

## Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung einer direkten Kombination Gaschromatograph—hochauflösendes Massenspektrometer bei der Untersuchung von in biologischen Materialien vorkommenden Steroiden

Von

Klaus Kaiser, Hugo Obermann, Gerd Remberg,  
Margot Spitteler-Friedmann\* und Gerhard Spitteler\*

Mit 14 Abbildungen

(Eingegangen am 3. November 1969)

Die Kombination eines Gaschromatographen mit einem hochauflösenden Massenspektrometer kann bei der Untersuchung von Steroidgemischen, die aus biologischen Materialien isoliert wurden, rasche Information über sonst kaum nachweisbare Steroidmetaboliten liefern. Die Erfassungsgrenze liegt bei etwa 1  $\gamma$ .

Freie Steroide zeigen strukturspezifischere Spektren als ihre Trimethylsilylderivate, so daß, wenn immer möglich, auf eine Silylierung zur gaschromatographischen Trennung verzichtet werden sollte. Ist wegen der Schwerflüchtigkeit der Verbindung eine Derivatbildung notwendig, so ist die Umwandlung von Hydroxysteroiden in entsprechende Ketosteroide in den meisten Fällen einer Trimethylsilylierung vorzuziehen.

Umsetzungen können im Gemisch ausgeführt werden, so daß zumindest eine teilweise Strukturaufklärung ohne Reinisolierung der Probe mit Mengen von 10 bis 20  $\gamma$  möglich ist.

*Possibilities and Limitations of Using a Direct Combination of Gas Chromatograph—High Resolution Mass Spectrometer in the Study of Naturally Occurring Steroids*

The combination of a gaschromatograph with a high resolution mass spectrometer may provide in the investigation of steroids, isolated from natural sources, fast information about otherwise barely detectable minor steroid metabolites. The limit of detection is about 1  $\gamma$ .

Free steroids show more structure specific spectra than their corresponding trimethylsilyl derivatives. Therefore the preparation of trimethylsilyl derivatives for the purpose of gaschromatographic separation should be avoided if possible. If low volatility necessitates the preparation of a derivative, in

---

\* Herrn Prof. Dr. F. Kuffner zum 65. Geburtstag gewidmet.

most cases the preparation of keto derivatives from hydroxy-steroids should be preferred to the preparation of trimethylsilyl ethers.

Reactions can be carried out with the mixture, so that—without preparation of pure samples—at least partial structure determinations are possible with 10—20  $\gamma$ .

## Einleitung

Verbesserte Trenn- und Nachweisverfahren führten in den letzten Jahren zur Auffindung zahlreicher Stoffwechselprodukte von Steroiden in biologischen Materialien<sup>1</sup>.

Neben der Säulenchromatographie<sup>2</sup> hat sich insbesondere die Gaschromatographie als wirksame Trennmethode bewährt<sup>3</sup>. In der Regel werden nach säulenchromatographischer Vortrennung Steroidgemische enthaltende Fraktionen zur Erhöhung der Flüchtigkeit und wegen besserer Trennbarkeit in ihre Trimethylsilyläther übergeführt und diese dann gaschromatographisch getrennt. Die Messung der Retentionszeiten an einer einzigen Säule ist zur Identifizierung oft nicht ausreichend, so daß häufig zur eindeutigen Charakterisierung weitere Meßdaten (etwa durch Aufnahme von IR- oder UV-Spektren) nötig sind.

Viele Verbindungen sind durch Aufnahme des Massenspektrums, wozu Mengen unter 1  $\gamma$  ausreichen, ausgezeichnet charakterisierbar, außerdem ergeben sich meist auch aus dem Spektrum unbekannter Verbindungen wertvolle Strukturhinweise.

Eine Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie, bei der die aus der Säule austretenden Fraktionen nach Passieren eines Separators zur Entfernung des Trägergases direkt in das Massenspektrometer eingeleitet werden<sup>4</sup>, hat sich daher bei der Untersuchung von komplexen Naturstoffgemischen als sehr vorteilhaft erwiesen<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> R. I. Dorfman und F. Ungar, „Metabolism of Steroid-Hormones“, Academic Press, New York 1965.

<sup>2</sup> I. E. Bush, „The Chromatography of Steroids“, Pergamon Press, Oxford 1961.

<sup>3</sup> J. K. Grant, „The Gas Liquid Chromatography of Steroids“, Cambridge, University Press 1967; W. J. A. Van den Heuvel und E. C. Horning in: „Biomedical Applications of Gas Chromatography“, Plenum Press, New York 1964 (Ed. H. A. Szymanski), S. 89; H. H. Wotiz und S. J. Clark „Gas Chromatography in the Analysis of Steroid Hormones“, Plenum Press, New York 1966.

<sup>4</sup> a) R. Ryhage, Anal. Chem. **36**, 759 (1964); b) J. T. Watson und K. Bie-mann, Anal. Chem. **36**, 1135 (1964).

<sup>5</sup> Übersicht: H. Kienitz, „Massenspektrometrie“, S. 591. Verlag Chemie, Weinheim 1968.

Dieses Verfahren wurde von *Ryhage* und *Sjövall*<sup>6</sup> in den letzten Jahren auch in die Untersuchung von Steroidmetaboliten nach vorhergehender Trimethylsilylierung der Probe (zur Erhöhung der Flüchtigkeit) eingeführt.

Untersuchungen über den massenspektrometrischen Abbau der Trimethylsilyläther einfacher Hydroxysteroiden<sup>7</sup> zeigten, daß die Spektren dieser Verbindungen in vielen Fällen eine Lokalisierung der funktionellen Gruppen, die vor allem bei der Untersuchung unbekannter Steroide wichtig ist, häufig nicht zulassen: Neben den oft nur schwach ausgeprägten Spitzen der Molekülionen treten in den Spektren der Trimethylsilyläther von Monohydroxysteroiden im wesentlichen Ionen bei  $M-15$  (Verlust von  $\text{CH}_3 \cdot$ ),  $M-90$  (Verlust von Trimethylsilanol),  $MZ\ 73$  [ $(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$ ] und  $75$  [ $(\text{CH}_3)_2\text{SiOH}^+$ ] auf, in den Spektren der Trimethylsilyläther von Di- und Trihydroxysteroiden auch solche, die dem Verlust von 2 bzw. 3 Molekülen Trimethylsilanol entsprechen. Auftretende Schlüsselbruchstücke lassen ihre Herkunft häufig nicht klar erkennen. Außerdem wird gelegentlich eine Wanderung von Trimethylsilylresten beobachtet<sup>8</sup>.

Dazu kommt, daß die Trimethylsilylierung vor allem von Polyhydroxysteroiden, die gleichzeitig noch Carbonylgruppen tragen, unter Umständen Schwierigkeiten bereiten kann: Je nach Art und Stellung der Hydroxylgruppen sind sehr unterschiedliche Reaktionsbedingungen zur Umsetzung erforderlich. Glatt trimethylsilylierbar sind zwar 3-Hydroxysteroiden, dagegen gelingt beispielsweise die Trimethylsilylierung von 11-Hydroxysteroiden und Steroiden, die tertiäre Hydroxylgruppen besitzen, oft nur unter verschärften Bedingungen. Unter solchen Bedingungen wird aber bereits Reaktion von Ketogruppen zu Trimethylsilyläthern ihrer Enolform beobachtet<sup>9</sup>.

### Eigene Untersuchungsergebnisse

Die Schwierigkeiten bei der Darstellung der Trimethylsilyläther und vor allem die unbefriedigenden Resultate bei der Auswertung der Spektren veranlaßten uns, Stoffwechselprodukte von Steroiden unter Verzicht auf Einführung von Schutzgruppen durch Kombination der Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie zu untersuchen. Die Spektren freier Steroide sind nämlich im Gegensatz zu ihren Trimethyl-

<sup>6</sup> *P. Eneroth, K. Hellström und R. Ryhage, J. Lipid Res. 5, 245 (1964); Steroids 6, 707 (1965) und spätere Arbeiten; P. Eneroth, B. Gordon, R. Ryhage und J. Sjövall, J. Lipid Res. 7, 511 (1966); J. Sjövall und R. Vihko, Steroids 7, 447 (1966) und spätere Arbeiten.*

<sup>7</sup> *J. Diekman und C. Djerassi, J. Org. Chem. 32, 1005 (1967); W. Hölzel, Diplomarbeit, Göttingen 1968.*

<sup>8</sup> *J. A. Gustafsson, R. Ryhage, J. Sjövall und R. M. Moriarty, J. Amer. chem. Soc. 91, 1234 (1969).*

<sup>9</sup> *W. Vetter, W. Walther, M. Vecchi und M. Cereghetti, Helv. chim. Acta 52, 1 (1969).*

silyläthern häufig durch die Gegenwart strukturspezifischer Bruchstücke gekennzeichnet<sup>10</sup>. Bei Vorliegen entsprechenden Vergleichsmaterials gelingt in vielen Fällen selbst eine Unterscheidung sterischer Isomerer<sup>11, 12</sup>.

