

Untersuchung der Steroide im Blut mit der Kombination Glaskapillargaschromatographie-Massenspektrometrie

Helga Ludwig, Josef Reiner und Gerhard Spiteller*

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen,
Tammannstraße 2, D-3400 Göttingen

Eingegangen am 21. April 1976

Die Kombination Glaskapillargaschromatographie-Massenspektrometrie wurde zur Untersuchung von Steroiden aus Blutproben angewandt. Dabei konnten zehn bisher als Blutinhaltsstoffe unbekannte Steroide identifiziert werden: 3α -Hydroxy-5-androsten-17-on, 3,17-Dihydroxy-5-androsten-7-on, 3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on, 6,17-Dihydroxy-4-androsten-3-on, 3,7,17-Trihydroxy-5-androsten (zwei Isomere), 3,16,17-Trihydroxy-androstan (drei Isomere) und 3,16,20-Trihydroxy-5-pregnen.

Investigation of the Steroids in Blood with the Combination Glass Capillary Column Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Glass capillary column gas chromatography-mass spectrometry was applied for the investigation of steroids in blood samples. Ten so far as components of blood unknown steroids were detected and characterized: 3α -hydroxy-5-androsten-17-one, 3,17-dihydroxy-5-androsten-7-one, 3,7-dihydroxy-5-androsten-17-one, 6,17-dihydroxy-4-androsten-3-one, 3,7,17-trihydroxy-5-androstene (two isomers), 3,16,17-trihydroxy-androstane (three isomers), and 3,16,20-trihydroxy-5-pregnene.

Blutsteroide werden heute hauptsächlich durch Radioisotopenanalyse bestimmt. Leider können mit dieser Methode nur einzelne Steroide erfaßt werden¹⁾. In vielen Fällen ist es aber wünschenswert, möglichst alle im Blut vorkommenden Steroide quantitativ zu analysieren, da auch ihre Relation zueinander von Bedeutung sein kann.

Die gleichzeitige Erfassung aller im Blut enthaltenen Steroide ist außerordentlich schwierig, weil sie mit Ausnahme des Cholesterins nur in Spuren vorliegen. Cholesterin, Fettsäuren, Fette und Proteine, die mengenmäßig die Gesamtheit aller übrigen Steroide um ein Vielfachtausendfaches übertreffen, müssen nahezu vollständig abgetrennt werden, wobei die Spurensteroide verlorengehen können.

Erste richtungsweisende Versuche zur Untersuchung von Blutsteroiden verdanken wir der Arbeitsgruppe *Sjövall*^{2,3)}, die die im Blut vorhandenen Steroidkonjugate zunächst in Glucuronide, Monosulfate und Disulfate fraktionierte, dann die Konjugate verseifte und schließlich die trimethylsilylierten Steroide an einer gepackten Säule gaschromatographisch auftrennte und massenspektrometrisch identifizierte. Dieses Verfahren leidet unter dem Nachteil, daß Steroide mit ähnlichen Retentionszeiten nicht mehr aufgetrennt werden können und eine eindeutige Messung vor allem der Spurensteroide nicht mehr gelingt.

¹⁾ G. E. Abraham, *Anal. Lett.* **5**, 915 (1972).

²⁾ J. Sjövall, K. Sjövall und R. Viikko, *Steroids* **11**, 703 (1968).

³⁾ O. Jänne, R. Viikko, J. Sjövall und K. Sjövall, *Clin. Chim. Acta* **23**, 405 (1969).

In jüngster Zeit ist das gaschromatographische Trennverfahren durch Anwendung von Kapillarsäulen wesentlich verbessert worden⁴⁾. Wir haben nun diese Methode erstmals zur Untersuchung von Blutsteroiden und zur Erstellung von Profilen angewandt. Es ist uns damit gelungen, eine Reihe von Steroiden, deren Vorkommen im Blut bisher unbekannt war, aufzufinden. Da sich die Methode auch für eine halbquantitative Erfassung der Steroide, mit Ausnahme der Corticoide, eignet, ist die Möglichkeit gegeben, Unterschiede im Blutsteroidspiegel von Gesunden und Kranken festzustellen.

Blutplasma wurde in Anlehnung an das *Sjövallesche* Verfahren aufgearbeitet. Da der größte Teil der Steroide – mit Ausnahme des Cholesterins – in Form von Sulfaten vorliegt, wurden vorzugsweise die Sulfatfraktionen untersucht. Der Trennungsgang wurde mit einem radioaktiven Steroid, dem [$7\text{-}^3\text{H}$]Dehydroepiandrosteron-sulfat, Ammoniumsalz, auf Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate kontrolliert und entsprechend modifiziert.

