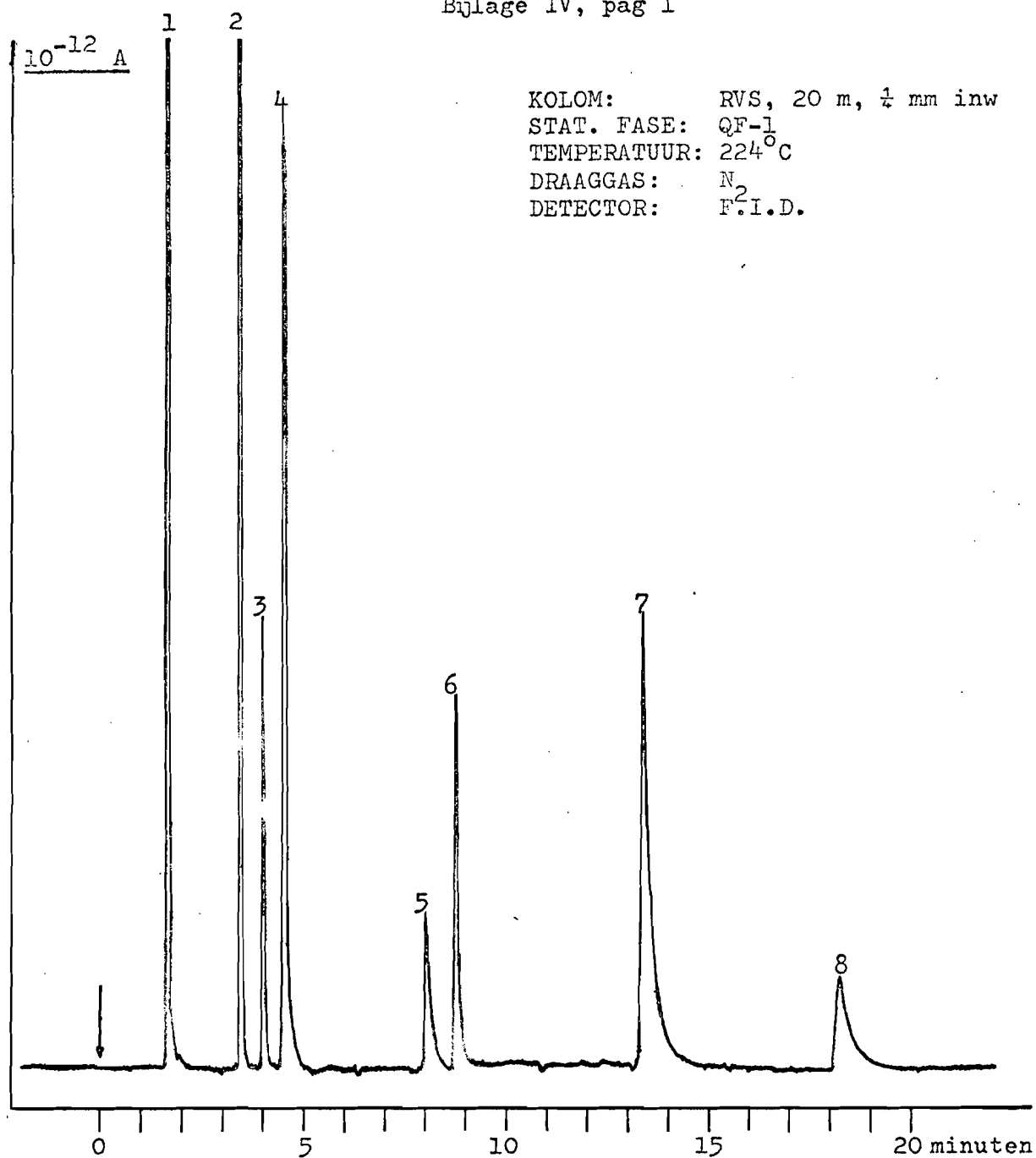


```
.....  
    comment VARALYSIS continued;  
    ABSFIXT(4, 0, ts[k]/cmax); PRINTTEXT(+);  
    ABSFIXT(2, 0, sqrt(a)); SPACE(5); COMMENT;  
    end;  
end VARALYSIS;  
.....  
procedure COMMENT;  
begin integer i;  
    for i := RESYM while i  $\neq$  88 do .....  
    begin if i  $\neq$  119 then PRSYM(i); end; NLCR;  
end COMMENT;  
.....  
comment beyond this the actual program;
```

< ACTUAL PROGRAM >

```
.....  
end .....  
progend
```

Bijlage IV, pag 1



KOLOM: RVS, 20 m, 1/4 mm inw
 STAT. FASE: QF-1
 TEMPERATUUR: 224°C
 DRAAGGAS: N₂
 DETECTOR: F.I.D.

1: oplosmiddel	6 1	7 5 5 2 4
2: 5a-androstane	1 2 8	5 2 8 9 4
3: n-C-24	1 5 0	1 0 6 6 1
4: 5a-pregnane	1 6 9	6 7 0 8 7
5: n-C-28	3 0 1	8 0 8 6
6: androstanediol	3 2 8	1 3 5 2 4
7: 5a-cholestane	5 0 2	3 4 5 1 6
8: n-C-32	6 8 5	1 1 2 1 3

↓
 ↳ piekoppervlak) infotonics-
 ↳ retentietijd) eenheden

Input voor programma RETENTION DATA.

1

6 qf-1,224 c, series iii.

28	4						
156	311	706	133	175	513	338	0
88	241	633	66	107	445	270	0
150	301	685	128	169	502	328	0
151	303	685	128	170	501	331	0
85	236	624	62	103	438	262	0
85	236	621	63	104	436	263	0

retention indices on qf-1, 224 c.

5a-androstane.

5a-pregnane.

5a-cholestane.

androstanediol.

GF-1,224 C, SERIES III

BULAGE IX, pag 3

TO = +55,8958
 RELST = 2,5484
 SLOPE = .1016

INTERNAL STANDARDS: C-24 -28 -32

BRUTOTIME	NETTOTIME	LOG(TN)	RELTIME	LOG(TR)	INDEX	INDEX
133.00	77.10	1.8871	.3022	-.5196	2288,37	2288
175.00	119.10	2.0759	.4669	-.3308	2474,31	2474
513.00	457.10	2.6600	1.7918	+.2533	3049,39	3049
338.00	282.10	2.4504	1.1058	+.0437	2843,02	2843

TO = -9,9456
 RELST = 2,5621
 SLOPE = .1021

INTERNAL STANDARDS: C-24 -28 -32

BRUTOTIME	NETTOTIME	LOG(TN)	RELTIME	LOG(TR)	INDEX	INDEX
66.00	75.95	1.8805	.3026	-.5191	2291,84	2292
107.00	118.95	2.0680	.4660	-.3316	2475,38	2475
445.00	454.95	2.6580	1.8129	+.2584	3052,94	3053
270.00	279.95	2.4471	1.1156	+.0475	2846,50	2846

TO = +52,1416
 RELST = 2,5430
 SLOPE = .1013

INTERNAL STANDARDS: C-24 -28 -32

BRUTOTIME	NETTOTIME	LOG(TN)	RELTIME	LOG(TR)	INDEX	INDEX
128.00	75.86	1.8800	.3048	-.5159	2290,87	2291
169.00	116.86	2.0677	.4696	-.3283	2476,04	2476
502.00	449.86	2.6531	1.8077	+.2571	3053,73	3054
328.00	275.86	2.4407	1.1085	+.0447	2844,14	2844

TO = +50,5478
 RELST = 2,5132
 SLOPE = .1001

INTERNAL STANDARDS: C-24 -28 -32

BRUTOTIME	NETTOTIME	LOG(TN)	RELTIME	LOG(TR)	INDEX	INDEX
128.00	77.45	1.8890	.3068	-.5131	2287,14	2287
170.00	119.45	2.0772	.4732	-.3250	2475,19	2475
501.00	450.45	2.6536	1.7843	+.2515	3051,33	3051
331.00	280.45	2.4479	1.1109	+.0457	2845,65	2846

TO = -11,2068
 RELST = 2,5695
 SLOPE = .1025

INTERNAL STANDARDS: C-24 -28 -32

BRUTOTIME	NETTOTIME	LOG(TN)	RELTIME	LOG(TR)	INDEX	INDEX
62.00	73.21	1.8646	.2961	-.5285	2284,20	2284
103.00	114.21	2.0577	.4620	-.3354	2472,70	2473
438.00	449.21	2.6524	1.8171	+.2594	3053,15	3053
262.00	273.21	2.4365	1.1052	+.0434	2842,39	2842

TO = -12,4402
 RELST = 2,5497
 SLOPE = .1016

INTERNAL STANDARDS: C-24 -28 -32

BRUTOTIME	NETTOTIME	LOG(TN)	RELTIME	LOG(TR)	INDEX	INDEX
63.00	75.44	1.8776	.3037	-.5176	2290,64	2291
104.00	116.44	2.0661	.4687	-.3291	2476,13	2476
436.00	448.44	2.6517	1.8050	+.2565	3052,39	3052
263.00	275.44	2.4400	1.1087	+.0448	2844,09	2844