Die Gefahr einer thermischen Zersetzung einfacher Steroide ist nicht sehr groß: Mono-, Di- und Trihydroxysteroiden, in denen die Hydroxylgruppen nicht tertiär sind, lassen sich im allgemeinen auch ohne vorherige Einführung von Schutzgruppen im Gaschromatographen zersetzungsfrei trennen. Bei höher substituierten Verbindungen, wie Corticosteroiden, tritt allerdings häufig Zersetzung ein, doch ist für diese auch durch Trimethylsilylierung allein kein ausreichender Schutz möglich.

Gegebenenfalls kann thermische Zersetzung im Gaschromatographen durch Vergleich der erhaltenen Spektren mit Gemischspektren, die vor der gaschromatographischen Trennung aufgenommen wurden, erkannt werden: Wenn nach der gaschromatographischen Trennung gegenüber den Ausgangsverbindungen zu geringe Molekulargewichte gefunden werden — z. B. würde ein Unterschied von 18 ME Dehydratisierung anzeigen —, muß mit einer Zersetzung der Probe gerechnet werden. In diesem Fall ist eine Wiederholung des Gaschromatogramms nach Derivatbildung angezeigt.

Zur Zeit ist die massenspektrometrische Untersuchung freier Steroide aus biologischen Materialien durch das Fehlen der nötigen Vergleichspektren stark behindert. Die Identifizierung bereits bekannter Verbindungen ist daher nicht immer oder nur über Umwege möglich und erfordert oft das gleiche Vorgehen wie bei der Strukturermittlung unbekannter Steroide. Die genaue Massenbestimmung von Molekülonen und Spaltstücken durch Hochauflösung ist dementsprechend in vielen Fällen sehr hilfreich, insbesondere dann, wenn die geringe Menge der isolierten Produkte für andere Untersuchungsverfahren nicht ausreicht.

Da zur Registrierung der Spektren von Eluaten eines Gaschromatographen nur kurze Zeit zur Verfügung steht, müssen die hochaufgelösten Spektren auf Photoplatten registriert werden. Die auf ihnen gespeicherten Angaben über Masse und Intensität der Ionen wurden bisher mit einem Densitometer bestimmt und daraus mit Hilfe einer Rechenanlage eine „element map“ hergestellt, aus der dann die für die Auswertung notwendigen Bruchstücke erst herausgesucht werden müssen<sup>13</sup>.

<sup>10</sup> M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, Fortschr. chem. Forsch. **12**, 440 (1969).

<sup>11</sup> H. Budzikiewicz und C. Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 1430 (1962).

<sup>12</sup> H. Egger und G. Spiteller, Mh. Chem. **97**, 579 (1966).

<sup>13</sup> J. T. Watson und K. Biemann, Analyt. Chem. **37**, 844 (1965).

Wir sind nicht in der Lage, ein derartig kostspieliges Verfahren einsetzen zu können und wenden daher eine einfachere Methode an, die in unserem Falle ebenfalls rasch die gewünschten Ergebnisse liefert:

Jedes Gaschromatogramm wird zweifach aufgenommen: Beim ersten Durchlauf werden von den durch Messung des Totalionenstromes am Gaschromatogramm angezeigten Fraktionen Massenspektren bei einer

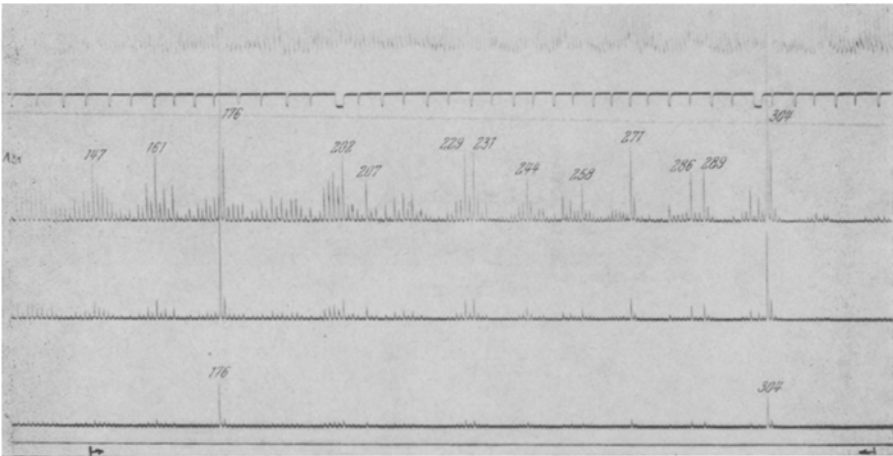


Abb. 1. Ausschnitt aus einem mit Schnellschreiber auf UV-empfindlichem Papier registrierten Spektrum. Das Spektrum wurde in 4 verschiedenen Empfindlichkeitsbereichen registriert. Auf der zweiten Spur wurde zur Erleichterung des Auszählens mit einem Massenmarkierer jede 5. Masse angezeigt

Auflösung von etwa 1500 (10% Tal) mit einem Schnellschreiber aufgenommen. Ein Ausschnitt aus einem derartigen Spektrum ist in Abb. 1 reproduziert.

Daran schließt sich die Aufnahme eines zweiten Gaschromatogramms derselben Probe, bei dem nun die Spektren der Fraktionen bei hoher Auflösung (12 000—15 000, 10% Tal) auf einer Photoplatte registriert werden (Abb. 2).

In vielen Fällen ist eine Identifizierung der mit dem Schnellschreiber aufgenommenen Spektren möglich. Nur wenn dies nicht gelingt, greifen wir auf das Photoplattenspektrum zurück. Wir werten nun aber keineswegs das gesamte Photoplattenspektrum aus, sondern vermessen mit einem Mikroskop lediglich die Linien von Schlüsselbruchstücken, die wir aus dem mit niedriger Auflösung aufgenommenen Schnellschreiberpektrum herausgesucht haben. In der Regel sind nicht mehr als 3—5 Massebestimmungen auszuführen, die in etwa 10 Min. bewältigt werden können.

Je nach der Intensität der vermessenen Linien liegt der Meßfehler zwischen 2 und 10 ppm. Diese Meßgenauigkeit ist völlig ausreichend zur Ermittlung von Bruttoformeln, die, wie die der Steroide, nur C, H und O enthalten.

Durch dieses Auswählen von Spektren und das Heraussuchen von Schlüsselbruchstücken aus selektierten Spektren vor einer genauen Massebestimmung vermeiden wir das Mitschleppen der gesamten Fülle der für eine Strukturaufklärung kaum oder gar nicht brauchbaren Daten ohne erheblichen Zeitverlust gegenüber einer aufwendigen automatischen Spektrenauswertanlage.



Abb. 2. Ausschnitt aus einem Photoplattenspektrum. Das Spektrum zeigt den Molekülionbereich mehrerer im Gaschromatogramm getrennter Fraktionen

Untersuchungen an Vergleichsmischungen (s. exper. Teil) ergaben, daß eine Proportionalität zwischen aufgegebener Probenmenge und GC-Peakhöhe nur bis zu einer Konzentration von etwa 1  $\gamma$  Probe gewährleistet ist. Offenbar haben die Gaschromatographensäule und der Separator auch bei sorgfältigster Silanisierung einen Eigenverbrauch von einigen  $10^{-7}$  g.

Dem Vorteil, kleine Probenmengen erfassen zu können, steht der Nachteil gegenüber, daß bisweilen die mit dem Schnellschreiber registrierten Spektren erhebliche Unterschiede gegenüber Standardspektren aufweisen (Abb. 3a und 3b):

Es läßt sich meist kaum vermeiden, daß die Registrierung des Spektrums an der Flanke eines GC-Peaks erfolgt, also bei nicht konstantem Dampfdruck.

Eine Verschlechterung der Qualität der Spektren wird weiter durch Untergrund bedingt: Aus der Säule wird stationäre Phase eluiert, aus dem Massenspektrometer kommt Untergrund von Quecksilber (aus den Pumpen stammend) hinzu. Weiterer Untergrund ist auf nicht völlig abgepumpte Vorfraktionen zurückzuführen. In Abb. 1 zeigen beispielsweise Spitzen bei den Massenzahlen 198—202 Quecksilber, bei den Massenzahlen 133, 207 und 281 stationäre Phase und bei den Massen-

zahlen 300 und 302 Beimengungen an. Je kleiner die Probenmengen und je höher die Temperaturen sind, um so störender macht sich der Untergrund bemerkbar.