Zunächst stellten wir fest, daß beim Ausfällen der Proteine²⁾ mit organischen Lösungsmitteln bereits zu Beginn des Aufarbeitungsverfahrens ca. 60% des radioaktiven Steroids verlorengehen. Die Wiederfindungsrate läßt sich aber auf ca. 90% erhöhen, wenn man das Plasma – um ein Ausfallen der Proteine zu verhindern – mit physiologischer Kochsalzlösung auf das Zehnfache verdünnt⁵⁾ und dann die Steroide an XAD-4 zusammen mit Begleitstoffen wie Cholesterin, Fetten und Fettsäuren von Proteinen und Salzen abtrennt^{6,7)}. Während man so die Monosulfatfraktion mit nur geringen Verlusten gewinnen kann, gehen beim Waschen des XAD-4 mit Wasser Disulfate – und damit ein erheblicher Anteil der Corticosteroide – verloren⁸⁾.

An Sephadex-LH-20 wurden die Steroidkonjugate anschließend in Glucuronide, Monosulfate und in Disulfate fraktioniert²⁾. Daraufhin wurden die Sulfatfraktionen mit Helicase enzymatisch verseift⁹⁾. Allerdings verläuft diese Reaktion nicht quantitativ, so daß eine Nachverseifung nach *Burstein* und *Lieberman* nötig war¹⁰⁾. In den meisten Fällen enthielten die sauer und enzymatisch verseiften Fraktionen noch größere Mengen an Fettsäuren, die entweder an Sephadex nicht abgetrennt worden waren oder aus saurer und enzymatisch verseiften Glyceriden stammten (käufliche Helicase enthält geringe Mengen an Esterase). Die freien Fettsäuren konnten an DEAP-LH-20^{11,12)}, einem schwach basischen Ionenaustauscher auf Sephadexbasis, quantitativ abgetrennt werden. Die sauer verseifte Steroidfraktion enthielt noch viel Cholesterin, das an Lipidex®-5000 entfernt wurde¹²⁾.

Die freien Steroide der drei Fraktionen wurden dann an Kieselgel von unpolaren Begleitstoffen befreit. Da freie Steroide zu stark in gaschromatographischen Säulen

⁴⁾ D. Henneberg, U. Henrichs und G. Schomburg, *J. Chromatogr.* **112**, 343 (1969); G. Alexander und G. A. F. M. Rutten, *Chromatographia* **6**, 231 (1973); J. Chromatogr. **99**, 81 (1974); G. Schomburg, H. Husmann und F. Weeke, *J. Chromatogr.* **99**, 63 (1974); K. Grob, *Chromatographia* **7**, 94 (1974).

⁵⁾ H. Dengler, persönliche Mitteil.

⁶⁾ H. L. Bradlow, *Steroids* **11**, 265 (1968).

⁷⁾ G. Machata und W. Vycudilik, *Arch. Toxicol.* **33**, 115 (1975).

⁸⁾ M. Matsui, M. Hakozaki und Y. Kinuyama, *J. Chromatogr.* **115**, 625 (1975).

⁹⁾ C. G. Beling, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, Suppl. **79**, 46 (1963).

¹⁰⁾ S. Burstein und S. Lieberman, *J. Biol. Chem.* **233**, 331 (1958).

¹¹⁾ B. Almé und E. Nyström, *J. Chromatogr.* **59**, 45 (1971).

¹²⁾ M. Axelson und J. Sjövall, *J. Steroid Biochem.* **5**, 1 (1974).

adsorbiert werden und schlechte Trenneigenschaften zeigen, wurden sie zur Analyse in der Kombination Glaskapillargaschromatograph-Massenspektrometer mit 2,2,2-Trifluor-*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)acetamid in die Trimethylsilylether übergeführt und schließlich an ihren Massenspektren identifiziert.

Aufnahme von „Profilen“: Anschließend an die Messung in der Kombination Glaskapillargaschromatograph-Massenspektrometer wurde von jeder Fraktion ein zweites Glaskapillargaschromatogramm aufgenommen, um so wenigstens halbquantitative Aussagen machen zu können. Die quantitative Erfassung der Steroide an Glaskapillarsäulen ist allerdings sehr problematisch, da man immer wieder Schwankungen bis zu 20% beobachtet.

Charakterisierung durch Retentionsindices: In einem dritten Glaskapillargaschromatogramm wurden unter Zusatz von Kohlenwasserstoffen Retentionsindices ermittelt, weil nur eine Kombination von Massenspektren und Retentionsindices bei vielen isomeren Verbindungen eine eindeutige Charakterisierung erlaubt.

Aus den Massenspektren ist es in vielen Fällen möglich, die Positionen der Hydroxylgruppen am Ringsystem, nicht aber ihre Konfiguration zu ermitteln. Da sich die Retentionszeiten von Steroiden, deren Hydroxylgruppen die gleichen Positionen besetzen, aber unterschiedliche Konfigurationen aufweisen, deutlich im Glaskapillargaschromatogramm unterscheiden^{13,14)}, wurden dem aus Blut isolierten Steroidgemisch nach der Derivatisierung Steroid-trimethylsilylether bekannter Struktur zugesetzt.