180869 - 68 - 4162198 M SNYDERS

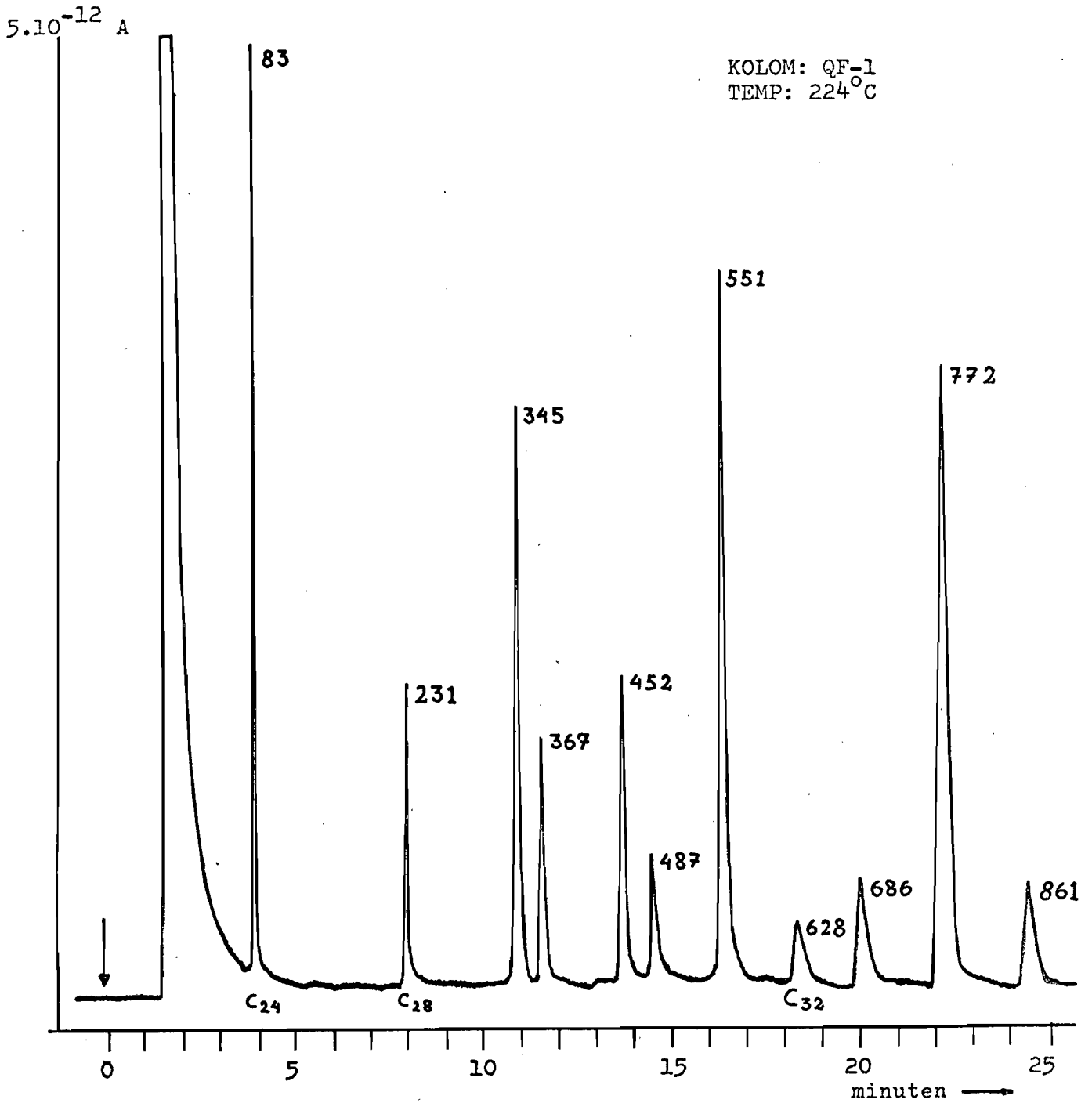
RETENTION INDICES ON GF-1, 224 C

AVERAGE	VARIANCE	STAND. DEV	AVERAGE	NAME OF THE COMPONENT
2288,84	8.202	2.864	2289 +/- 3	5A-ANDROSTANE
2474,96	1.665	1.290	2475 +/- 1	5A-PREGNANE
3052,16	2.491	1.578	3052 +/- 2	5A-CHOLESTANE
2844,30	2.405	1.551	2844 +/- 2	ANDROSTANEDIOL

Lalqol 04162198 m snyders

```
begin comment 0416 2198 IDENTIFICATION;
  integer c, cmax, k, kmax, p, pmax, i, j, st, r;
  real I, tol, TO, Rs, Ts, b, tn, tr;
  pmax := read; kmax := read; tol := read;
  begin integer array NAME[1 : kmax, 1 : 30];
    real array PHASE[1 : pmax, 1 : kmax];
    boolean array MARK[1 : pmax, 1 : kmax];
    procedure SEEK(I, p, tol); value I, p, tol; integer p; real I, tol;
    begin for k := 1 step 1 until kmax do
      begin if I > (PHASE[p, k] - tol) ^ I < (PHASE[p, k] + tol)
        then begin MARK[p, k] := true; IDENTIFIE(k) end;
      end;
    end SEEK;
    procedure IDENTIFIE(k); value k; integer k;
    begin SPACE(5);
      for i := 1 step 1 until 30 do PRSYM(NAME[k, i]);
    end IDENTIFIE;
    procedure COMMENT;
    begin for i := RESYM while i ≠ 88 do
      begin if i ≠ 119 then PRSYM(i); end; NLCR;
    end COMMENT;
    for k := 1 step 1 until kmax do
      begin for i := 1 step 1 until 30 do NAME[k, i] := 93; i := 0;
        for j := RESYM while j ≠ 88 do
          begin if j ≠ 119 then begin i := i + 1; NAME[k, i] := j end end;
        end;
      end;
    for p := 1 step 1 until pmax do
      for k := 1 step 1 until kmax do PHASE[p, k] := read;
    for p := 1 step 1 until pmax do
      for k := 1 step 1 until kmax do MARK[p, k] := false; p := 0;
    for p := p + 1 while p < pmax do
      begin cmax := read; NEW PAGE; COMMENT; NLCR; st := read; r := read;
        for c := 1 step 1 until cmax do
          begin real array tb[1 : 3];
            for i := 1 step 1 until 3 do tb[i] := read;
            TO := (tb[1] × tb[3] - tb[2] × tb[2]) / (tb[1] + tb[3] - 2 × tb[2]);
```


Testchromatogram voor IDENTIFICATION.



Bij de pieken staan genoteerd de retentietijden in infotronics-units.

Input voor IDENTIFICATION

1 28 2

estradiol.
 estriol.
 estrone.
 5 α -androstane.
 5 β -androstane.
 androstenediol.
 androsterone.
 etiocholanolone.
 dehydroandrosterone.
 epiandrosterone.
 dehydroepiandrosterone.
 5 α -dihydrotestosterone.
 5 β -dihydrotestosterone.
 11 β -hydroxyandrosterone.
 11 β -hydroxyetiocholanolone.
 11-ketoandrosterone.
 11-ketoetiocholanolone.
 allopregnane.
 pregnane.
 allopregnanediol.
 pregnanediol.
 5 β -P-3 α ,20 β -diol.
 5 α -P-3 β ,20 α -diol.
 5 β -P-3 β ,20 α -diol.
 5 α -P-3 β ,20 β -diol.
 pregnanolone.
 pregnenolone.
 cholestane.
 2982 3175 3321 2289 2255 2844 3111 3145
 3077 3238 3172 3275 3236 3284 3329 3335
 3353 2475 2434 2965 2991 2957 3095 2975
 3065 3229 3300 3052

3 qf-1, 224 c, series identification test.

28

4

77	231	628	345	367	452	487	551
686	772	861	0				
24	174	561	285	307	389	422	485
621	703	790	0				
& 83	235	629	347	370	452	485	549
690	771	857	0				

Het met & gemerkte chromatogram vindt men op bijlage VI, pag 1.

Temperatuursafhankelijkheid van retentie-waarden op SE-30.INDICES:

	180°	190°	200°	210°	230°
5a-androstane	2039	2052	2066	2079	2119
5b-androstane	2021	2029	2041	2050	2093
5a-pregnane	2193	2203	2224	2241	2280
5b-pregnane	2171	2182	2195	2213	2249
5a-cholestane	2720	2743	2758	2782	2817
5b-cholestane	2692	2713	2728	2750	2783

STEROID NUMBERS:

	180°	190°	200°	210°	230°
5a-androstane	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
5b-androstane	18.74	18.72	18.70	18.71	18.71
5a-pregnane	20.74	20.85	20.85	20.83	20.83
5b-pregnane	20.48	20.48	20.54	20.54	20.48
5a-cholestane	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00
5b-cholestane	27.67	26.69	26.66	26.65	26.61

RELATIEVE RETENTIES:

	180°	190°	200°	210°	230°
5a-androstane	0.09	0.09	0.10	0.11	0.15
5b-androstane	0.08	0.09	0.09	0.11	0.14
5a-pregnane	0.15	0.16	0.17	0.19	0.23
5b-pregnane	0.13	0.14	0.15	0.17	0.22
5a-cholestane	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
5b-cholestane	0.90	0.91	0.91	0.91	0.91

Temperatuursafhankelijkheid van retentie-waarden op QF-1.INDICES:

	180°	190°	200°	210°	230°	240°
5a-androstane	2204	2195	2260	2278	2336	2357
5b-androstane	2173	2151	2226	2241	2297	2317
5a-pregnane	2384	2386	2439	2466	2527	2548
5b-pregnane	2351	2366	2408	2424	2469	2497
5a-cholestane	2953	2984	3005	3036	3078	3103
5b-cholestane	2915	2944	2962	2994	3032	3051

STEROID NUMBERS:

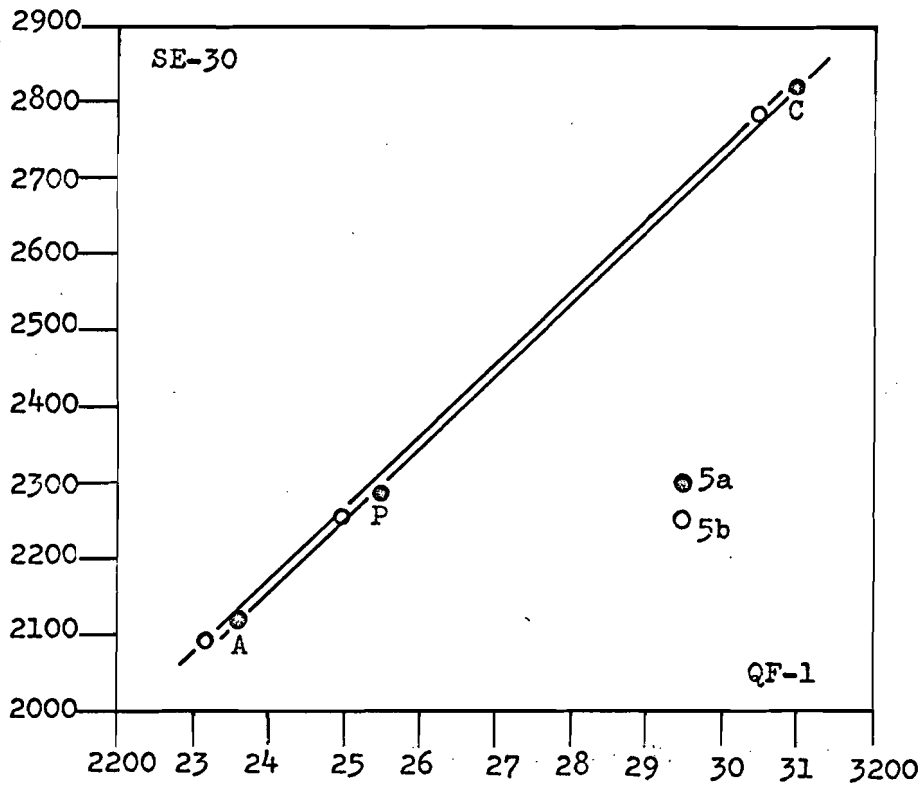
	180°	190°	200°	210°	230°	240°
5a-androstane	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
5b-androstane	18.67	18.55	18.63	18.61	18.61	18.57
5a-pregnane	20.92	20.90	20.92	20.98	20.99	21.07
5b-pregnane	20.59	20.59	20.56	20.54	20.51	20.40
5a-cholestane	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00	27.00
5b-cholestane	26.54	26.60	26.54	26.55	26.53	26.49

RELATIEVE RETENTIES:

	180°	190°	200°	210°	230°	240°
5a-androstane	0.11	0.14	0.14	0.15	0.15	0.19
5b-androstane	0.11	0.12	0.12	0.14	0.14	0.17
5a-pregnane	0.19	0.21	0.22	0.24	0.25	0.29
5b-pregnane	0.18	0.20	0.20	0.21	0.22	0.25
5a-cholestane	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
5b-cholestane	0.88	0.89	0.89	0.90	0.90	0.90

Vergelijking van de retentie-indices bij 230° van steroid-alkanen.