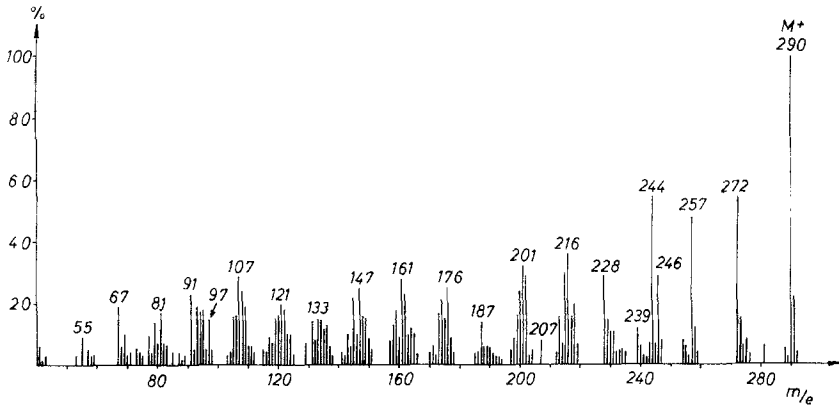


Abb. 3 a. Massenspektrum des 5 $\beta$ -Androsterons, mit einem Kombinationsgerät (SM 1 B) bei anwachsendem Dampfdruck aufgenommen

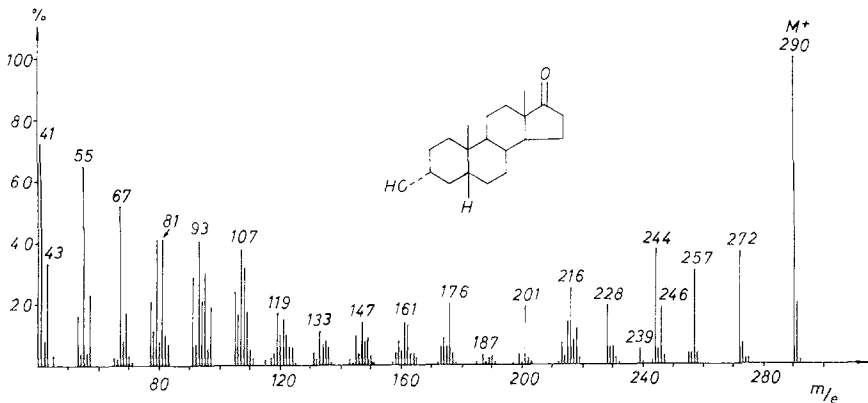


Abb. 3 b. Standardspektrum des 5 $\beta$ -Androsterons, aufgenommen mit einem CH-4-Gerät

Die thermische Anregung der Moleküle im Kombinationsgerät steigert die Zerfallsrate der Molekülionen und primären Bruchstücke, wodurch ebenfalls Abweichungen gegenüber Standardspektren beobachtet werden. Diesem Effekt wirkt ein Diskriminierungseffekt der Registrier-einrichtung entgegen, der eine zu geringe Intensitätsanzeige der Ionen im unteren Massenbereich vortäuscht. Der durch erhöhte thermische Anregung bedingte Intensitätsanstieg der Ionen im niederen Massenbereich kann dadurch oft überkompensiert werden. Da es schwierig ist, das

Gewicht der einzelnen Effekte gegeneinander abzuwiegen, wird die Identifizierung bekannter Steroide mit Hilfe von Standardspektren erschwert.

Wesentlich besser mit Standardspektren stimmen Spektren überein, die im diskontinuierlichen Betrieb durch Auffangen der Einzelfraktionen und spätere Spektrenaufnahme erhalten werden. In diesem Fall ist eine Verdampfung bei konstantem Druck und eine Aufnahme des Spektrums ohne Diskriminierungserscheinungen möglich. Überdies zeigen die Spektren viel weniger Untergrund; vor allem keine Spitzen, die von der stationären Phase herrühren (s. dazu Abb. 10a und 10b). Allerdings sind bei dieser Arbeitsweise weit größere Probenmengen (mindestens 10  $\gamma$  pro Komponente) erforderlich und auch der Zeitaufwand zur Bearbeitung eines Chromatogramms ist erheblich größer. Trotz der beschriebenen Nachteile läßt sich daher der Einsatz von Kombinationsgeräten bei der Untersuchung kleinster Probenmengen nicht umgehen.

Die Kenntnis der durch Hochauflösung erhältlichen Bruttoformeln von Schlüsselbruchstücken erleichtert zwar die Spektrenauswertung, ist jedoch für eine Strukturableitung meist noch nicht ausreichend.

Sind nur kleinste Substanzmengen vorhanden, so ist es zweckmäßig, chemische und massenspektrometrische Abbaureaktionen zu kombinieren. Falls Gemische mit nicht mehr als 3—5 Komponenten vorliegen, ist eine Umsetzung ohne vorherige Trennung des Gemisches möglich: Nach der gaschromatographischen Trennung der Reaktionsprodukte im Kombinationsgerät zeigen die Massenspektren an, ob überhaupt Umsetzungen erfolgten und wie sie verlaufen sind. Aus dem Auftreten neuer Schlüsselbruchstücke ergeben sich Hinweise über vorhandene Strukturelemente. Für eine Umsetzung sind in der Regel 10—15  $\gamma$  des Gemisches ausreichend, so daß nach mehrfachen Reaktionen eine weitgehende Strukturaufklärung von Verbindungen gelingt, von denen nur 10—30  $\gamma$  (dieser Wert ist abhängig von der Zahl der nötigen Umsetzungen) im Gemisch vorhanden waren.

Besonders wertvoll für eine Strukturaufklärung sind solche Reaktionen, die eine gegenüber der Ausgangsverbindung möglichst starke Änderung der massenspektrometrischen Abbaureaktionen bewirken.

Da Doppelbindungen oft entscheidenden Einfluß auf die Zerfallsreaktionen im Massenspektrometer haben, beginnt man zweckmäßigerweise mit einer Hydrierung des Gemisches, wobei allerdings in Kauf genommen werden muß, daß in manchen Fällen sterische Isomere entstehen können.

Daran schließt sich eine Oxydation von Hydroxylgruppen zu den entsprechenden Ketoderivaten. Sie sind etwa gleich flüchtig wie Trimethylsilyläther, haben aber im Vergleich zu diesen ein sehr viel niedrigeres Molekulargewicht und zeigen vor allem Spektren, die eine



Lokalisierung der ursprünglich vorhandenen Hydroxylgruppen erlauben<sup>14</sup>. Die Chromsäureoxydation verläuft im allgemeinen glatt, falls vorher vorhandene Doppelbindungen entfernt wurden. Schwierigkeiten gibt es nur bei der Oxydation von Steroiden mit nachbar- oder 1,3-ständigen Hydroxylgruppen. Trotz der guten Auswertbarkeit der Ketonspektren wurde dieses Verfahren bisher nur gelegentlich verwendet<sup>15, 16</sup>. Die Stellung ursprünglich vorhanden gewesener Ketogruppen läßt sich durch Ketalisierung ermitteln: Äthylenketale zeichnen sich durch besonders charakteristische Massenspektren aus<sup>17</sup>. Im Bedarfsfall können noch spezielle Abbaureaktionen ausgeführt werden.

Aussagen über sterische Verhältnisse, etwa darüber, ob eine Hydroxylgruppe  $\alpha$ - oder  $\beta$ -orientiert ist oder über die Art der Ringverknüpfungen, sind in der Regel auch aus den Spektren von Derivaten nicht ableitbar, sondern sind nur durch eine genaue Analyse der Spektren authentischer Verbindungen unter Berücksichtigung auch kleiner Intensitätsunterschiede zu erhalten. Auch hier ist der Anwendbarkeit der Methode also eine Grenze gesetzt.

Haben zwei Komponenten eines Gemisches ähnliche Retentionszeiten und liegt der eine Stoff in sehr viel größerer Menge als der andere vor, so kann das Spektrum der Hauptkomponente das der Nebenkomponeute so stark überragen, daß die letztere nicht erkennbar ist, insbesondere dann, wenn die Nebenkomponeute nach der Hauptkomponente eluiert wird. Will man daher Stoffwechselprodukte von Steroiden finden, die nur in kleiner Menge gebildet werden, so müssen der gaschromatographischen Trennung mehrere säulenchromatographische Trennschritte vorgeschaltet werden, bei denen die in Hauptmenge vorliegenden bekannten Steroide abgetrennt werden.

Das Fortschreiten der Chromatogramme wird durch die stichprobenartige Aufnahme von Massenspektren verfolgt. Allein aus den in den Spektren angezeigten Molekülionen kann erkannt werden, wieweit die Anreicherung der einzelnen Steroide fortgeschritten ist und welche Fraktionen miteinander vereinigt werden können (Abb. 4).

Bei der Untersuchung biologischen Materials kann natürlich dieses Verfahren oft nicht entscheiden, ob ein gefundenes Steroid tatsächlich

---

<sup>14</sup> H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, Chem. Ber. **103**, im Druck.

<sup>15</sup> K. Schubert, G. Kaufmann und H. Budzikiewicz, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **176**, 170 (1969).

<sup>16</sup> H. Eriksson, J.-Å. Gustafsson und J. Sjövall, Europ. J. Biochem. **6**, 227 (1968).

<sup>17</sup> H. Audier, J. Bottin, A. Diara, M. Fétizon, P. Foy, M. Golfier und W. Vetter, Bull. Soc. chim. France **1964**, 2292; Z. Pelah, D. H. Williams, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 3722 (1964).

als Metabolit im Körper entstand oder im Zuge der Aufarbeitung beim Stehen von Proben in Lösung usw. gebildet wurde.