Die Koinjektion mit Steroidsilylethern hat den Vorteil, daß die Auswertung der Chromatogramme von nahezu unvermeidlichen Meßschwankungen unabhängig ist. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die notwendige häufige Wiederholung der Messungen, um in den verschiedenen Glaskapillargaschromatogrammen die Steroide eindeutig zuordnen zu können. Die Retentionsindices der Steroid-trimethylsilylether wurden auf die unverzweigten Kohlenwasserstoffe C₂₄H₅₀ und C₃₂H₆₆ bezogen. Der Fehler bei der Bestimmung der Retentionsindices beträgt annähernd 0.5%.

Ergebnisse

1) Monosulfatfraktionen

a) Das Glaskapillargaschromatogramm (Abb. 1) zeigt eine enzymatisch verseifte Monosulfatfraktion, die aus 1 Liter Plasma von männlichen und weiblichen Spendern erhalten wurde.

Die im Glaskapillargaschromatogramm angezeigten Peaks sind mit Laufzahlen versehen, die den in Tab. 1 angeführten Steroiden entsprechen. Zusätzlich werden die Retentionsindices der Steroid-trimethylsilylether und der Vergleichsverbindungen angegeben. (Verbindungen mit derselben Laufzahl (ohne Index a, b, c...) entsprechen in allen Gaschromatogrammen denselben Steroiden und werden deshalb nicht in jeder Tabelle aufgeführt.)

¹³⁾ K. B. Eik-Nes und E. C. Horning, Gas Phase Chromatography of Steroids, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York 1968.

¹⁴⁾ J. A. Luyten und G. A. F. M. Rutten, J. Chromatogr. 91, 393 (1974).

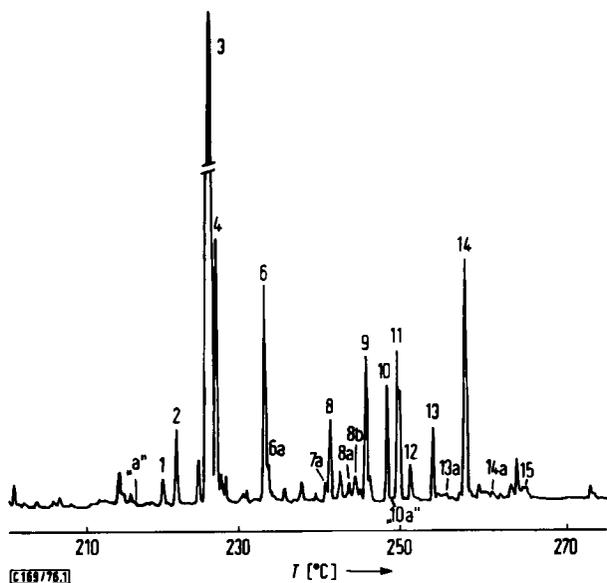


Abb. 1. Glaskapillargaschromatogramm der Steroid-trimethylsilylether der enzymatisch verseiften Steroid-monosulfat-Fraktion aus 1 Liter Blutplasma verschiedener Personen. (Einzelheiten s. exp. Teil)

Massenspektren, die von Steroiden sehr kleiner Konzentration im Gemisch (sehr kleinen Gaschromatogramm-Peaks entsprechend, z. B. von 3,16,20-Trihydroxy-5-pregnen, einer bisher als Blutkomponente noch unbekanntem Verbindung) aufgenommen wurden, sind meist sehr intensitätsschwach. Ihre Identifizierung wird durch in Spuren vorhandene Begleitstoffe oder das Säulenmaterial sehr erschwert. Oft erhält man auch Spektren, die auf ein Gemisch äquivalenter Mengen mehrerer Verbindungen schließen lassen. Häufig lassen sich in diesen Fällen Rückschlüsse auf die Struktur nur durch Messung der Retentionsindices der Steroid-trimethylsilylether ziehen.

Welche Möglichkeiten und Grenzen die Methode bei der Erfassung von Steroidspuren mit der Glaskapillargaschromatograph-Massenspektrometer-Kopplung bietet, möge am Beispiel des in Abb. 2 reproduzierten Massenspektrums demonstriert sein:

Nach dem Spektrum müßte man annehmen, daß eine Verbindung der Molekülmasse 548 vorliegt. Aus der Gegenwart des Peaks der Masse 460 ergibt sich aber eindeutig, daß die Hauptkomponente die Masse 550 hat, denn eine Abspaltung eines 88 Masseneinheiten schweren Teilchens ist bei Steroid-trimethylsilylethern nicht möglich. Der Peak der Masse 548 muß also von einer Beimengung stammen, ebenso können die mit einem Stern bezeichneten Peaks Verunreinigungen zugeordnet werden.