A = Androstane
P = Pregnane
C = Cholestane



Temperatuursafhankelijkheid van retentiewaarden op SE-30.INDICES:

	180°	200°	220°	240°
5a-Androstane	2000	2030	2076	2097
5a-Cholestane	2728	2763	2800	2838
Androsterone	2429	2460	2488	2522
11-ketoetiocholanolone	2523	2553	2579	2606
11b-Hydroxyandrosterone	2634	2659	2683	2708
Estriol	2852	2866	2883	2902

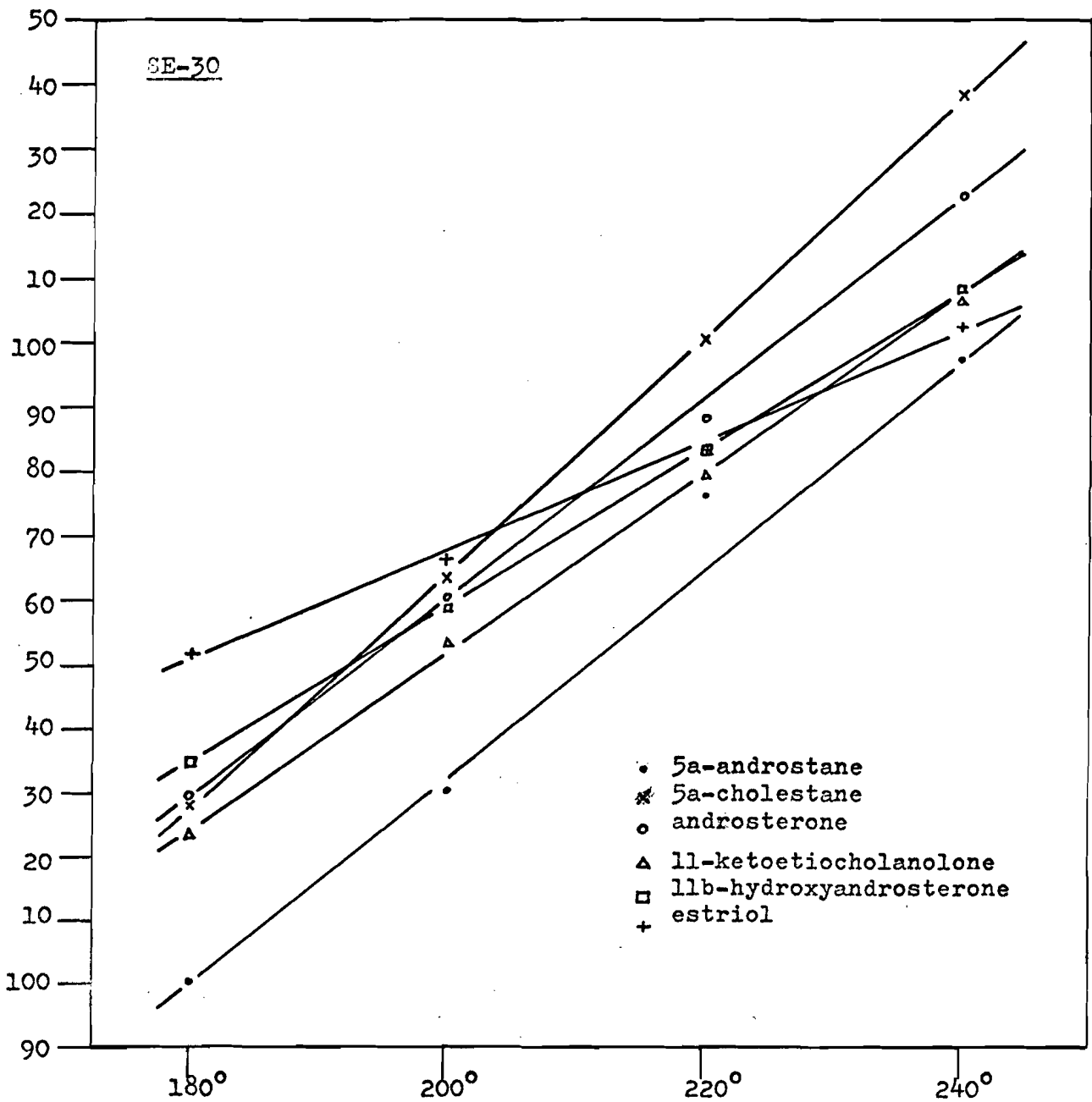
STEROID NUMBERS:

	180°	200°	220°	240°
Androsterone	23.72	23.69	23.55	23.59
11-Ketoetiocholanolone	24.75	24.70	24.56	24.50
11b-Hydroxyandrosterone	25.97	25.86	25.71	25.59
Estriol	28.36	28.12	27.91	27.69

RELATIEVE RETENTIES:

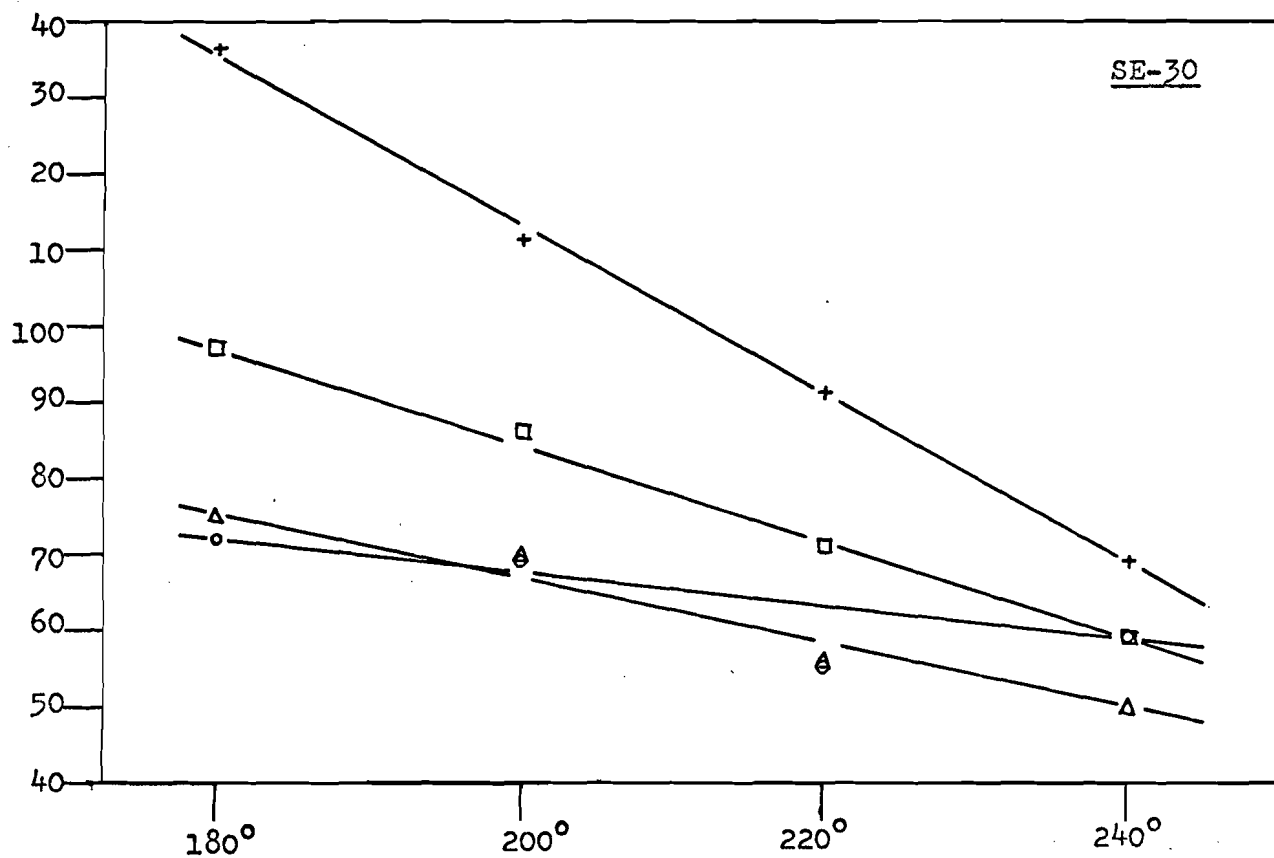
	180°	200°	220°	240°
Androsterone	0.33	0.36	0.40	0.42
11-Ketoetiocholanolone	0.46	0.49	0.52	0.53
11b-Hydroxyandrosterone	0.70	0.70	0.71	0.70
Estriol	1.59	1.42	1.28	1.19

Temperatuursafhankelijkheid van retentie-indices.



N.B. Op de verticale as zijn uitgezet de laatste twee cijfers van de retentie-indices.