Möglichkeiten und Grenzen der Methode seien am Beispiel der Untersuchung einer Chromatogrammfraktion demonstriert, die bei der

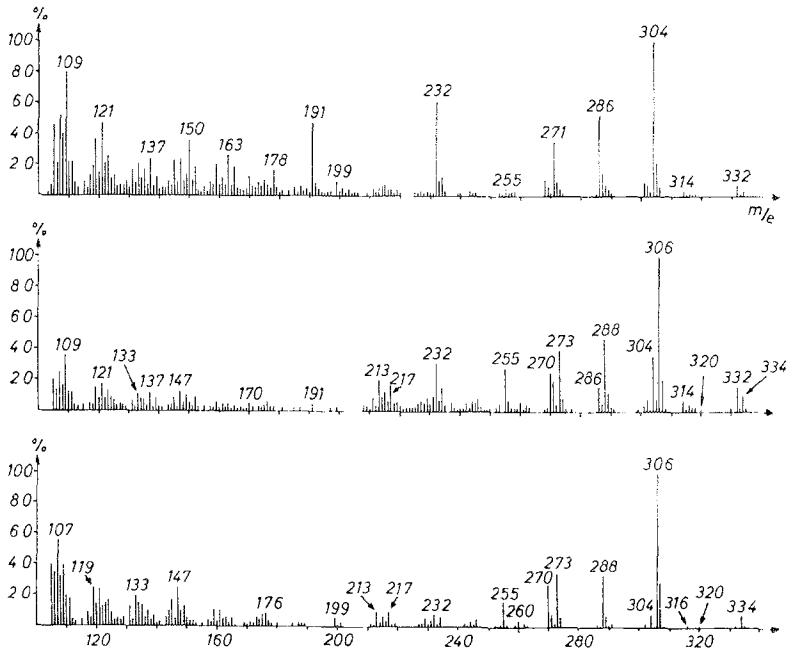


Abb. 4. Massenspektren von drei Chromatogrammfraktionen: Als Fraktion 270—272 wurde mit  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$  (0,1%) von einer  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule ein Substanzgemisch erhalten, dessen Massenspektrum vorwiegend die Gegenwart eines Steroides vom *MG* 304 anzeigt. An Nebensteroiden enthält die Fraktion Verbindungen der *MG* 332 und 334. Die Fraktion 278—280 enthält (neben dem Steroid, *MG* 304) als Hauptmenge ein Steroid vom *MG* 306 sowie wieder Steroide der *MG* 332 und 334, daneben in sehr geringer Menge auch eines vom *MG* 320. In der Fraktion 285—287 schließlich ist fast nur noch das Steroid vom *MG* 306 neben sehr kleinen Mengen der Steroide mit den *MG* 304, 320 und 334 enthalten

Aufarbeitung eines durch saure Hydrolyse von Harn erhaltenen Steroidgemisches erhalten wurde. In dem Gemisch konnten zwei als Stoffwechselprodukte bereits bekannte Steroide, ein bisher unbekanntes 7-Ketosteroid und ein ebenfalls bisher unbekanntes Pregnanderivat mit der ungewöhnlichen  $16\beta$ -Hydroxygruppierung auf folgende Art nachgewiesen werden:

Zur ersten Information über den Steroidgehalt der Fraktion wurde ein Massenspektrum aufgenommen. Das Spektrum (Abb. 5) zeigte an,

daß das Gemisch offenbar Steroide der Molekulargewichte 290, 304, 332 und 334 enthielt.

Das Massenspektrum der ersten Fraktion zeigte das Molekulargewicht 290 an (Abb. 3a). Durch Vergleich mit Spektren unserer Sammlung ergab sich, daß dieses Steroid  $5\beta$ -Androsteron ist<sup>12</sup>, dessen authentisches Spektrum in Abb. 3b reproduziert ist. Diese eindeutige Zuordnung war nur deshalb möglich, weil Spektren aller sterisch isomerer Androsterone

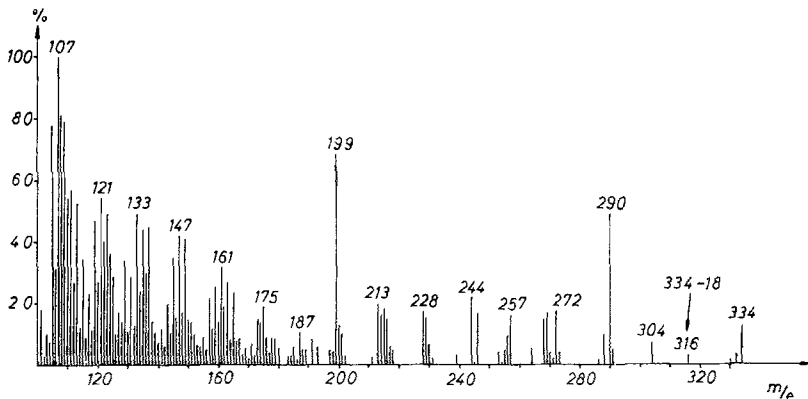


Abb. 5. Massenspektrum einer Gemischfraktion. Die Gemischfraktion wurde im Kombinationsgerät getrennt. Das erhaltene Gaschromatogramm ist in Abb. 6a bzw. 6b reproduziert

vorlagen und daher auch kleine Unterschiede in den Intensitätswerten benachbarter Gruppen in der Auswertung berücksichtigt werden konnten.

Die folgende Fraktion wurde nur durch einen kleinen Peak am Gaschromatogramm angezeigt, der — wie sich aus Vergleichsmessungen abschätzen ließ — etwa einer Steroidmenge von 0,2—0,8  $\gamma$  entsprach. Das demzufolge untergrundreiche Massenspektrum (Abb. 7) zeigte eine Verbindung vom Molekulargewicht 304 an. Unsere Sammlung enthielt kein Spektrum mit Bruchstücken gleicher Masse.

Die daher vorgenommene genaue Massebestimmung des Molekülions am Photoplattenspektrum (einen Ausschnitt des Photoplattenspektrums zeigt Abb. 2) ergab die Bruttoformel  $C_{19}H_{28}O_3$ .

Das Spektrum der dritten Fraktion zeigte ebenfalls nur ein schwaches, untergrundreiches Spektrum (Abb. 8) einer Verbindung der Summenformel  $C_{20}H_{30}O_3$ , die so stark von Beimengungen der Masse 304, 288 und 286 verunreinigt war, daß nichts weiter ausgesagt werden konnte. Da im Gemisch-Spektrum (Abb. 5) Ionen der Masse 318 fehlen, muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß es sich bei der Verbindung um ein Zersetzungs- oder Kunstprodukt handelt. (Über die thermische Zer-

setzung von  $C_{21}$ -Steroiden zu  $C_{20}$ -Steroiden im Gaschromatographen werden wir in Kürze berichten).

Das Spektrum der vierten im Gaschromatogramm angezeigten Komponente (Abb. 9, Ausschnitt aus dem Originalspektrum Abb. 1) entsprach einer Verbindung der Bruttoformel  $C_{19}H_{28}O_3$ .

Bei Berücksichtigung der Summenformel  $C_{19}H_{32}O_3$  des voll gesättigten Grundkörpers konnte das Steroid nur zwei Doppelbindungen oder eine entsprechende Zahl von Ketogruppen enthalten.

Dem Schlüsselbruchstück der Masse 231 kam die Bruttoformel  $C_{16}H_{23}O$  zu. 16-C-Atome enthaltende Bruchstücke sind für Steroide außerordentlich charakteristisch — sie entstehen durch Verlust der C-Atome 15—17<sup>10</sup>. Da im Ion der Masse 231 nur ein Sauerstoffatom enthalten war, mußten zwei der drei Sauerstoffatome im Ring D lokalisiert werden. Das dritte Sauerstoffatom war offensichtlich im Schlüsselbruchstück der Masse 176 ( $C_{12}H_{16}O$ ) enthalten. Solche intensive Ionen gerader Masse entstehen durch Umlagerungsreaktionen, denen vorzugsweise 7- oder 11-Ketosteroide unterliegen<sup>18</sup>. Für sonst unsubstituierte 7-Ketosteroide ist ein das AB-Ringsystem umfassendes Ion der Masse 178 typisch<sup>18, 19</sup>. Somit konnte das Ion der Masse 176 die Gegenwart eines 7-Ketosteroids mit einer Doppelbindung im AB-Ringsystem anzeigen.

Die nächste Fraktion enthielt nach ihrem Massenspektrum (Abb. 10a) ein Steroid der Summenformel  $C_{21}H_{34}O_3$  vom *MG* 334, allerdings mit einer Beimengung des Steroides  $C_{19}H_{28}O_3$  — der Vorfraktion — verunreinigt. Ein Vergleichsspektrum war in unserer Sammlung nicht vorhanden.

Berücksichtigt man, daß die Formel des gesättigten Grundkörpers  $C_{21}H_{36}O_3$  ist, so konnte die Verbindung nur eine Doppelbindung oder eine Ketogruppe besitzen. Zwei der drei Sauerstoffatome mußten also in Form von Hydroxylgruppen vorliegen.

Das Schlüsselbruchstück der Masse 229,  $C_{17}H_{25}$  — in Abb. 10b von wesentlich geringerer Intensität — mußte die Kohlenstoffatome des ABC-Ringsystems, sowie C-18 und C-15 enthalten. Da das Fragment sauerstofffrei war, konnte im ABC-Ringsystem keine Carbonylgruppe vorhanden sein. Dagegen sprach der niedrige Wasserstoffgehalt des Fragmentes dafür, daß bei seiner Bildung eine ursprünglich vorhandene Hydroxylgruppe eliminiert worden war. Die restlichen Sauerstoffatome konnten nur an die C-Atome 16, 17, 20 oder 21 in Form einer OH- und einer Ketogruppe gebunden sein.