Dies zeigt, daß es auch mit Glaskapillarsäulen, die mit SE 30 belegt sind, nicht immer möglich ist, Verbindungen fast gleicher Retentionszeit und wenig unterschiedlicher Molekülmassen aufzutrennen. Die Herstellung von Säulen mit polaren Phasen, beispielsweise OV 17, stößt aber immer noch auf Schwierigkeiten.

Tab. 1. Retentionsindices der im Chromatogramm der Abb. 1 getrennten Steroid-trimethylsilyl-ether und entsprechender Vergleichsverbindungen

Nr.	Name	Mol.-Masse des TMS- Ethers	Reten- tions- index (SE 30)	Reten- tions- index der Vergleichs- verbindung (SE 30)
„a“	3 α -Hydroxy-5-androsten-17-on	360	2428	2428
1	3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-on	362	2446	
2	3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on	362	2472	
3	3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on	360	2526	2525
4	3 β -Hydroxy-5 α -androstan-17-on	362	2544	
6	3 β ,17 β -Dihydroxy-5-androsten	434	2632	
6a	3 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstan	436	2638	2638
7a	3,16-Dihydroxy-5-androsten-17-on	448	2748	
8	3 β ,16 α -Dihydroxy-5-androsten-17-on ^{*)}	448	2762	2764
8a	Hydroxyandrostendion	374		
8b	3,20-Dihydroxy-5-pregnen-on	550		
9	3,16,17-Trihydroxy-5-androsten	522		
10	3 β ,20 α -Dihydroxy-5-pregnen ^{*)}	462	2858	2860
„10a“	3,16,17-Trihydroxy-androstan	524	2867	
11	3 β ,16 α ,17 β -Trihydroxy-5-androsten ^{*)}	522	2878	2880
12	3,16,20-Trihydroxy-5-pregnen	550	2902	
13	3 β ,17 α ,20 α -Trihydroxy-pregnan	480	2948	
13a	6(?),20-Dihydroxy-4-pregnen-3-on	476		
14	3 β ,17 α ,20 α -Trihydroxy-5-pregnen ^{*)}	478	3017	3020
14a	x,x,20-Trihydroxy-pregnen-on	494		
15	3 β -Hydroxy-5-cholesten	458	3134	

^{*)} Diese Steroide wurden zusätzlich durch Koinjektion von entsprechenden TMS-Ethern gaschromatographisch identifiziert.



Abb. 2. Massenspektrum von 3,16,20-Trihydroxy-5-pregnen-tris(trimethylsilyl)ether

Aus der Molekülmasse ist zu folgern, daß ein Trihydroxypregnen vorliegen muß. Das Problem ist die Lokalisierung der funktionellen Gruppen:

Der Peak bei $m/e = 117$ weist auf ein Pregnen hin, das in Stellung 20 eine trimethylsilylierte Hydroxylgruppe besitzt¹⁵⁾. Er entspricht den C-Atomen 20 und 21. Die beiden Peaks bei $m/e = 156$ und 157 sind charakteristisch für eine trimethylsilylierte 16,20-Dihydroxypregnan-Struktur und entsprechen den C-Atomen 15, 16, 17, 20 und 21 mit einer trimethylsilylierten Hydroxylgruppe in Stellung 20 unter Abspaltung der funktionellen Gruppe in Stellung 16¹⁶⁾. Diese Schlußfolgerung wird untermauert durch einen Peak der Masse 141, entsprechend dem Verlust von CH_3 aus dem Ion der Masse 156.

Der Peak bei $m/e = 129$ spricht für ein Steroid, das in 3-Stellung eine trimethylsilylierte Hydroxylgruppe und eine Δ^5 -Doppelbindung enthält¹⁷⁾. Die übrigen Peaks in dem Spektrum stammen offenbar von Beimengungen.

Spurensteroiden können bei der Registrierung der Glaskapillargaschromatogramme wie in Abb. 1 nicht gefunden werden, da die Peaks zu wenig intensiv sind. Trotzdem ist ihr Nachweis und die Ableitung einer Teilstruktur möglich, wenn entweder diese Spurensteroiden aufwendig angereichert oder die Säulen mit hohen Dosen des vollständigen Gemisches belastet werden, so daß auch noch von Spurensteroiden auswertbare Massenspektren erhältlich sind. Mit der letzten Methode konnte in der oben beschriebenen Fraktion der Monosulfate ein 3,16,17-Trihydroxy-androstan mit dem Retentionsindex $I = 2867$ identifiziert werden. In dem Glaskapillargaschromatogramm (Abb. 1) wird diese Verbindung nicht mehr durch einen Peak angezeigt, da ihre Konzentration im Vergleich zu der der Hauptkomponenten zu gering ist. Dem Retentionsindex nach müßte dieses Steroid zwischen Peak 10 und 11 eingeordnet werden.