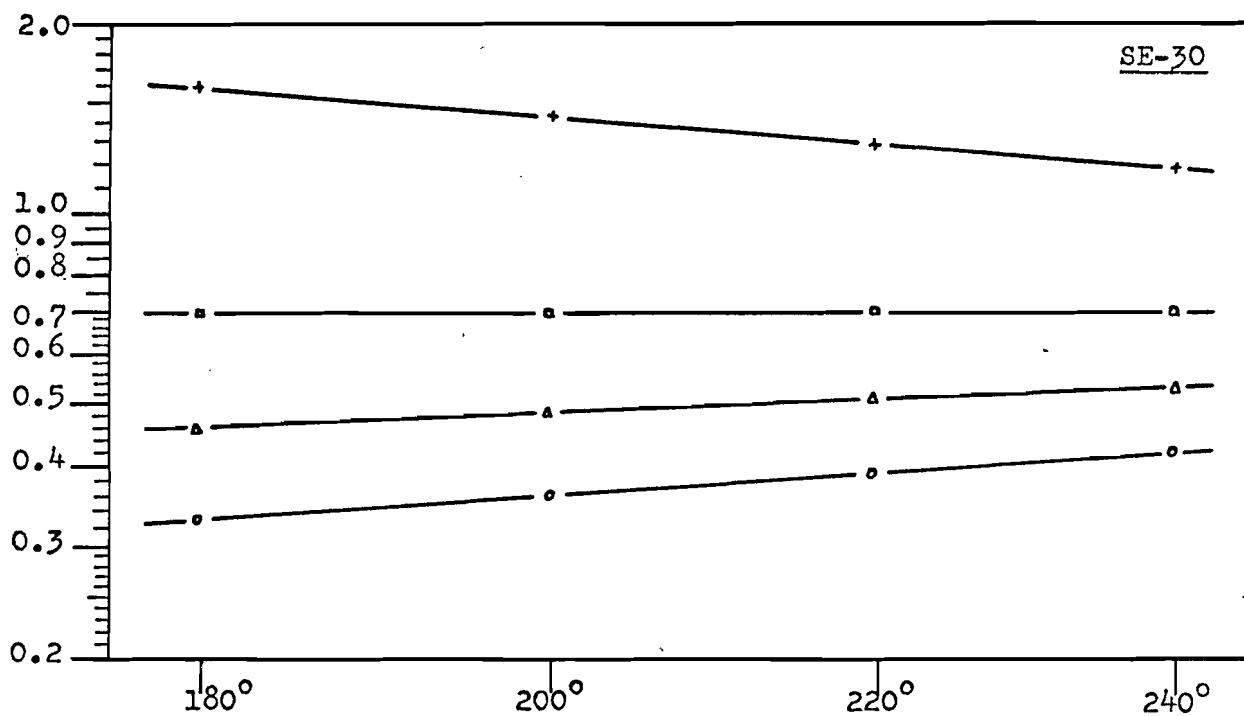
Temperatuursafhankelijkheid van steroid numbers.



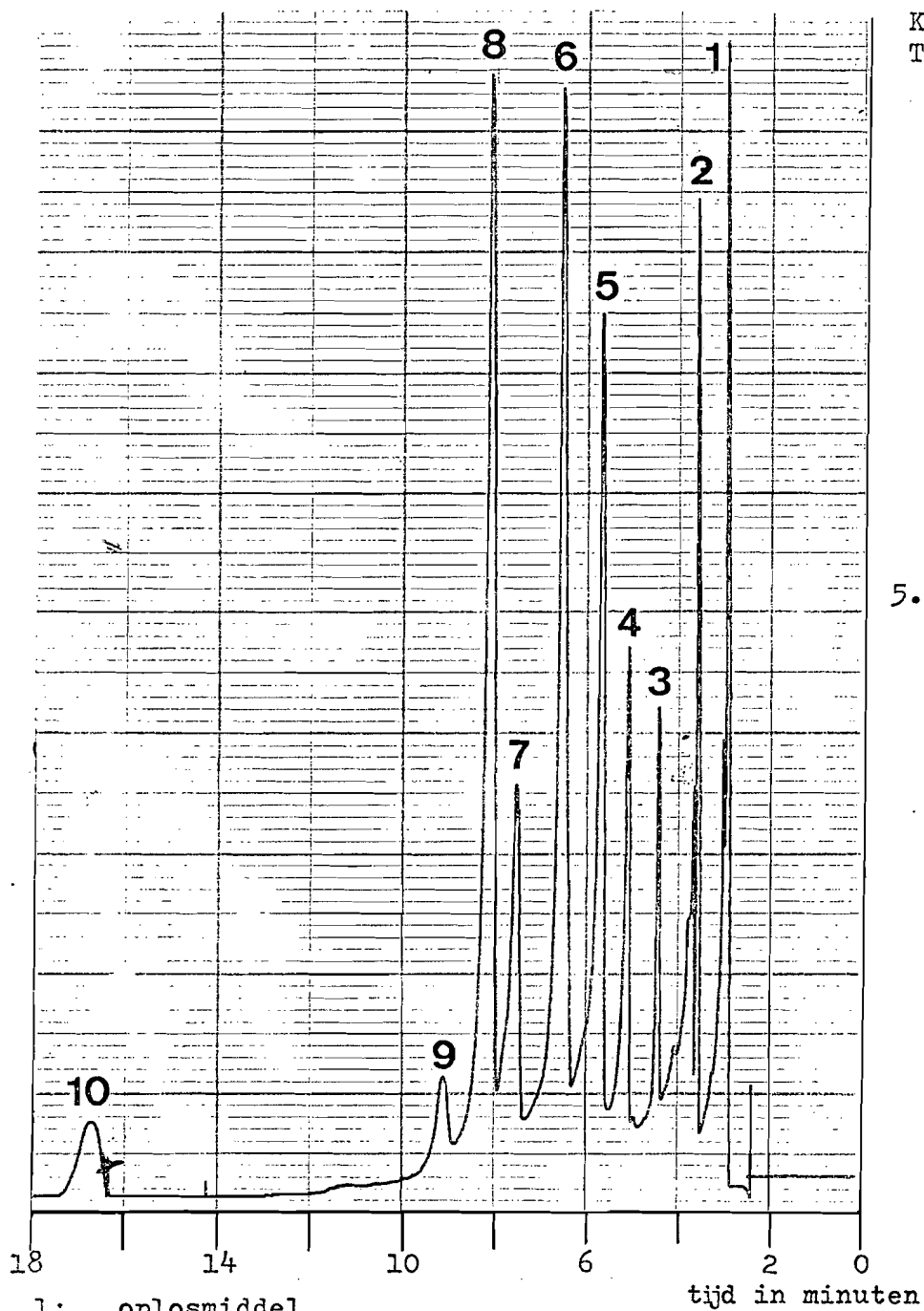
- o androsterone
- Δ 11-ketoetiocholanolone
- 11b-hydroxyandrosterone
- + estriol

N.B. op de vertikale as is uitgezet het decimale deel van het SN.

Temperatuursafhankelijkheid van de relatieve retentie.



- o androsterone
- Δ 11-ketoetiocholanolone
- 11b-hydroxyandrosterone
- + estriol



- 1: oplosmiddel
- 2: 5a-androstane
- 3: C-24
- 4: androsterone
- 5: 11-ketoetiocholanolone
- 6: 11b-hydroxyandrosterone
- 7: C-28
- 8: 5a-cholestane
- 9: Estriol
- 10: C-32

Lalgol 04162198 m snyders, 0, 1

```
begin comment RECIPILOG: plot of log(tr) versus 1/T;
  integer i, j, jmax, n;
  array x, y[- 1 : 81], alpha, beta[1 : 1], a, b[0 : 1], delta[- 1 : 1];
  library PLOTEN, ORTHOPOL, POLCOEF;

  PLOTFRAME(1.60, -1.5, 2.40, 1.5, 4000, 2500);
  PLOT(1.60, - 1.5, 2); PLOT(1.60, 1.5, 1); PLOT(2.40, 1.5, 3); PLOT(2.40, - 1.5, 3); PLOT(1.60, - 1.5, 3);
  x[- 1] := 1000/523; y[- 1] := ln(.08)/ln(10); x[81] := 1000/443; y[81] := ln(8)/ln(10);
  PLOT(x[- 1], y[81], 2); PLOT(x[81], y[81], 1); PLOT(x[81], y[- 1], 3);

  for i := 0 step 1 until 80 do y[i] := y[- 1] - .03;
  for i := 0 step 5 until 80 do y[i] := y[- 1] - .05;
  for i := 0 step 10 until 80 do y[i] := y[- 1] - .06;
  for i := 0 step 1 until 80 do begin x[i] := 1000/(443 + i); PLOT(x[i], y[- 1], 3);
    PLOT(x[i], y[i], 3); PLOT(x[i], y[- 1], 3) end;

  for i := 0 step 1 until 80 do x[i] := x[- 1] - .005;
  for i := 0 step 2 until 80 do x[i] := x[- 1] - .01; i := 0; y[0] := y[- 1];
  for i := i + 1 while y[i - 1] < - 1 do y[i] := ln(.08 + .005 × i)/ln(10); i := i - 1; j := i;
  for i := i + 1 while y[i - 1] < 0 do y[i] := ln(.1 + .05 × (i - j))/ln(10); i := i - 1; j := i;
  for i := i + 1 while y[i - 1] < y[81] do y[i] := ln(1 + .5 × (i - j))/ln(10); i := i - 1; j := i;
  for i := 0 step 1 until j do begin PLOT(x[- 1], y[i], 3);
    PLOT(x[i], y[i], 3); PLOT(x[- 1], y[i], 3) end;

  for i := j step - 2 until 0 do
ABSFI ABSFIXPLOT((x[- 1] - .034), y[i], 0, 28, 0, true, -10, 1, 2, (10 ↑ y[i]));
  for i := 0 step 10 until 80 do
ABSFI ABSFIXPLCT((1000/(523 - i) - .009), (y[- 1] - .1), 0, 28, 0, true, - 10, 3, 0, (250 - i));

  PLOTTEXT(x[- 1], (y[- 1] - .16), 0, 28, 0, true, -10, <TEMPERATURE 'C>);
  PLOTTEXT((x[- 1] - .04), y[- 1], 90, 28, 0, true, - 10, <RELATIVE RETENTION TIME>);
  PLOTTEXT((x[81] + .04), - .5, 270, 28, 0, true, 10, <M. SNYDERS, FIG 1>);
```

```

comment RECIPLOG continued;
jmax := read;
for j := 1 step 1 until jmax do
begin for i := 1 step 1 until 7 do
begin x[i] := 1000/(273 + read); y[i] := ln(read)/ln(10);
PLOTTEXT(x[i], y[i], 0, 28, 0, true, - j,  $\langle \rangle$ ) end;
ORTHOPOL(x, y, 7, n, 1, alpha, beta, a, delta, n = 1); POLCOEF(1, alpha, beta, a, b);
y[i] := b[0] + b[1] * x[i]; PLOT(x[i], y[i], 2);
for i := 1 step 1 until 7 do begin y[i] := b[0] + b[1] * x[i]; PLOT(x[i], y[i], 1) end;
end;