Einen bedeutsamen Strukturhinweis gab das Fragment der Masse 273, das aus dem Molekül durch Verlust von  $H_2O$  und  $CH_3CO'$  gebildet wird.

<sup>18</sup> H. Budzikiewicz und C. Djerassi, *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 1430 (1962).

<sup>19</sup> K. Biemann in „Mass Spectrometry. Organic Chemical Applications“, McGraw Hill (New York 1962), S. 344.

Die Abspaltung von  $\text{CH}_3\text{CO}^{\cdot}$  ist für 20-Ketosteroide, die am C-17 eine Hydroxylgruppe tragen<sup>10</sup>, sowie für  $\Delta^{16}$ -20-Ketosteroide typisch<sup>20</sup>. Nun erfolgte in diesem Fall zuerst eine Wasserabspaltung und dann erst der Verlust der Acetylgruppe. Die nach der Wasserabspaltung resultierenden Folgeabbauprodukte sind in dem in Abb. 10a bei höherer

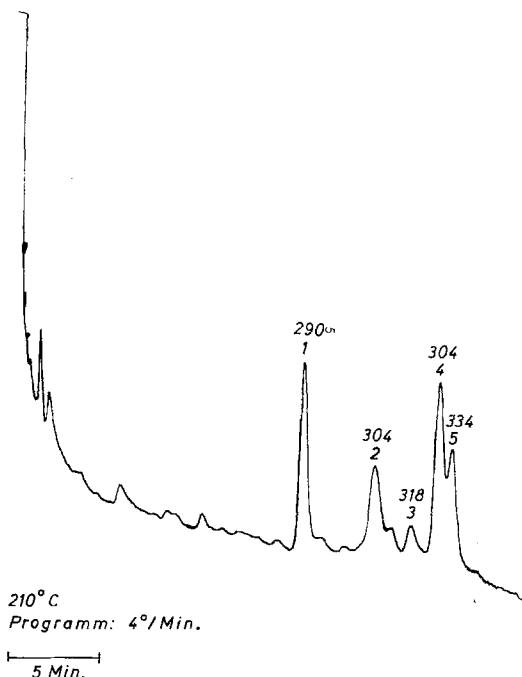
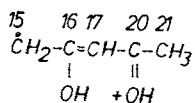


Abb. 6a. Gaschromatogramm des Steroidgemisches, dessen Massenspektrum in Abb. 5 reproduziert ist. Für die Einspritzung wurde eine Menge von etwa 10  $\gamma$  verwendet. Die Probe wurde bei einer Injektortemperatur von 240° direkt auf die Säule gespritzt. Die Säulentemperatur wurde innerhalb von 25 Min. von 210° auf 290° gesteigert. Die Separatortemperatur betrug 260°, die der Ionenquelle 200°

Temperatur aufgenommenen Spektrum wesentlich stärker als in Abb. 10b ausgeprägt. Wir schlossen daher, daß möglicherweise zuerst ein 16-Hydroxysteroid vorgelegen habe, das teilweise zu einem  $\Delta^{16}$ -20-Ketosteroid dehydratisiert wurde, das dann in der für diese Steroide typischen Weise  $\text{CH}_3\text{CO}^{\cdot}$  verliert.

<sup>20</sup> L. Tökés und C. Djerassi, *Steroids* 6, 493 (1965); L. Peterson, *Analyt. Chem.* 34, 1781 (1962).

16-Hydroxy-20-ketosteroide zeigen in ihren Spektren ein Ion der Masse 100<sup>21</sup>, das die C-Atome 15, 16, 17, 20 und 21 umfaßt<sup>10</sup>:



Im allgemeinen fehlen in Massenspektren Spaltstücke der Masse 100. Das Vorhandensein eines derartigen Ions ist dementsprechend — auch wenn es geringere Intensität hat — für die Strukturbestimmung bedeut-

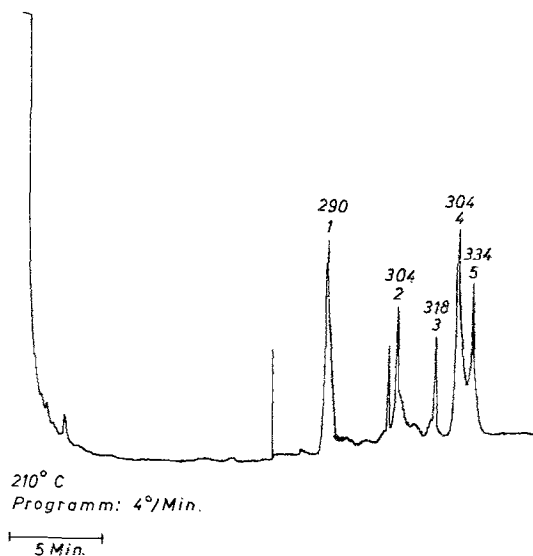


Abb. 6b. Gaschromatogramm der gleichen Fraktion, aber mit Betätigung des Schnellschreibers. Durch das Ein- und Ausschalten des Magnetstromdurchlaufes wird ein Schaltimpuls ausgelöst, der am Gaschromatogramm als Ausschlag registriert wird und somit erkennen läßt, ob das Spektrum bei steigendem oder fallendem Druck aufgenommen wurde

sam. Ein Ion der Bruttoformel  $C_5H_8O_2$  (Masse 100) war im Spektrum enthalten, so daß damit die Annahme vom Vorliegen eines 16-Hydroxy-20-ketosteroids weiter gestützt wurde.

Die aus den Spektren abgeleiteten Aussagen hatten also nur zur Identifizierung eines Steroids geführt, aber immerhin wertvolle Hinweise über möglicherweise vorhandene Strukturelemente in den anderen erbracht. Um weitere Informationen zu erhalten, wurde das Gemisch

<sup>21</sup> V. I. Zaretskii, N. S. Wulfson, V. G. Zaikin, L. M. Kogan, N. E. Voishvillo und I. V. Torgov, Tetrahedron [London] **22**, 1399 (1966); M. F. Grostic und K. L. Rinehart, Jr., J. Org. Chem. **33**, 1740 (1968).

zur Ermittlung etwa vorhandener Doppelbindungen katalytisch hydriert (Äthanol/Pt).

Das Reaktionsgemisch wurde wieder im Kombinationsgerät untersucht. Die erhaltenen Massenspektren waren identisch mit jenen des

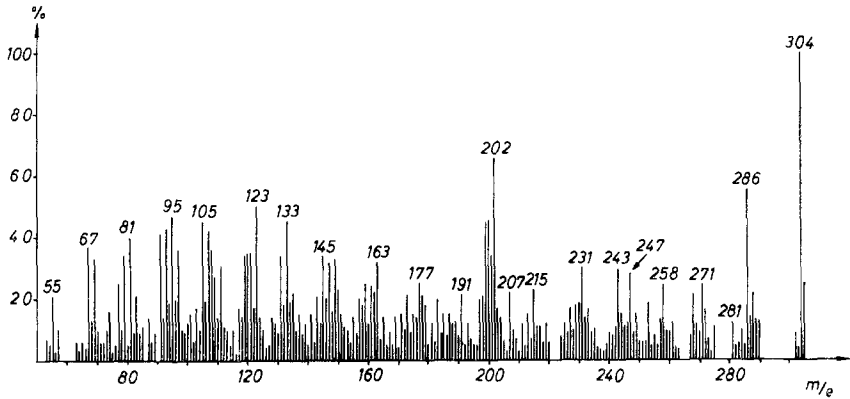


Abb. 7. Massenspektrum der zweiten am Gaschromatogramm angezeigten Komponente

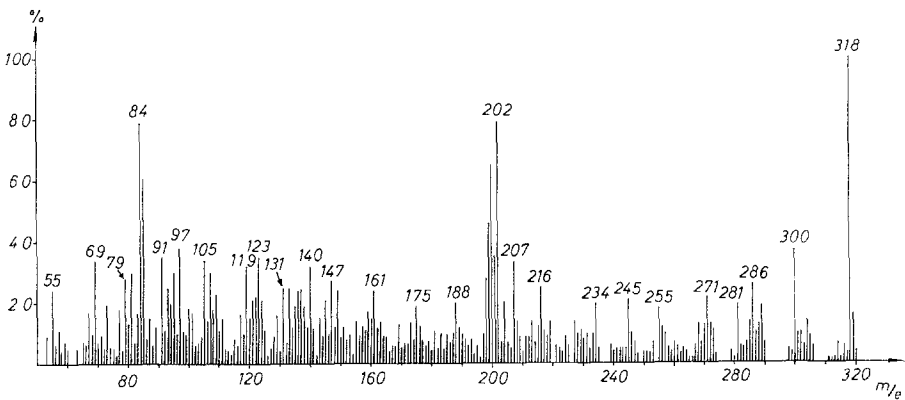


Abb. 8. Massenspektrum der dritten am Gaschromatogramm angezeigten Komponente

ursprünglichen Gemisches mit Ausnahme des Spektrums des Steroides der Summenformel  $C_{19}H_{28}O_3$ , in dessen Spaltungsbild das Schlüsselbruchstück der Masse 176 aufgetreten war (vgl. Abb. 9). Molekülionen und Schlüsselbruchstücke waren um 2 ME zu höheren Massen verschoben und zeigten damit an, daß die Ausgangsverbindung eine Doppelbindung enthalten hatte. Mit der Verschiebung des Schlüsselbruchstückes der





5 $\beta$ -Androstadiens-3,17 übereinstimmt. Damit war ein weiterer Beweis für das Vorliegen von 5 $\beta$ -Androsteron im ursprünglichem Gemisch erbracht.