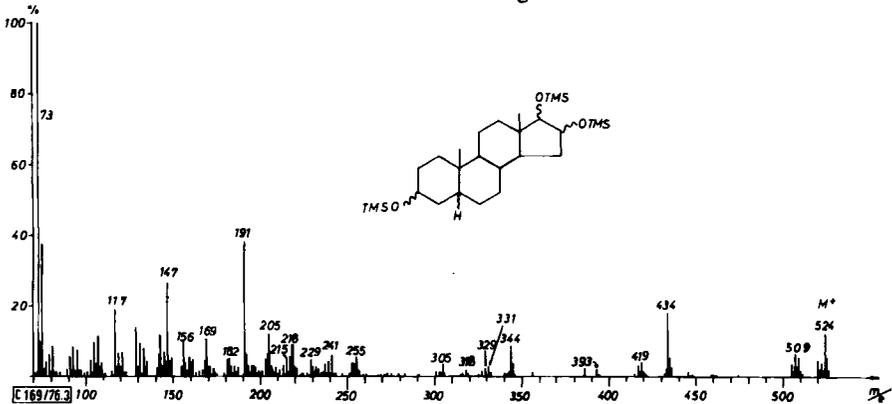


Abb. 3. Massenspektrum von 3,16,17-Trihydroxyandrostan-tris(trimethylsilyl)ether

Das Massenspektrum (Abb. 3) zeigt eine dreimalige Trimethylsilanol-Abspaltung, gefolgt von einer CH_3 -Eliminierung, an. Das Auftreten der Ionen der Masse 147 und 191 ist für Verbindungen mit vicinalen Trimethylsilylgruppen charakteristisch¹⁸⁾. 3,16,17-

¹⁵⁾ J. Sjövall und R. Vihko, *Steroids* 7, 447 (1966).

¹⁶⁾ J. A. Gustafsson, C. H. L. Shackleton und J. Sjövall, *Eur. J. Biochem.* 10, 302 (1969).

¹⁷⁾ C. W. Brooks, *Org. Mass Spectrom.* 7, 925 (1973).

¹⁸⁾ J. A. Gustafsson, R. Ryhage, J. Sjövall und R. M. Moriarty, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 1234 (1969).

Trihydroxyandrostane, die kürzlich von *H. Grote* in unserem Arbeitskreis dargestellt wurden, zeigten eine große Übereinstimmung ihrer TMS-Ether-Spektren mit dem in Abb. 3 reproduzierten Spektrum: In allen ist ein Ion der Masse 318 vorhanden, das dem Verlust von C-16 und C-17 entspricht, ebenso ein Ion der Masse 305, das die Abspaltung der C-Atome 15–17 anzeigt und durch Verlust der 3-ständigen Trimethylsilylgruppe zu einem Fragment der Masse 215 zerfällt. Typisch für solche Verbindungen ist auch das Ion der Masse 331, das durch Abspaltung von C-17 und zwei Trimethylsilylethergruppen entsteht. Es zerfällt weiter durch den Verlust von Trimethylsilanol zum Ion der Masse 241.

Eine Unterscheidung der Isomeren gelingt nur durch Messung der Retentionsindices. In unserem Fall konnte die Konfiguration des 3,16,17-Trihydroxyandrostans nicht ermittelt werden.

Tab. 2. Retentionsindices von 3,16,17-Trihydroxyandrostanen und Hydroxyandrostanon

3,16,17-Trihydroxyandrostan	Retent.-Index (SE 30)	Hydroxyandrostanon	Retent.-Index (SE 30)
$\alpha\alpha\beta$ -5 α	2800	3 α -Hydroxy-5-androsten-17-on	2428
$\beta\alpha\beta$ -5 α	2892	3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on	2525
$\beta\beta\beta$ -5 β	2712	17 α -Hydroxy-4-androsten-3-on	2593
$\beta\alpha\beta$ -5 β	2778	17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on	2643
$\alpha\alpha\beta$ -5 β	2788	Peak „a“	2428
$\alpha\beta\beta$ -5 β	2830		
Peak „10a“	2867		

Als weiterer neuer Blutinhaltsstoff konnte 3 α -Hydroxy-5-androsten-17-on identifiziert werden (Peak „a“). Da die Spektren der Trimethylsilylether der Isomeren 3 β -Hydroxy-

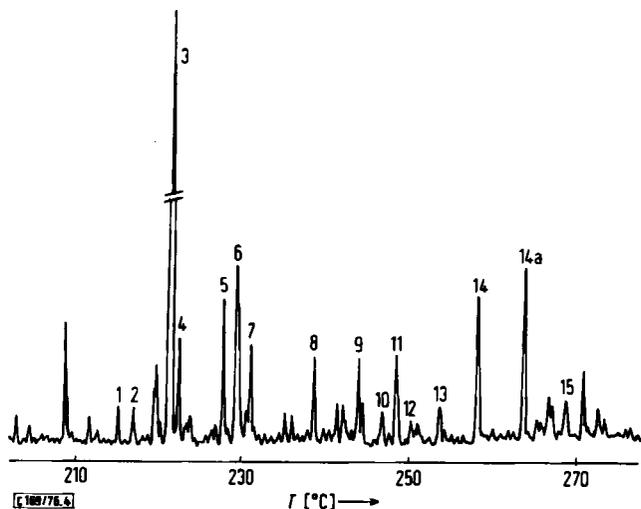


Abb. 4. Glaskapillargaschromatogramm der Steroid-trimethylsilylether der enzymatisch ver-seiften Steroid-monosulfat-Fraktion aus 40 ml Plasma einer Frau