```

```

PLOTTEXT(1.93, .8, 0, 28, 0, true, - 1,  $\langle$  5b-ANDROSTANE  $\rangle$ );
PLOTTEXT(1.93, .7, 0, 28, 0, true, - 2,  $\langle$  5a-ANDROSTANE  $\rangle$ );
PLOTTEXT(1.93, .6, 0, 28, 0, true, - 3,  $\langle$  5b-PREGNANE  $\rangle$ );
PLOTTEXT(1.93, .5, 0, 28, 0, true, - 4,  $\langle$  5a-PREGNANE  $\rangle$ );
PLOTTEXT(1.93, .4, 0, 28, 0, true, - 5,  $\langle$  5b-CHOLESTANE  $\rangle$ );
PLOTTEXT(1.93, .3, 0, 28, 0, true, - 6,  $\langle$  5a-CHOLESTANE  $\rangle$ );
PLOTTEXT(x[81] + .04, .8, 0, 56, 0, true, 10,  $\langle$  SE-30  $\rangle$ );

```

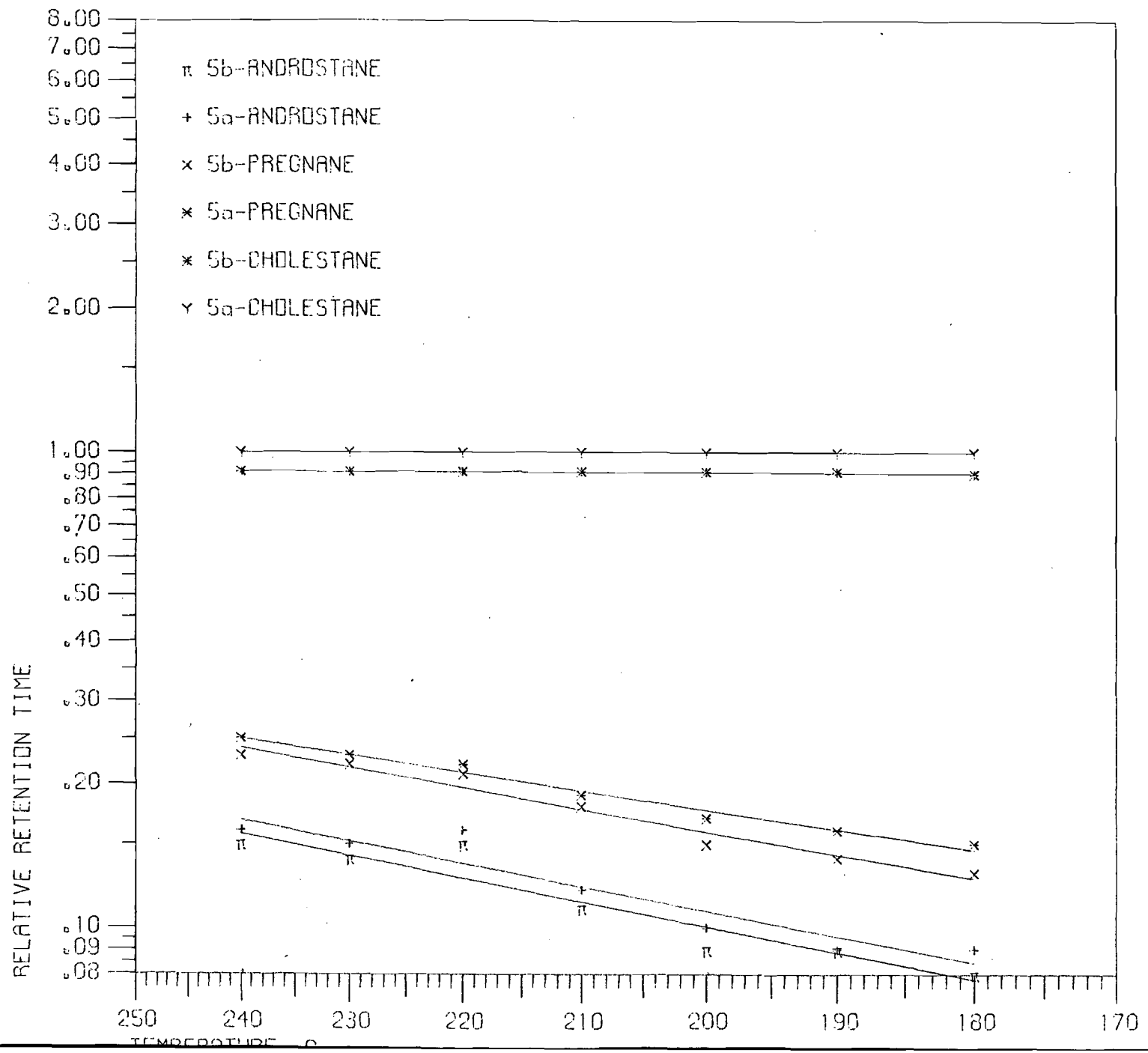
ENDPLOGOC;

end
progend

<INPUT>

6													
180	.08	190	.09	200	.09	210	.11	220	.15	230	.14	240	.15
180	.09	190	.09	200	.10	210	.12	220	.16	230	.15	240	.16
180	.13	190	.14	200	.15	210	.18	220	.21	230	.22	240	.23
180	.15	190	.16	200	.17	210	.19	220	.22	230	.23	240	.25
180	.90	190	.91	200	.91	210	.91	220	.91	230	.91	240	.91
180	1.	190	1.	200	1.	210	1.	220	1.	230	1.	240	1.

M. SNYDERS, FIG 1



Bijlage X

TABULARIUM

van relatieve retenties op QF-1, verzameld uit de literatuur.

Relative retention data of FREE ESTROGENES on QF-1

a: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00
 b: 2 perc QF-1, cholestane = 1.00
 c: 3 perc QF-1, cholestane = 1.00

d: 1 perc QF-1, androsterone = 1.00
 e: 5 perc QF-1, estrone = 1.00
 f: 5 perc QF-1, estrone-acetate = 1.00

ESTROGENES: systematic names	trivial names	temperatures:					
		180	195	233	240	247	255
estratrien-3-ol	17-deoxyestrone						0.64c
estratriene-3,17a-diol	17a-estradiol		1.54a				
estratriene-3,17b-diol	(17b-)estradiol	0.82d	1.632a		0.67e		1.8e
estratriene-2,3,17b-triol	2-hydroxyestradiol						3.5c
estratriene-3,16a,17a-triol	17-epiestriol		4.42a				
estratriene-3,16a,17b-triol	estriol	2.06d	4.30a		1.43e		3.5c
estratriene-3,16b,17b-triol	16-epiestriol		4.42a				3.6c
estratriene-2,3,16a,17b-tetrol	2-hydroxyestriol				2.53e		
	estrolactone						6.8c
estratrien-3ol-17-one	estrone	1.33d	2.63a		1.00e		2.5c
estra-1,3,5(10),7-tetraen-3-ol-17-one	equiline		2.38a				
estra-1,3,5(10),6,8(9)-pentaen-3-ol-17-one	equilenine		3.31a				
estratrien-3,4-diol-17-one	4-hydroxyestrone						4.9c
estratrien-3,16a-diol-17-one	16a-hydroxyestrone		3.66a				
estratrien-3,17b-diol-16-one	16-ketoestradiol		2.94a				
3-methoxy-estratrien-17a-ol				0.36f			
3-methoxy-estratrien-17b-ol	3-methoxyestradiol	0.58d		0.37f		0.42f	1.3c
3-methoxy-estratriene-16a,17b-diol	3-methoxyestriol	1.53d		0.74f		0.72f	
3-methoxy-estratriene-16b,17a-diol				0.74f			
3-methoxy-estratriene-16b,17b-diol				0.53f		0.51f	
3-methoxy-estratrien-17-one	3-methoxyestrone	0.89d	3.77a	0.47f		0.51f	1.8c
2-methoxy-estratrien-3-ol-17-one	2-methoxyestrone		3.76a				
3-methoxy-estratrien-16a-ol-17-one				0.75f			
2,3-dimethoxy-estratrien-17b-ol							2.0c
2,3-dimethoxy-estratrien-17-one							2.7c
2,3,17b-trimethoxy-estratriene							2.7c
3,4,17b-trimethoxy-estratriene	2-hydroxyestradiol, trimethyl ether						2.7c
3-ethoxy-estratrien-17b-ol	4-hydroxyestradiol, trimethyl ether						2.3c
3-ethoxy-estratriene-16a,17b-diol				0.40f			
3-ethoxy-estratrien-17-one				0.80f			
				0.54f			

Relative retention data of ESTROGENE-TRIMETHYLSILYL-ETHERS on QF-1

a: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00

b: 2 perc QF-1, cholestane = 1.00

c: 3 perc QF-1, cholestane = 1.00

TRIMETHYLSILYL-ETHERS of:

systematic names	trivial names	temperatures:				
		195	198	198	203	255
estratrien-3-ol	17-deoxyestrone					0.61c
estratriene-3,17a-diol	17a-estradiol		0.71b	0.77a	0.76b	
estratriene-3,17b-diol	(17b)-estradiol	0.88a	0.81b	0.87a	0.85b	0.63c
estratriene-2,3,17b-triol	2-hydroxyestradiol		1.08b			0.95c
estratriene-3,6a,17b-triol	6a-hydroxyestradiol		1.19b		1.26b	
estratriene-3,6b,17b-triol	6b-hydroxyestradiol		1.04b			
estratriene-3,7a,17b-triol	7a-hydroxyestradiol		0.89b			
estratriene-3,11b,17b-triol	11b-hydroxyestradiol		0.91b			
estratriene-3,15a,17b-triol	15a-hydroxyestradiol		1.24b			
estratriene-3,16a,17a-triol	17-epiestriol		1.39b	1.54a	1.36b	
estratriene-3,16a,17b-triol	estriol	1.57a	1.43b	1.58a	1.40b	1.50c
estratriene-3,16b,17a-triol	16,17-epiestriol		1.20b		1.20b	
estratriene-3,16b,17b-triol	16-epiestriol	1.83a	1.63b	1.84a	1.58b	
estratriene-2,3-16a,17b-tetrol	2-hydroxyestriol		1.82b			
estratriene-3,6a,16a,17b-tetrol	6a-hydroxyestriol		1.85b			
estratriene-3,15a,16a,17b-tetrol	15a-hydroxyestriol		2.56b			
estratrien-3-ol-17-one	estrolactone					1.80c
estra-1,3,5(10),7-tetraen-3-ol-17-one	estrone	1.83a	1.51b	1.83a	1.58b	1.60c
estra-1,3,5(10),6,8(9)-pentaen-3-ol-17-one	equiline		1.80b			
estratrien-3-ol-6,17-dione	equilenine		2.55b			
estratrien-3-ol-16,17-dione	6-ketoestrone		5.16b		5.30b	
estratriene-2,3-diol-17-one	16-ketoestrone		2.32b		2.32b	
estratriene-3,4-diol-17-one	2-hydroxyestrone		2.03b			
estratriene-3,6b-diol-17-one	4-hydroxyestrone					0.49c
estratriene-3,7a-diol-17-one	6b-hydroxyestrone		1.91b			
estratriene-3,11b-diol-17-one	7a-hydroxyestrone		1.81b			
estratriene-3,16a-diol-17-one	11b-hydroxyestrone		2.81b			
estratriene-3,17b-diol-6-one	16a-hydroxyestrone	2.02a	1.75b	2.02a	1.76b	
estratriene-3,17b-diol-11-one	6-ketoestradiol		2.94b		3.02b	
estratriene-3,17b-diol-16-one	11-ketoestradiol		1.67b			
3-methoxy-estratrien-17b-ol	16-ketoestradiol	2.94a	2.21b	2.94a	2.76b	
2-methoxy-estratriene-3,17b-diol						0.89c
2-methoxy-estratriene-3,16a,17b-triol	2-methoxyestradiol		1.21b		1.30b	
2-methoxy-estratrien-3-ol-17-one	2-methoxyestriol		2.04b		2.12b	
	2-methoxyestrone	2.87a	2.29b	2.88a		