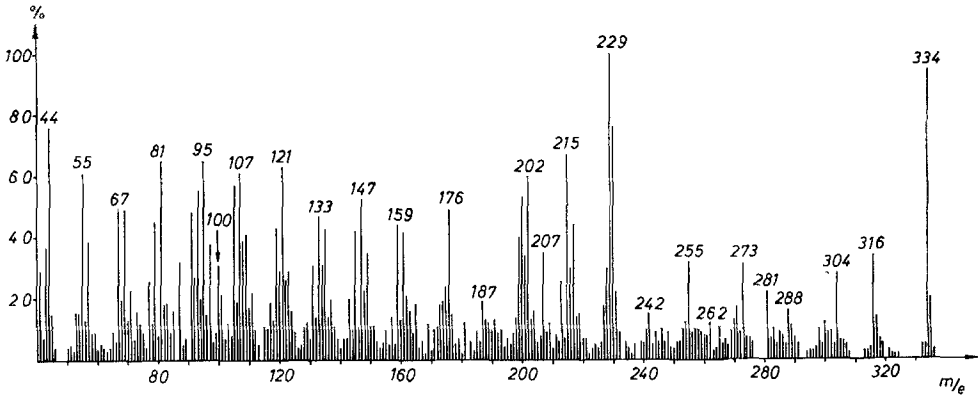


Abb. 10a. Massenspektrum der fünften im Gaschromatogramm angezeigten Komponente

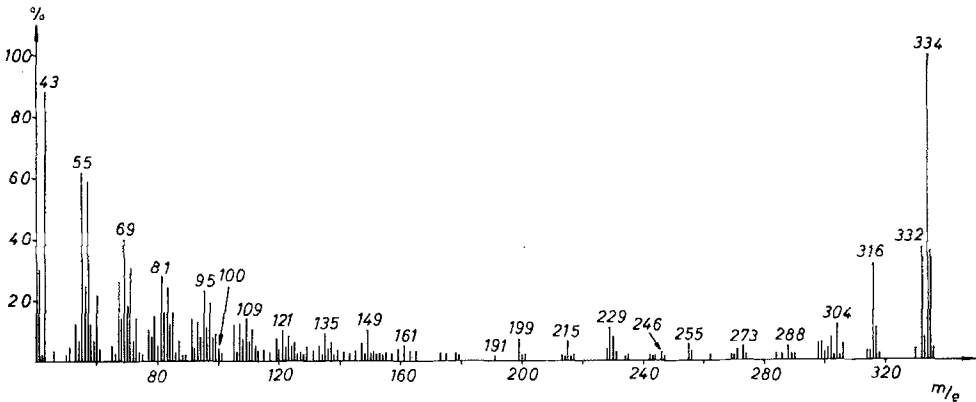


Abb. 10b. Massenspektrum derselben Fraktion; diesmal aber wurde die Substanz nach der gaschromatographischen Trennung aufgefangen und dann erst das Spektrum aufgenommen. Deutlich erkennbar ist hier eine um 2 ME leichtere Beimengung

Die zweite Fraktion des Gaschromatogramms zeigte im Massenspektrum (Abb. 12a) ein *MG* von 302 ( $C_{19}H_{26}O_3$ ), sowie Schlüsselbruchstücke der Masse 191 und 124. Schlüsselbruchstücke der Masse 191 sind für das Vorliegen von Steroiden, die in Stellung 11 und 17 eine Keto-Gruppe tragen<sup>14, 16</sup>, charakteristisch, so daß zu vermuten war, daß es sich um ein 3,11,17-Triketosteroid handeln könne. Um Vergleichs-

spektren zu erhalten, wurden  $5\alpha$ - und  $5\beta$ -3,11,17-Triketoandrostan dargestellt. Sie unterscheiden sich wesentlich in ihren Spektren. Unser Oxydationsprodukt entsprach dem  $5\alpha$ -Isomeren, dessen authentisches Spektrum in Abb. 12 b reproduziert ist.

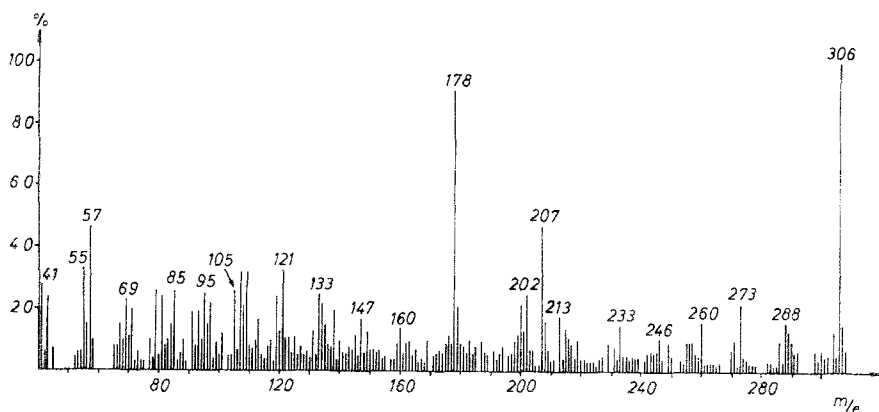
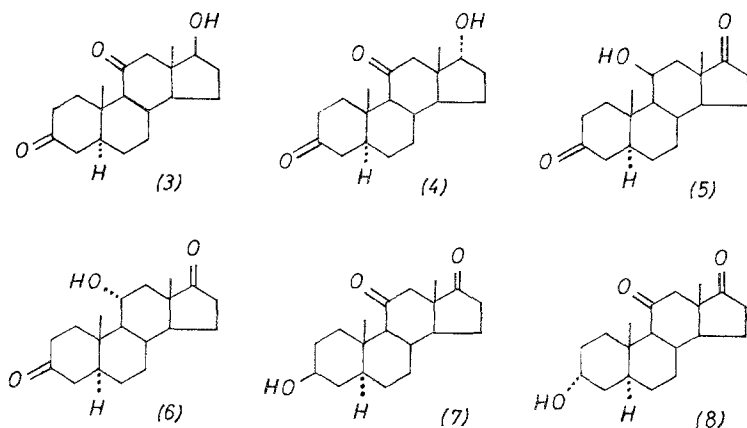


Abb. 11. Massenspektrum des Steroids vom MG 304 (Abb. 9) nach der katalytischen Hydrierung

Das Triketosteroid konnte nur aus der Verbindung  $C_{19}H_{28}O_3$ , dessen Spektrum in Abb. 7 reproduziert ist, durch Oxydation einer Hydroxylgruppe entstanden sein.



Dieses Beispiel zeigt anschaulich, welche strukturspezifischen Aussagen gegenüber den Spektren von Hydroxysteroiden (vgl. Abb. 7) aus den Spektren der entsprechenden Ketone (Abb. 12a) — selbst bei Vorhandensein erheblicher Beimengungen — erhältlich sind.

Das Ausgangsteroid mußte daher eine Struktur haben, die einem der sechs Isomeren (3—8) entsprach. Wir konnten die Isomeren 3, 5, 6, 7

und **8** herstellen und Vergleichsspektren aufnehmen. Die Isomeren **3**, **5** und **6** unterschieden sich bezüglich der Masse der Schlüsselbruchstücke von dem in Abb. 7 reproduzierten Spektrum. Insbesondere fehlte in den Spektren der Isomeren **3** und **5** das für 11,17-Diketosteroide typische

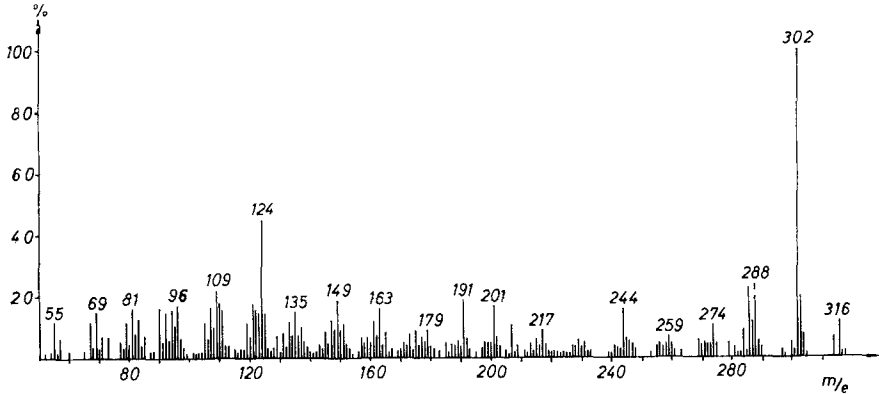


Abb. 12a. Massenspektrum der zweiten Fraktion des Gaschromatogramms, das nach Hydrierung und Oxydation der Steroidmischung erhalten wurde