5-androsten-17-on (DHEA), 17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on (Testosteron), 17 α -Hydroxy-4-androsten-3-on (Epi-testosteron) und 3 α -Hydroxy-5-androsten-17-on sehr ähnlich sind, war zur Identifizierung wieder eine Bestimmung der Retentionsindices erforderlich.

b) Dem Glaskapillargaschromatogramm des gepoolten Plasmas ist in Abb. 4 das Chromatogramm einer Einzelprobe aus 40 ml Plasma einer Frau gegenübergestellt. Die Steroide des Plasmapools und die Einzelprobe unterscheiden sich erheblich voneinander. Routineuntersuchungen sind notwendig, um diese Unterschiede mit bestimmten Körperzuständen zu korrelieren. Es ist wahrscheinlich, daß diese Unterschiede in Zukunft nach der noch notwendigen Verbesserung des Aufarbeitungsverfahrens zur Diagnosestellung von Steroidstoffwechselkrankheiten herangezogen werden können. In unserem Arbeitskreis ist dies H. Egger^{18a)} im Falle des Hirsutismus erfolgreich gelungen, worüber an anderer Stelle berichtet wird.

Die in der Einzelprobe zusätzlich identifizierten Steroide sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Tab. 3. In der Einzelprobe von Abb. 4 gegenüber dem gepoolten Plasma (Abb. 1) zusätzlich identifizierte Steroide

Nr.	Name	Mol.-Masse des TMS- Ethers	Reten- tions- index (SE 30)	Reten- tions- index der Vergleichs- verbindung (SE 30)
5	3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on (Enol)	432	2610	
7	3 β -Hydroxy-5 α -androstan-11,17-dion	448	2654	2652
14a	(unidentifiziertes Pregnanderivat)		3074	

2) Disulfatfraktionen

Die Gaschromatogramme der Disulfatfraktionen gleichen in ihrer qualitativen Zusammensetzung denen der Monosulfatfraktionen, zumal häufig Monosulfate in die Disulfatfraktion eingeschleppt werden.

Die identifizierten Steroide sind in Tab. 4 aufgeführt. Unbekannt waren bisher zwei weitere Isomere des 3,16,17-Trihydroxy-androstans, wovon eines dem Retentionsindex nach mit 3 α ,16 α ,17 β -Trihydroxy-5 α -androstan identisch sein könnte.

Tab. 4. Retentionsindices der im Chromatogramm der Abb. 5 getrennten Steroid-trimethylsilyl-ether und entsprechender Vergleichsverbindungen

Nr.	Name	Mol.- Masse	Retentions- index (SE-30)	Retentions- index des Vergleichs- steroids
6a	Dihydroxy-4-androsten-3-on	448	2654	
6b	3,16,17-Trihydroxyandrostan	524	2668	
8a	3,16,17-Trihydroxyandrostan	524	2798	2800
P	Dioctylphthalat			

^{18a)} H.-J. Egger, J. Reiner, G. Spiteller und R. Häftele, Clin. Chim. Acta (im Druck).

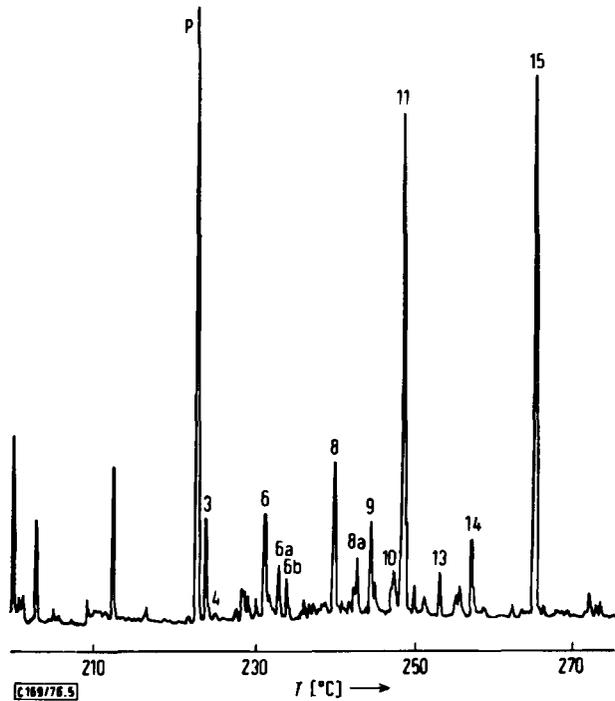


Abb. 5. Steroid-disulfat-Fraktion aus 250 ml Plasma eines Mannes

3) Weitere neue Blutsteroide

Im Zuge mehrerer Aufarbeitungen nach dem Trennungsgang der Steroidsulfate wurden noch fünf weitere Steroide mit der Glaskapillargaschromatograph-Massenspektrometer-Kopplung identifiziert, die bisher als Blutinhaltsstoffe noch nicht bekannt waren (Tab. 5).