Retention data of ESTRANE-ACETATES on QF-1

a: 3 perc QF-1, cholestane = 1.00
 b: 4 perc QF-1, estriol-acetate = 1.00
 c: 5 perc QF-1, estrone-acetate = 1.00

DERIVATIVES OF:		temperatures:				
systematic names	trivial names	208	233	247	255	
estratrien-3-ol	17-deoxyestrone				1.0h	
estratriene-3,17a-diol	17a-estradiol			1.09c		
estratriene-3,17b-diol	(17b-)estradiol				2.8a	(17b-acetate)
idem	idem				2.6a	(3-acetate)
idem	idem	0.458b	1.10c	1.07c	3.9a	(diacetate)
estratriene-3,16a,17a-triol	17-epiestriol			2.99c		
estratriene-3,16a,17b-triol	estriol	1.000b		2.24c		
estratriene-3,16b,17a-triol	16,17-epiestriol			2.48c		
estratriene-3,16b,17b-triol	16-epiestriol	1.563b		3.10c		
estratriene-3-ol-17-one	estrone	0.458b	1.00c	1.00c	3.9a	
estratriene-2,3-diol-17-one	2-hydroxyestrone				2.6a	
estratriene-3,16a-diol-17-one	16a-hydroxyestrone	1.092b		3.32c		
estratriene-3,16b-diol-17-one	16b-hydroxyestrone			2.57c		
estratriene-3,17b-diol-6-one	6-ketoestradiol			3.23c		
estratriene-3,17b-diol-16-one	16-ketoestradiol	1.307b		2.84c		
3-methoxy-estratrien-17a-ol			0.53c			
3-methoxy-estratrien-17b-ol			0.53c	0.54c	1.8a	
3-methoxy-estratriene-2,17b-diol					2.7a	(2-acetate)
3-methoxy-estratriene-4,17b-diol					2.0a	(4-acetate)
2,3-dimethoxy-estratrien-17b-ol					2.8a	
2-methoxy-estratrien-3-ol-17-one	2-methoxyestrone	0.739b				
3-methoxy-estratrien-16a-ol-17-one			1.16c			
3-methoxy-estratrien-16b-ol-17-one			1.24c			
3-methoxy-estratriene-16a,17a-diol			1.55c	1.41c		
3-methoxy-estratriene-16a,17b-diol			1.20c	1.06c		
3-methoxy-estratriene-16b,17a-diol			1.36c	1.30c		
3-methoxy-estratriene-16b,17b-diol			1.66c	1.50c		

Relative retention data of FREE ANDROGENES on QF-1

a: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00
 b: 3 perc QF-1, cholestane = 1.00
 c: 6 perc QF-1, cholestane = 1.00

d: 3 perc QF-1, testosterone = 1.00
 e: 5 perc QF-1, estrone = 1.00

ANDROGENES:		temperatures:							
systematic names	trivial names	195	200	210	220	225	240	250	255
5a-androstane	androstane	0.10a[190*]							
5a-androstan-3a-ol								0.48a	1.82e
5b-androstan-3a-ol			0.388a					0.50c	
5a-androstan-3b-ol			0.427a					0.54c	
5b-androstan-3b-ol								0.47a	
androst-5-en-3b-ol			0.396a						
5a-androstan-17a-ol			0.368a						
5a-androstan-17b-ol			0.388a						
androst-5-en-17b-ol			0.374a						
5b-androstane-3a,17a-diol							1.28b		
5a-androstane-3a,17b-diol								1.35c	
5b-androstane-3a,17b-diol			1.202a				1.36b	1.50c	
androst-5-ene-3b,16a-diol		1.20a							
5a-androstane-3b,16b-diol		1.26a							
androst-5-ene-3b,16b-diol		1.15a							
5a-androstane-3b,17a-diol								1.41b	
androst-5-ene-3b,17a-diol								0.53e	
5a-androstane-3b,17b-diol								1.49b	
androst-5-ene-3b,17b-diol	androstanediol	1.29a	1.344a						
5a-androstan-3-one	androstenediol	1.17a	1.242a	1.26b					
androst-4-en-3-one			0.805a						
5a-androstan-17-one			1.287a						
idem		0.60a	0.622a	0.64a		0.70a			
5a-androst-2-en-17-one			0.64a[205*]			0.66a[215*]			
5a-androstane-3,16-dione			0.631a						
androst-4-ene-3,16-dione		5.63a							
5a-androstane-3,17-dione		9.00a							
5b-androstane-3,17-dione	androstanedione	4.80a	4.649a	4.06a	4.72b		4.22b	4.8c	2.6b
androst-4-ene-3,17-dione			4.306a		4.45b		3.98b	4.3c	
androst-4-ene-3,17-dione	androstenedione	7.53a	7.247a				2.59e	6.51c	2.61e
androsta-1,4-diene-3,17-dione									5.6b
5a-androstane-3,11,17-trione			9.036a						
X 5b-androstane-3,11,17-trione			8.043a					7.3c - 7.41c	
androst-4-ene-3,11,17-trione			12.64a				4.06e		
X 5a-androstan-3a-ol-17-one	androsterone	1.96a	1.957a	2.1b				2.15b	0.80e
5b-androstan-3a-ol-17-one	etiocholanolone	2.08a	2.051a	2.18b			1.98e	2.18c	
5a-androstan-3b-ol-16-one				2.47a			2.18b		
androst-5-en-3b-ol-16-one		2.30a							
X 5a-androstan-3b-ol-17-one	epiandrosterone	2.26a	2.249a	2.36b			1.18b	2.4c	
5b-androstan-3b-ol-17-one	eptiocholanolone	1.72a					1.77b	2.0c	
androst-5-en-3b-ol-17-one	dehydroepiandrosterone [DHEA]	1.98a	1.990a	2.07b				2.15c	
androst-4-en-17a-ol-3-one	epitesterone	3.98a	3.893a						1.60e
5a-androstan-17b-ol-3-one	5a-dihydrotestosterone		2.630a				1.06e	2.85c	
5b-androstan-17b-ol-3-one	5b-dihydrotestosterone		2.422a					2.57c	
androst-4-en-17b-ol-3-one	testosterone	4.22a	4.144a				1.00d	4.15c	3.4b
androsta-1,4-dien-17b-ol-3-one	Δ1-testosterone						1.37d		
5b-androstan-3a-ol-11,17-dione	Δ1-ketoetiocholanolone		3.984a						
androst-4-en-11a-ol-3,17-dione	11a-hydroxyandrostanedione	17.9a							
androst-4-en-11b-ol-3,17-dione	11b-hydroxyandrostanedione	15.5a							
5a-androstane-3a,11b-diol-17-one	11b-hydroxyandrosterone		4.04a	2.32b					
19-nor-androst-4-en-17b-ol-3-one	19-nortestosterone								
4,5-epoxy-androstan-17b-ol-3-one	4,5-epoxytestosterone					0.88d			3.4b
1a-methyl-androst-4-en-17b-ol-3-one	1a-methyltestosterone					0.76d			
1a-methyl-androsta-1,4-dien-17b-ol-3-one	1a-methyl-Δ1-testosterone					1.07d			
17a-methyl-androst-4-en-17b-ol-3-one	17a-methyltestosterone					1.32d			
4-isopropyl-androst-4-en-17b-ol-3-one	4-isopropyltestosterone					0.72d			
						0.71d			

Relative retention data of ANDROGENS-TRIMETHYLSILYL-ETHERS on QF-1

a: 3 perc QF-1, cholestane = 1.00
 b: 1.4 perc QF-1, cholestane = 1.00
 c: 6 perc QF-1, cholestane = 1.00

d: 3 perc QF-1, testosterone-TMS = 1.00
 e: 3 pec QF-1, pregnanolone-TMS = 1.00

TRIMETHYLSILYL-ETHERS of:

systematic names	trivial names	temperatures:						
		210	212	215	222	225	250	255
androst-5-ene-3 β ,17 β -diol	androstenediol			0.57a				
5 α -androstan-3 α -ol-17-one	androsterone	0.685e	1.13a			1.25b		1.11c
5 β -androstan-3 α -ol-17-one	etiocholanolone	0.754e	1.24a			1.25b		1.22c
5 α -androstan-3 β -ol-17-one	epiandrosterone	0.952e	1.56a					
androst-5-en-3 β -ol-17-one	dehydroepiandrosterone[DHEA]	0.850e	1.40a			1.30b		
androst-4-en-17 α -ol-3-one	epitestosterone						0.79d	
androst-4-en-17 β -ol-3-one	testosterone	1.792e					1.00d	
androsta-1,4-dien-17 β -ol-3-one	Δ 1-testosterone						1.03d	
5 α -androstan-3 α -ol-11,17-dione	Δ 1-ketoandrosterone	1.435e	1.76a					
5 β -androstan-3 β -ol-11,17-dione	11-ketoetiocholanolone	1.451e	2.01a					
5 α -androstane-3 α ,11 β -diol-17-one	11 β -hydroxyandrosterone	1.343e				2.14b		
5 β -androstane-3 α ,11 β -diol-17-one	11 β -hydroxyetiocholanolone	1.452e	2.36a			2.14b		
19-nor-androst-4-en-17 β -ol-3-one	19-nortestosterone						0.86d	2.1a
1 α -methyl-androst-4-en-17 β -ol-3-one	1 α -methyltestosterone						1.24d	
1 α -methyl-androsta-1,4-dien-17 β -ol-3-one	1 α -methyl- Δ 1-testosterone						1.27d	
17 α -methyl-androst-4-en-17 β -ol-3-one	17 α -methyltestosterone						1.16d	
4-isopropyl-androst-4-en-17 β -ol-3-one	4-isopropyltestosterone						0.72d	
4,5-epoxy-androst-4-en-17 β -ol-3-one	4,5-epoxytestosterone						0.69d	