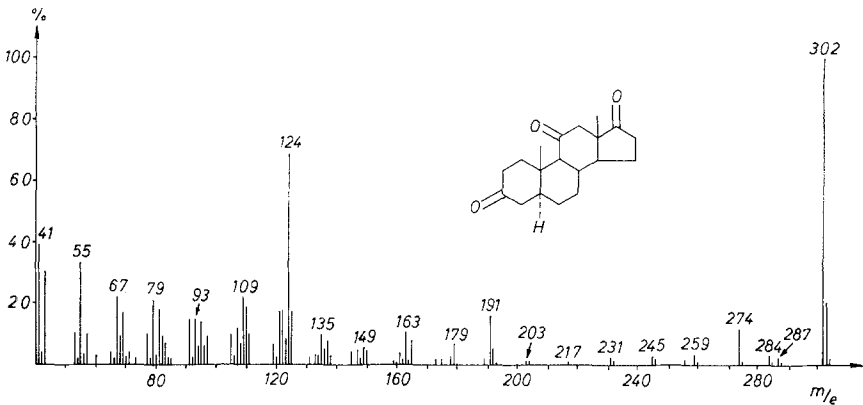


Abb. 12b. Massenspektrum des 5 $\alpha$ -3,11,17-Triketoandrosterons

Ion der Masse 191, das auch im Spektrum der Verbindung C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> vorhanden war und somit auf das Vorliegen eines 11,17-Diketosteroides hinwies. Das Vorhandensein einer 11-Ketogruppe wurde auch durch das chromatographische Verhalten nahegelegt.

Das 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstano-11,17-dion (**8**) ist ein schon lange bekanntes, im Harn vorkommendes Steroidstoffwechselprodukt<sup>22</sup>, während die Verbindung **7** bisher nur aus Meerschweinchen- und Ratten-

<sup>22</sup> S. Lieberman, D. K. Fukushima und K. Dobriner, J. Biol. Chem. **182**, 299 (1950).

harn<sup>23</sup> isoliert wurde. Die schlechte Qualität des Spektrums (Abb. 7) läßt keine eindeutige Entscheidung zwischen den Strukturen 7 und 8 zu.

Aus dem Spektrum der folgenden Fraktion ließ sich lediglich erkennen, daß sie ein Steroid vom *MG* 316 enthielt, offenbar einem Oxydationsprodukt des Steroides vom *MG* 318 entsprechend. Weitere Aussagen waren aus dem extrem intensitätsschwachen Spektrum nicht ableitbar.

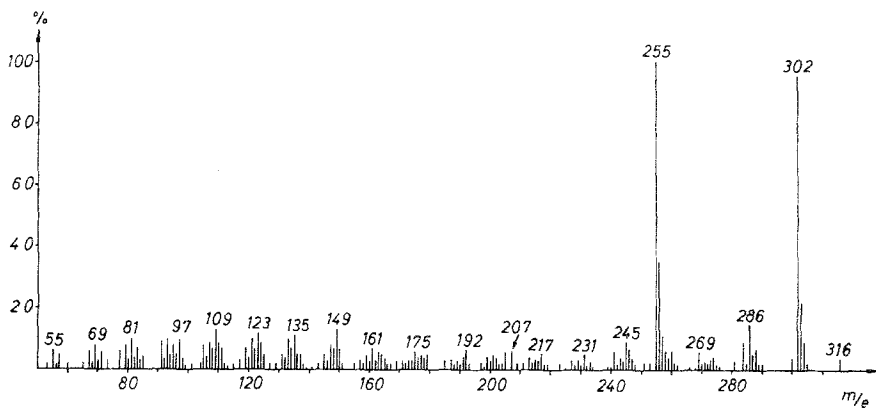


Abb. 13. Massenspektrum der vierten Fraktion des Gaschromatogramms, das nach Hydrierung und Oxydation der Steroidmischung erhalten wurde

Die vierte Fraktion des Gaschromatogramms hatte wieder ein *MG* von 302,  $C_{19}H_{26}O_3$  (Massenspektrum s. Abb. 13).

Das Spektrum zeigte nur ein einziges Schlüsselbruchstück (bei  $m/e$  255) der Summenformel  $C_{18}H_{23}O$ , das dem Verlust von einem Molekül Wasser und  $CHO$  aus dem Molekülion entsprach. Derartige Spaltungsreaktionen sind nach unseren bisherigen Erfahrungen außerordentlich charakteristisch für 7,17-Steroidketone<sup>14</sup>. Dieses Oxydationsprodukt konnte also aus dem Steroid  $C_{19}H_{28}O_3$  entstanden sein, dessen Spektrum Abb. 9 zeigt. Zum Vergleich nahmen wir das Massenspektrum des uns leicht zugänglichen  $5\alpha$ -Androstan-3,7,17-trions auf. Überraschenderweise erwies es sich als praktisch identisch mit dem des Oxydationsproduktes. Dies läßt nur zwei Erklärungsmöglichkeiten offen:

1. Das Vorhandensein von Ketogruppen in der Stellung 7 und 17 beeinflusst die Bruchstückbildung so stark, daß eine zusätzliche Ketogruppe unabhängig von ihrer Stellung keinerlei Wirkung auf die Spaltungsreaktionen hat.

<sup>23</sup> K. Schubert und K. Wehrberger, Z. physiol. Chem. **326**, 242 (1961); **328**, 173 (1962).

2. Im Ausgangsgemisch hatte eine Verbindung vorgelegen, die sich wegen ihrer Schwerflüchtigkeit einem Nachweis entzog. Bei der Oxydation war daraus dann ein flüchtiges 5 $\alpha$ -Androstan-3,7,17-trion entstanden.

Da 15,17- und 16,17-Dihydroxysteroiden (Formel 1 und 2) unter den von uns angewandten Bedingungen über die Ketostufe hinaus oxydiert werden, ziehen wir die zweite Deutungsmöglichkeit vor.

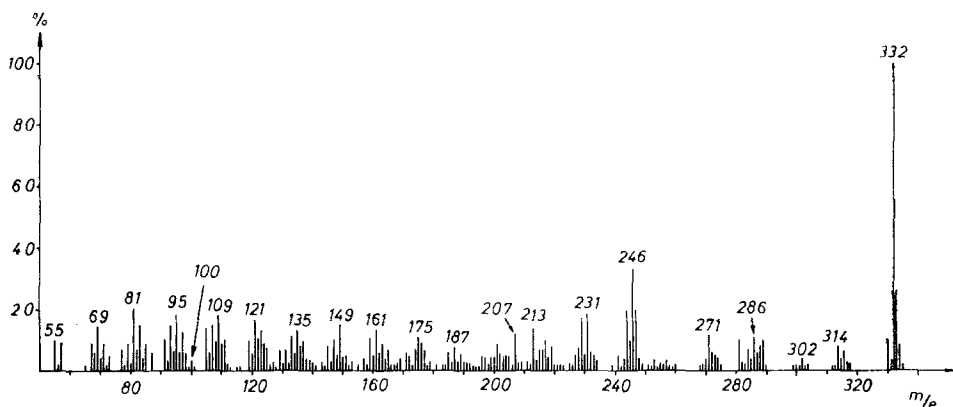


Abb. 14. Massenspektrum der fünften Fraktion des Gaschromatogramms, das nach Hydrierung und Oxydation der Steroidmischung erhalten wurde

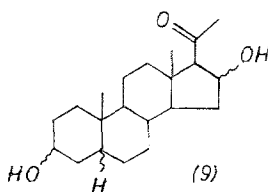
Dieses Beispiel zeigt, welche Grenzen der Kombinationsmethode gesetzt sind und daß bei der Auswertung der Ergebnisse große Vorsicht zu üben ist, will man nicht zu möglicherweise falschen Schlußfolgerungen gelangen.

Als letzte Fraktion trat aus der Säule ein Steroid vom *MG* 332 der Summenformel  $C_{21}H_{32}O_3$  aus (Massenspektrum s. Abb. 14).

Demnach war bei der Oxydation des Steroids vom *MG* 334 nur eine der beiden Hydroxylgruppen oxydiert worden. Dieses Verhalten ist typisch für Pregnanderivate, die am C-16 eine Hydroxylgruppe tragen\*.

Das Hauption der Masse 246 ( $C_{17}H_{26}O$ ) entspricht dem Verlust der C-Atome 16, 17, 20 und 21. Da ein Ion der Masse 100 ebenfalls vorhanden war, konnte am Vorliegen eines 16-Hydroxy-20-keto-steroids nicht mehr gezweifelt werden. Da alle aus Harn isolierten Steroide in der Stellung 3 einen Sauerstoffsubstituenten tragen, war die fehlende Hydroxylgruppe in der Position 3 zu lokalisieren. Für das Steroid ergab sich somit die Strukturformel 9:

\* Siehe<sup>2</sup>, u. zw. S. 363.