Tab. 5. Retentionsindices von bisher als Blutinhaltsstoffen unbekanntem Steroiden als TMS-Ether

Name	Mol.-Masse	Retentionsindex (SE 30)
3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on ^{*)}	448	2614
3,7-Dihydroxy-5-androsten-17-on ^{*)}	448	2672
3,17-Dihydroxy-5-androsten-7-on	448	2871
6,17-Dihydroxy-4-androsten-3-on	448	2708
3,7,17-Trihydroxy-5-androsten	522	2656
3,7,17-Trihydroxy-5-androsten	522	2794

^{*)} Bekannt ist im Blut 3 β ,7 α -Dihydroxy-5-androsten-17-on¹⁹⁾.

¹⁹⁾ L. Starka und R. Hampe, *Naturwissenschaften* **51**, 164 (1964).

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* sowie dem *Fonds der Chemischen Industrie* für die Unterstützung der Arbeit durch Sachbeihilfen. Ein weiterer Teil der Arbeit wurde aus Toto-Lotto-Mitteln unterstützt, dafür danken wir dem *Land Niedersachsen*. Der Firma *LKB*, Stockholm, danken wir für die leihweise Überlassung des *LKB-Massenspektrometers* mit Rechner.

Experimenteller Teil

I. Verwendete Geräte

a) Die Trennung der Steroid-trimethylsilylether und die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit einem *LKB 2091-Massenspektrometer* und einem *LKB 2130-Datensystem* (mit *PDP-11-Rechner*), Ionisierungsenergie 70 eV. Der TIC wurde bei 20 eV registriert. 25-m-Glaskapillarsäule (Innendurchmesser 0,3 mm, SE-30-Dünnsfilm), 2 ml He/min, Injektortemp. 275°C, Säulentemp. von 120–300°C, mit 3°C/min programmiert.

b) Die Glaskapillargaschromatogramme und Retentionsindices der TMS-Ether wurden an einem *Carlo Erba 2300-Gaschromatographen* gemessen. Detektor FID, Injektortemp. 275°C, Temperaturprogramm 120–300°C, mit 2°C/min programmiert; Dünnsfilmglaskapillarsäule (20 m, 0,3 mm Innendurchmesser) belegt nach statischer Methode²⁰⁾. Es wurde *Alkaliglas* (*Hilgenberg-Glas*, *Malsfeld*) verwendet, Kapillarsäulenziehgerät: *Hupe und Busch*.

c) Die Szintillationsmessungen wurden mit einem *Tri-Carb 3380-Flüssigkeitsszintillationszähler* von *Packard* bei einer Zähldauer von 10 min durchgeführt. Als Szintillationslösung wurde in *Toluol/Ethanol* gelöstes *2,5-Diphenyloxazol (PPO)* und *1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)benzol (POPOP)* verwendet.

II. *Isolierung der Steroidsulfate aus Blutplasma*: 1 Liter Plasma, mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10 Liter verdünnt⁵⁾, wurde bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 100 ml/h über eine *XAD-4-Säule* (300 g) (*Serva*, *Heidelberg*) gegeben. Das Säulenmaterial wurde mit 2 Liter Wasser gewaschen, und die adsorbierten Stoffe wurden mit 1 Liter Methanol eluiert. Der i. Vak. getrocknete Methanolextrakt wurde an *Sephadex-LH-20* (4 g) (*Pharmacia Chemicals*, *Uppsala*) mit dem Laufmittelsystem *Methanol/Chloroform* (1:1), dem 0,01 mol NaCl zugesetzt wurde, bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 4 ml/h in drei Fraktionen getrennt. Die Steroidglucuronide und Begleitstoffe wurden in einem Volumen von 0–29 ml, die Steroidmonosulfate von 30–65 ml, die Disulfate von 66–250 ml eluiert. Die Mono- und Disulfatfraktionen wurden mit je 20 ml Acetatpuffer, der auf pH 4,7 eingestellt war, versetzt und mit 0,2 ml einer Lösung von β -Glucuronidase/Arylsulfate (*Boehringer*, *Mannheim*) 3 Tage bei 37°C verseift. Die freien Steroide wurden durch dreimalige Extraktion mit je 50 ml Essigester gewonnen. Die wäßrigen Phasen der Essigesterextraktion wurden vereinigt und nochmals zur Gewinnung der unverseiften Sulfate über eine *XAD-4-Säule* gegeben (100 g). Nach dem Entsalzen (200 ml Wasser) wurde mit 100 ml Methanol eluiert und der Rückstand nach *Burstein* und *Lieberman*¹⁰⁾ mit H_2SO_4 -angesäuertem Essigester (20 ml) 24 h bei 39°C behandelt. Nach Neutralisation der Schwefelsäure mit $NaHCO_3$ wurde der Essigester i. Vak. entfernt.