Relative retention data of ANDROGENE-ACETATES on QF-1

a: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00
 b: 3 perc QF-1, cholestane = 1.00
 c: 6 perc QF-1, cholestane = 1.00

d: 3 perc QF-1, testosterone-acetate = 1.00
 e: 1.4 perc QF-1, cholestane = 1.00

ACETATES of:		temperatures:					
systematic names	trivial names	200	220	225	237	250	255
5 α -androstan-3 α -ol							0.72e
5 β -androstan-3 β -ol							0.67e
5 α -androstan-3 α -ol							0.79e
5 β -androstan-3 β -ol							0.70e
5 α -androstane-3 α ,11 β -diol				6.6a			
5 β -androstane-3 α ,17 α -diol						2.32b	
5 β -androstane-3 α ,17 β -diol						2.81b	
5 α -androstane-3 β ,17 α -diol						3.05b	
5 α -androstane-3 β ,17 β -diol						3.25b	
5 α -androstan-3 α -ol-17-one	androstane-diol						
5 β -androstan-3 α -ol-17-one	androsterone	3.270a	3.3a			3.04b	3.30c
5 α -androstan-3 β -ol-17-one	etiocholanolone	3.083a	3.0a			2.84a	3.07c
5 β -androstan-3 β -ol-17-one	epiandrosterone					3.33c	3.5b
5 β -androstan-3 β -ol-17-one	epietiocholanolone						3.2c
androst-5-en-3 β -ol-17-one	dehydroepiandrosterone [DHEA]			3.3a			3.31c
androst-4-en-17 α -ol-3-one	epitestosterone	1.07d				0.96d	
androst-4-en-17 β -ol-3-one	testosterone	1.00d				1.00d	4.7b
androsta-1,4-dien-17 β -ol-3-one	Δ 1-testosterone					1.34d	
5 β -androstan-3 α -ol-11,17-dione	Δ 1-ketoetiocholanolone			0.64a			
19-nor-androst-4-en-17 β -ol-3-one	19-nortestosterone					0.87d	
4,5-epoxy-androstan-17 β -ol-3-one	4,5-epoxytestosterone					0.71d	
1 α -methyl-androst-4-en-17 β -ol-3-one	1 α -methyltestosterone					1.05d	
1 α -methyl-androsta-1,4-dien-17 β -ol-3-one	1 α -methyl- Δ 1-testosterone					1.25d	
17 α -methyl-androst-4-en-17 β -ol-3-one	17 α -methyltestosterone					0.64d	
4-isopropyl-androst-4-en-17 β -ol-3-one	4-isopropyltestosterone					0.71d	

Relative retention data of ANDROGENE-PROPIONATES on QF-1

column: 1.4 perc QF-1, cholestane = 1.00

DERIVATIVES OF:		temperature:
<u>systematic names</u>	<u>trivial names</u>	250
5a-androstan-3a-ol		0.80
5b-androstan-3a-ol		0.78
5a-androstan-3b-ol		0.98
5b-androstan-3b-ol		0.86
5a-androstan-3a-ol-17-one	androsterone	3.58
5b-androstan-3a-ol-17-one	etiocholanolone	3.42
5b-androstan-3b-ol-17-one	epietiocholanolone	4.37

Relative retention data of ANDROGENE-DIMETHYLHYDRAZONES on QF-1

column: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00

DIMETHYLHYDRAZONES of:		temperature:
<u>systematic names</u>	<u>trivial names</u>	210
5a-androstan-17-one		0.39
5a-androstan-3b-ol-17-one	epiandrosterone[3b-ol-17-DMH]	1.49
	[3,17-diDMH]	1.17
5a-androstane-3,17-dione	[3-DMH-17-one]	2.00

Relative retention data of FREE PREGNANES on QF-1

a: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00
 b: 3 perc QF-1, cholestane = 1.00
 c: 6 perc QF-1, cholestane = 1.00

d: 5 perc QF-1, estrone = 1.00
 e: 1.65 perc QF-1, cholestane = 1.00

PREGNANES: systematic names	trivial names	temperatures:								
		175	195	200	205	210	225	240	250	255
5a-pregnane	allopregnane	0.18a[190*]		0.206a						
5b-pregnane	pregnane			0.181a						
5a-pregnan-3a-ol				0.647a						0.75c
5b-pregnan-3a-ol				0.653a						0.77c
5a-pregnan-3b-ol				0.733a						0.83c
5b-pregnan-3b-ol				0.574a						
5a-pregnan-20a-ol				0.642a						0.78c
5a-pregnan-20b-ol				0.566a						0.71c
5b-pregnan-20b-ol										0.63c
5a-pregnane-3a,20a-diol	allopregnanediol	0.83a		2.17e	2.04b					2.09c
5b-pregnane-3a,20a-diol	pregnanediol	0.81a	1.92a	2.065a	2.26e	2.07b		1.93b		0.81d
5a-pregnane-3a,20b-diol				1.88b						1.91c
5b-pregnane-3a,20b-diol				1.90b						1.86c
X 5a-pregnane-3b,20a-diol		0.75a		1.806a	2.28e	2.30b		1.80b		2.25c
5b-pregnane-3b,20a-diol		0.90a	2.16a	2.268a	1.90e	1.93b		2.08b		2.25c
pregn-5-ene-3b,20a-diol				2.16a						1.93c
5a-pregnane-3b,20b-diol				2.06b						2.09c
5b-pregnane-3b,20b-diol		0.80a	1.94a	2.010a	2.04e	2.04b		1.91b		2.03c
pregn-5-ene-3b,20b-diol				1.67b						1.73c
5a-pregnan-3-one				1.85b						1.91c
X 5a-pregnan-11-one				1.381a						
5a-pregnan-20-one				0.536a						
5b-pregnan-20-one				0.861a						
5a-pregn-2-ene-20-one				0.779a						
5a-pregn-2-ene-11,20-dione				0.876a						
X 5a-pregnane-3,20-dione	allopregnanedione			2.330a						
idem	idem			5.93a		6.11a		5.51a 5.29a		5.85c
X 5b-pregnane-3,20-dione	pregnanedione			6.48a				5.57a[215*]		4.80b 5.31c
pregn-4-ene-3,20-dione	progesterone			10.5a				8.00b		8.51c 3.25f
X 5a-pregnane-3,11,20-trione	allopregnanetrione			5.754a						11.41c
5b-pregnane-3,11,20-trione	pregnanetrione			9.936a						11.1c
5a-pregnan-3a-ol-20-one	allopregnanolone			15.37a						2.81c
5b-pregnan-3a-ol-20-one	pregnanolone			13.38a		2.76e		2.74b		2.76c 1.06f
5a-pregnan-3b-ol-20-one				2.821a		2.88e		2.82a		2.80b
5b-pregnan-3b-ol-20-one				2.98a		3.143a		3.17e		2.80a
pregn-5-en-3b-ol-20-one				2.406a						2.49b
5a-pregnan-20a-ol-3-one	pregnenolone			2.68a		2.831a				2.66c
5b-pregnan-20a-ol-3-one								4.29b		2.73c
5a-pregnan-20b-ol-3-one								4.06b		4.37c
5b-pregnan-20b-ol-3-one								4.04b		3.89c
5a-pregn-2-en-11a-ol-20-one				3.70a		3.837a		3.49a		
5a-pregnan-3b-ol-11,20-dione				2.166a						
pregn-4-en-17a-ol-3,20-dione				8.396a		7.16a				
5a-pregnane-3a,6a-diol-20-one								10.94b		7.08c
5b-pregnane-3a,6a-diol-20-one										7.76c
16a-methyl-5a-pregn-2-ene-20-one				0.832a						
16a-methyl-5a-pregn-2-ene-11,20-dione				2.132a						

Relative retention data of PREGNANE-TRIMETHYLSILYL-ETHERS on QF-1

a: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00
 b: 3 perc QF-1, cholestane = 1.00
 c: 6 perc QF-1, cholestane = 1.00

d: 1.4 perc QF-1, cholestane = 1.00
 e: 1.65 perc QF-1, cholestane = 1.00
 f: 3 perc QF-1, pregnanolone-TMS = 1.00

TRIMETHYLSILYLETHERS of:
 systematic names

systematic names	trivial names	temperatures:						
		195	198	205	210	215	222	250
5a-pregnane-3a,20a-diol	allopregnanediol			0.88e	0.534f		1.00d	0.79c
5b-pregnane-3a,20a-diol	pregnanediol		0.96e	0.92e	0.562f			0.82c
5a-pregnane-3a,20b-diol								0.78c
5b-pregnane-3a,20b-diol								0.76c
5a-pregnane-3b,20a-diol		1.27a		1.18e				1.05c
5b-pregnane-3b,20a-diol				0.87e				
pregn-5-ene-3b,20a-diol						1.06b		
5a-pregnane-3b,20b-diol		1.13a		1.00e				1.00c
pregn-5-ene-3b,20b-diol						0.99b		
pregn-5-ene-3b,16a,20a-triol		1.81a		1.52e				
5a-pregnane-3a,17a,20a-triol	allopregnanetriol			2.12e				
5b-pregnane-3a,17a,20a-triol	pregnanetriol			2.02e	1.220f		1.94d	
pregn-5-ene-3b,17a,20a-triol				2.21e				
5a-pregnan-3a-ol-20-one	allopregnanolone			1.46e				
5b-pregnan-3a-ol-20-one	pregnanolone			1.56e	1.000f		1.51d	
5a-pregnan-3b-ol-20-one		2.04a		2.10e				
pregn-5-en-3b-ol-20-one	pregnenolone		1.81e					
5a-pregnen-20b-ol-3-one		3.04a						
5b-pregnane-3a,17a,20a-triol-11-one	11-ketopregnanetriol				1.792f		2.40d	
5b-pregnane-3a,17a,21-triol-11,20-dione	tetrahydrocortisone[THE]						2.14d	

Relative retention data of PREGNANE-PROPIONATES on QF-1

column: 6 perc QF-1, cholestane = 1.00

PROPIONATES of: systematic names	trivial names	temperature: 250
5a-pregnan-3a-ol		1.25
5b-pregnan-3a-ol		1.16 ^h
5a-pregnan-3b-ol		1.51
5a-pregnan-20a-ol		1.38
5a-pregnan-20b-ol		1.25
5b-pregnan-20b-ol		1.04
5a-pregnane-3a,20a-diol	allopregnanediol	6.17
5b-pregnane-3a,20a-diol	pregnanediol	5.82
5a-pregnane-3a,20b-diol		5.37
5b-pregnane-3a,20b-diol		5.15
5a-pregnane-3b,20a-diol		7.21
5b-pregnane-3b,20a-diol		6.03
5a-pregnane-3b,20b-diol		6.49
5b-pregnane-3b,20b-diol		5.43
5b-pregnan-3a-ol-20-one	pregnanolone	4.13

Relative retention data of PREGNANE-TRIFLUORO-ACETATES on QF-1

column: 1.65 perc QF-1, cholestane = 1.00

TRIFLUORO-ACETATES of: systematic names	trivial names	temperature: 205
5a-pregnane-3a,20a-diol	allopregnanediol	1.86
5b-pregnane-3a,20a-diol	pregnanediol	1.97
5a-pregnane-3b,20a-diol		2.28
5b-pregnane-3b,20a-diol		1.83
5a-pregnane-3b,20b-diol		2.08
5a-pregnan-3a-ol-20-one	allopregnanolone	2.45
5b-pregnan-3a-ol-20-one	pregnanolone	2.50
5a-pregnan-3b-ol-20-one		3.27

Relative retention data of PREGNANE-DIMETHYLHYDRAZONES on QF-1

column: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00

DIMETHYLHYDRAZONES of:

<u>systematic names</u>	<u>trivial names</u>	<u>temperature:</u>
5a-pregnane-3,20-dione	allopregnanedione[3-DMH-20-one]	2.84
5a-pregnane-3,20-dione	idem[3,20-diDMH]	1.97
5a-pregnan-20b-ol-3-one		1.90
5a-pregnan-3b-ol-20-one		1.92
5a-pregnan-3b-ol-11,20-dione	[11-One-20-DMH]	5.10

Re

Relative retention data of CORTICO-STEROID-BUTYRATES on QF-1

column: 3 perc QF-1, aldosterone-butyrates = 1.00

BUTYRATES of:

systematic names	trivial names	r:
pregn-4-ene-3,20-dione	progesterone	0.23
pregn-5-en-3 β -ol-20-one	pregnenolone	0.20
pregn-4-en-17 α -ol-3,20-dione	17 α -hydroxyprogesterone	0.31
pregn-4-en-17 β -ol-3,20-dione	17 β -hydroxyprogesterone	0.39
pregn-4-en-21-ol-3,20-dione	deoxycorticosterone	0.20
pregn-4-en-21-ol-3,11,20-trione	dehydrocorticosterone	0.29
pregn-4-ene-11 β ,21-diol-3,20-dione	corticosterone	0.29
pregn-4-ene-17 α ,21-diol-3,20-dione	11-deoxycortisol	0.39
pregn-4-ene-18,21-diol-3,20-dione	18-hydroxydeoxycorticosterone	0.78
pregn-4-ene-11 β ,21-diol-18-al-3,20-dione	aldosterone	1.00
pregn-4-ene-17 α ,21-diol-3,11,20-trione	cortisone	0.55
pregn-4-ene-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dione	cortisol	0.55

Relative retention data of CHOLANES on QF-1

column: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00

CHOLANES: systematic names	temperature: 200
5a-cholane	0.475
5b-cholane	0.431
5a-cholan-12a-ol	1.096
5b-cholan-12b-ol	0.958
5a-cholan-12-one	1.857
5b-cholan-12-one	1.581

Relative retention data of n-ALKANES on QF-1

column: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00

n-ALKANES: systematic names	temperature: 190
n-tetracosane(C-24)	0.20
n-octacosane(C-28)	0.69

Relative retention data of FREE CHOLESTANES on QF-1

a: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00
 b: 1.5 perc QF-1, cholestane = 1.00

c: 6 perc QF-1, cholestane = 1.00
 d: 5 perc QF-1, estrone = 1.00

CHOLESTANES:		temperatures:							
systematic names	trivial names	187	193	195	200	202	205	240	250
[C27-steroids]									
5a-cholestane	cholestane	1.00a	1.00b	1.00a	1.000a	1.00a			1.00c
5b-cholestane	coprostanane	0.90a			0.897a				
cholest-2-ene	Δ^2 -cholestane				1.006a				
cholest-5-ene	Δ^5 -cholestane	0.98a			0.967a				
5a-cholestan-3a-ol	epicholestanol	3.18a		3.18a	3.237a				
5b-cholestan-3a-ol	epicoprostanol	3.30a			3.240a				2.88c
cholest-5-en-3a-ol	epicholesterol	3.28a							
5a-cholestan-3b-ol	cholestanol	3.70a	3.63b	3.70a	3.662a	3.36a			3.03c
idem				3.48a					
5b-cholestan-3b-ol	coprostanol	2.89a	3.27b		2.829a				2.40c
cholest-5-en-3b-ol	cholesterol	3.39a	3.34b	3.39a	3.327a	3.08a	3.14a	1.08d	1.06d
	psi-cholesterol	2.60a							
	epi-psi-cholesterol	2.54a							
5a-cholest-7-en-3b-ol	lathosterol		3.93b				3.61a		
5a-cholest-8(14)-en-3b-ol	$\Delta^8(14)$ -cholestanol		3.27b						
5a-cholest-14-en-3b-ol	Δ^{14} -cholestanol		3.27b						
cholesta-5,22-dien-3b-ol			2.90b						
cholesta-5,24-dien-3b-ol	desmosterol		3.86b				3.38a		
5a-cholesta-7,22-dien-3b-ol			3.43b						
5a-cholestan-3-one	cholestanone	7.30a		6.67a	6.953a		6.12a		
idem				6.77a					
5b-cholestan-3-one	coprostanone				6.277a		5.66a		
cholest-4-en-3-one					11.25a		9.65a		
cholest-5-en-3-one					11.18a				
3b-methoxy-5a-cholestane	methoxycholestanol			2.31a			2.28a	2.14a[215 ¹]	
idem				2.42a				2.02a[225 ¹]	
20,25-diaza-cholesterol							3.50a		
[C28-steroids]									
24a-methyl-5a-cholestan-3b-ol	campestanol		4.57b				4.62a		
24b-methyl-5a-cholestan-3b-ol	ergostanol(tetrahydrobrassicasterol)						4.62a		
24a-methyl-cholest-5-en-3b-ol	campesterol		4.23b				4.18a		
24b-methyl-5a-cholest-8(14)-en-3b-ol	$\Delta^8(14)$ ergostenol		4.23b						
24a-methyl-cholesta-5,7-dien-3b-ol	$\Delta^5,7$ -campestadien-3b-ol		5.03b						
24b-methyl-cholesta-5,22-dien-3b-ol	brassicasterol		3.57b				3.47a		
24b-methyl-cholesta-5,24-dien-3b-ol	$\Delta^5,24$ -ergostadienol		4.70b						
24-methyl-cholesta-5,24(28)-dien-3b-ol	24-methylene-cholesterol		4.30b						
24b-methyl-cholesta-7,22-dien-3b-ol	$\Delta^7,22$ -ergostadienol		4.17b						
24b-methyl-cholesta-5,7,22-trien-3b-ol	ergosterol(24b)	4.35a	2.73b						
[C29-steroids]									
24b-ethyl-5a-cholestan-3b-ol	stigmastanol		5.67b						
24a-ethyl-cholest-5-en-3b-ol	beta-sitosterol(24a)		5.24b						
24b-ethyl-cholest-5-en-3b-ol	beta-sitosterol						5.15a		
24b-ethyl-5a-cholest-7-en-3b-ol	Δ^7 -stigmastenol		6.26b						
24b-ethyl-cholesta-5,7-dien-3b-ol	$\Delta^5,7$ -stigmastadienol		6.14b						
24a-ethyl-cholesta-5,22-dien-3b-ol	stigmasterol(24a)		4.46b						
24b-ethyl-cholesta-5,22-dien-3b-ol	stigmasterol						4.36a		
24-ethyl-cholesta-5,24(28)-dien-3b-ol	fucoasterol		5.30b						
24a-ethyl-5a-cholesta-7,22-dien-3b-ol	alpha-spinasterol(24a)		5.16b						
24b-ethyl-5a-cholesta-7,22-dien-3b-ol	chondrillasterol		5.20b						
24b-ethyl-5a-cholesta-7,25-dien-3b-ol	$\Delta^7,25$ -stigmastadienol		6.00b						
24b-ethyl-5a-cholesta-7,22,25-trien-3b-ol	$\Delta^7,22,25$ -stigmatatrienol		5.36b						

Relative retention data of CHOLESTANE-ACETATES on QF-1

a: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00

b: 6 perc QF-1, cholestane = 1.00

ACETATES of:

systematic names

trivial names

temperatures:

187 195 200 205 250

systematic names	trivial names	187	195	200	205	250
5a-cholestan-3a-ol	epicholestanol			5.18a		
5b-cholestan-3a-ol	epicoprostanol			4.18a		3.64b
5a-cholestan-3b-ol	cholestanol	5.73a	5.76a	5.718a		4.36b
5b-cholestan-3b-ol	coprostanol			4.90a		3.80b
cholest-4-en-3b-ol		11.9a				
cholest-5-en-3b-ol	cholesterol	5.54a			5.24a	
cholesta-5,24-dien-3b-ol	desmosterol				5.79a	

Relative retention data of CHOLESTANE-PROPIONATES on QF-1

column: 6 perc QF-1, cholestane = 1.00

PROPIONATES of:

systematic names

trivial names

temperature:

250

systematic names	trivial names	250
5b-cholestan-3a-ol	epicoprostanol	4.19
5a-cholestan-3b-ol	cholestanol	5.16
5b-cholestan-3b-ol	coprostanol	4.40

Relative retention data of CHOLESTANE-TRIFLUORO-ACETATES on QF-1

column: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00

DERIVATIVE OF: systematic names	trivial names	temperature: 195
5a-cholestan-3b-ol	cholestanol	3.23

Relative retention data of CHOLESTANE-DIMETHYLHYDRAZONES on QF-1

column: 1 perc QF-1, cholestane = 1.00

DIMETHYLHYDRAZONES of: systematic names	trivial names	temperature: 210
5a-cholestan-3-one	cholestanone	3.32
5b-cholestan-3-one	coprostanone	2.89
cholest-4-en-3-one		4.16