Alle verseiften Fraktionen wurden mit dem Laufmittelsystem *Methanol/Chloroform/Wasser* (9:2:1) an *DEAP-LH-20* (8 g) (hergestellt aus *Sephadex-LH-20*)¹¹⁾ bei einer Durchflußrate von 4 ml/h von Fettsäuren befreit¹²⁾.

Mit demselben Laufmittelsystem wurde Cholesterin von den sauer verseiften Steroidgemischen an *Lipidex®-5000* (5 g) (*Packard*, *Zürich*) mit einer Durchflußrate von 5 ml/h abgetrennt¹²⁾.

Jede Probe wurde auf eine in Benzol aufgeschlammte Kieselgelsäule (200 mg) in dem Lauf-

²⁰⁾ J. Bouche und M. Verzele, *J. Chromatogr.* **6**, 501 (1968).

mittelsystem Benzol/Essigester (95:5) aufgetragen²¹⁾. Unpolare Verbindungen konnten mit 30 ml dieses Laufmittels entfernt werden. Nach dem Wechsel des Laufmittels wurden polare Substanzen mit 30 ml Essigester extrahiert. Der Essigesterextrakt wurde in 10 µl Methanol gelöst, davon wurden 2/3 nach der Trimethylsilylierung zur massenspektrometrischen Analyse in der GC-MS-Kopplung verwendet, und 1/3 der Probe wurde zur Aufnahme der Glaskapillargaschromatogramme verwendet.

III. *Überprüfung des Aufbereitungsverfahrens mit [7-³H]Dehydroepiandrosteron-sulfat, Ammoniumsalz*: Zu je 100 ml Plasma wurden jeweils 0.05 µCi [7-³H]Dehydroepiandrosteron-sulfat, Ammoniumsalz (entsprechend 111400 Ipm) (NEN New England Nuclear Chemicals, Frankfurt) und 30 µg unmarkiertes Dehydroepiandrosteron-sulfat zugefügt. Dreimal wurde das Aufbereitungsverfahren mit dem tritierten Steroid durchgeführt. Nach jeder Trennstufe wurde die restliche Radioaktivität mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Somit konnten für jeden Aufarbeitungsschritt drei Meßwerte erhalten werden, die gemittelt wurden.

Die Adsorption und anschließende Elution des radioaktiven Steroids an XAD-4 verlief mit 90% Wiederfindungsrate, dagegen bei Ausfällung der Proteine mit organischen Lösungsmitteln nur mit 40%. 85% der Radioaktivität, die nach der Abtrennung des Eiweißes noch vorhanden war, konnten nach der Sephadextrennung gemessen werden, weitere 75% der restlichen Aktivität nach der enzymatischen Verseifung und folgenden Extraktion des markierten Steroids. Die Abtrennung der Fettsäuren an DEAP-LH-20 erbrachte eine Wiederfindungsrate von 85%, die Entfernung von unpolaren Verbindungen an Kieselgel dann durchschnittlich 70%.

Obwohl jeder Trennschritt mit einer Wiederfindungsrate von 70–90% verlief, gingen in dem 5stufigen Trennungsgang ca. 65% der eingesetzten Radioaktivität verloren. Wurde das Aufbereitungsverfahren nur mit reiner radioaktiver Substanz ohne Blutplasma simuliert, lag die Wiederfindungsrate jeder Trennstufe um durchschnittlich 10% höher. Wir nehmen an, daß der Verlust des markierten Steroids im Trennungsgang mit Zusatz von Plasma auf Blutbestandteile hoher Konzentration zurückzuführen ist, die die Wiederfindung des tritierten DHEA erheblich stören.

IV. *Herstellung der Trimethylsilylether*: Die Proben wurden in Methanol aufgenommen, in kleinen Reaktionsröhrchen nach Entfernen des Lösungsmittels mit 3 µl 2,2,2-Trifluor-*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)acetamid (Macherey und Nagel, Düren) versetzt. Die Röhrchen wurden zugeschmolzen und 24 h bei Raumtemp. belassen. Das Reaktionsgemisch wurde ohne weitere Aufarbeitung in der GC-MS-Kopplung untersucht.

²¹⁾ R. Vihko und O. Jänne in Gaschromatography of Hormone Steroids (R. Scholler, Paris 1967, Proceedings of the Round Table Conference).