Ein Vergleich unseres Spektrums mit denen anderer 16-Hydroxy-20-ketosteroide<sup>21</sup> ergab, daß in unserem Steroid die Hydroxylgruppe in Stellung 16 $\beta$  konfiguriert sein muß: 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxysteroid unterscheiden sich ganz wesentlich in der Intensität der Spitzen der Molekülionen und der Ionen der Masse 100. In den  $\alpha$ -konfigurierten Isomeren haben die Molekülionen nur ganz geringe Intensität (unter 10% der Basisspitze) während das Ion der Masse 100 meist Basisspitze ist. Bei Vorliegen der  $\beta$ -Konfiguration hingegen liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt, wie wir an Vergleichsproben, die wir Dr. *Neher* von der Ciba verdanken, überprüfen konnten. Bei unserer Verbindung muß es sich demnach um ein 16 $\beta$ -Isomeres von Steroiden handeln<sup>24</sup>, die schon früher in biologischen Materialien aufgefunden wurden. Über die Konfiguration der Hydroxylgruppe am C-3 und die Verknüpfung des A/B-Ringsystems können wir mangels Vergleichsspektren keine Aussagen machen.

Für die Unterstützung der Arbeit danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und insbesondere der Schering AG, Berlin. Nur durch deren Hilfe war es möglich, das für unsere Untersuchungen benötigte teure UV-empfindliche Registrierpapier anzuschaffen.

## Experimenteller Teil

### Beschreibung der Apparatur

Wir kombinierten einen programmierbaren Gaschromatographen Varian Aerograph 1700 mit einem SM-1-B-Massenspektrometer der *Mattauch—Herzog*-Geometrie.

Die silanierte Glassäule von 150 cm Länge und  $\frac{1}{8}$ " Innendurchmesser wurde mit 3% SE 30 (oder OV 17) auf Aeropak 100/120 mesh gefüllt.

Die Substanz wurde direkt auf das Füllmaterial gespritzt und gelangte nach Passieren des Chromatographen über ein silanisiertes Kapillarrohr in den Separator vom *Biemann—Watson*-Typ<sup>2b</sup>. Von hier aus führte ein silanisiertes Glasrohr direkt in die Ionenquelle und endete unmittelbar (1 cm) vor der Ionisierungszone. Auf diese Weise wurde ein Kontakt der Substanz mit Metallteilen, die bei den notwendigen Temperaturen (250 bis 270°) eine Zersetzung katalysieren, unterbunden.

<sup>24</sup> R. *Neher* und A. *Wettstein*, *Helv. chim. Acta* **42**, 956 (1959).

Die Verwendung eines vollständig silanisierten Systems bis in den Quellenraum ist wichtig, da sonst erhebliche Substanzverluste auftreten. Von ähnlicher Bedeutung ist eine genaue Temperaturkontrolle in allen Teilen des Probenzuführsystems, da es leicht zu lokaler Überhitzung und damit zur Zersetzung der Probe kommen kann. Insbesondere ist auf eine gute Temperaturverteilung im Separator zu achten, die z. B. durch Auffüllen der Hohlräume mit Stanniolkügelchen und Einfügen von Asbeststückchen zwischen Heizer und Separatormantel erreicht werden kann.

Da man bei der Verwendung von gepackten Säulen, wie dies bei der Untersuchung von Steroiden notwendig ist, relativ viel Trägergas zu entfernen hat, muß der Separator an ein eigenes Pumpsystem angeschlossen sein. Wir verwendeten hierzu eine zweistufige Brand Ölrotationsvakuum-pumpe (200 l/Min.). Auch die Ionenquelle ist an ein sehr wirksames Pumpsystem anzulegen, weil relativ große Gasmengen abzupumpen sind: Zum ersten gelangt in die Ionenquelle neben der Probe sehr viel Trägergas, zum zweiten muß bei Aufnahme von Hochauflösungsspektren als Referenzsubstanz zur genauen Massebestimmung ein Gemisch perfluorierter Kohlenwasserstoffe kontinuierlich aus einem Gasvorratsbehälter in die Ionenquelle eingeleitet werden, so daß auch dadurch ein erheblicher Druckanstieg zustande kommt.

Als Detektor für die aus dem Gaschromatographen austretenden Fraktionen diene der Totalionenstromanzeiger des Massenspektrometers: es ist dies eine Blende, die von außen vor den Objektspalt geschoben werden kann und so einen kleinen Teil des Ionenstromes ausblendet.

Die Spektrenregistrierung erfolgte je nach Bedarf entweder bei mittlerer Auflösung — 1500 (10% Tal) — mit einem Schnellschreiber oder bei hoher Auflösung — 12 000—15 000 (10% Tal) — auf einer Photoplatte.

Der Analysatorraum unseres SM-1-B-Gerätes läßt sich mit einem Drehventil von der Ionenquelle absperrern. Nehmen wir Photoplattenspektren auf, so bleibt dieses Absperrventil nur während der Aufnahme eines am T.I.-Monitor angezeigten GC-Peaks geöffnet. Auf diese Weise wird das Eindringen von Lösungsmittelfraktionen in den Analysatorraum verhindert.

#### *Empfindlichkeitsteste*

Es wurden Mischungen von gleichen Teilen Dehydroepiandrosteron, 6-Dehydrotestosteron und Cholesterin hergestellt und in unterschiedlichen Gemischkonzentrationen direkt auf die Säule gespritzt. Die Gemischkonzentration wurde schrittweise von  $10^{-4}$  auf  $10^{-7}$  g pro Einzelkomponente bei verschiedenen Einstellungen der Temperatur am Gaschromatographen und den Kopplungsteilen sowie verschiedenen Heliumströmungsverhältnissen herabgesetzt. Dadurch versuchten wir die optimalen Bedingungen zu ermitteln. Eine Proportionalität zwischen der aufgegebenen Probemenge und der GC-Peakhöhe ist bemerkenswerterweise nur bis zu einer Konzentration von  $1 \gamma$  gewährleistet.

Im Gegensatz dazu liegt bei der Untersuchung von Fettsäureestern die Erfassungs- und Proportionalitätsgrenze bei etwa  $10^{-8}$  g und bei aromatischen Kohlenwasserstoffen (Xylol, Toluol) bei  $10^{-10}$  g.

#### *Gewinnung der Harnsterioide*

Frischer Harn wurde mit Toluol (1 ml Toluol/l Harn) versetzt und in der Kühltruhe gesammelt. 50 l Harn wurden in 1 l-Portionen in folgender

Weise aufgearbeitet: 1 l Harn wurde zur Entfernung ungebundenen Cholesterins 3mal mit je 200 ml Äther extrahiert. Die Ätherauszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen und das Waschwasser dem Urin beigefügt. Zur Hydrolyse wurden Harn und Waschwasser mit 200 ml 40proz.  $H_2SO_4$  versetzt und 1 Stde. am Wasserbad auf  $80^\circ$  erwärmt<sup>25</sup>. Nach dem Abkühlen wurde 3mal mit je 300 ml Äther extrahiert, die Ätherextrakte 2mal mit 200 ml *n*-NaOH gewaschen, danach noch kurz mit NaOH-Plätzchen geschüttelt und über Seesand abfiltriert. Das Filtrat wurde nach dem Trocknen eingedampft. Die vereinigten Extrakte von 50 l Harn ergaben 2,99 g braunes Öl.

Tabelle 1. Massebestimmung auf dem Photoplattenspektrum

Abb.	Bruttoformel	ber.	gef.	Fehler
7	304 $C_{19}H_{26}O_3$	304,203833	304,205833	6 ppm
8	318 $C_{20}H_{30}O_3$	318,219482	318,218482	3 ppm
9	304 $C_{19}H_{26}O_3$	304,203833	304,206233	8 ppm
9	231 $C_{16}H_{23}O$	231,174881	231,174281	3 ppm
9	176 $C_{12}H_{16}O$	176,120109	176,120809	4 ppm
10a	334 $C_{21}H_{34}O_3$	334,250781	334,250881	0,3 ppm
10a	229 $C_{17}H_{25}$	229,195616	229,196923	6 ppm
10a	100 $C_5H_8O_2$	100,052426	100,052026	4 ppm
12a	302 $C_{19}H_{26}O_3$	302,188183	302,186383	6 ppm
13	302 $C_{19}H_{26}O_3$	302,188183	302,186785	4 ppm
13	255 $C_{18}H_{23}O$	255,174881	255,175881	4 ppm
14	332 $C_{21}H_{32}O_3$	332,235131	332,237531	8 ppm
14	246 $C_{17}H_{26}O$	246,198355	246,200355	8 ppm

Das Öl wurde an Sephadex LH 20 mit Äthanol einer Vortrennung unterworfen. Drei Steroidfraktionen wurden erhalten: 1. 0,33 g (Hauptmenge Cholesterin), 2. 2,14 g (Hauptmenge Androsteron), 3. 0,24 g (Hauptmenge sauerstoffreichere Steroide).

Nach einer zweiten Trennung der Steroidfraktionen an LH 20 wurde jede Fraktion in 9 Unterfraktionen zerlegt. Die Unterfraktionen wurden dann weiter an kleinen Säulen von  $Al_2O_3$ , Kieselgel oder Florisil getrennt.

#### Chrom(VI)-Oxyd-Oxydation

Die Steroidprobe wurde in einigen Tropfen Eisessig (Merck p. a.) gelöst und mit der gleichen Menge einer 1proz. Lösung von  $CrO_3$  in Eisessig versetzt<sup>26</sup>. Nach 16stdg. Stehen bei Raumtemp. im Dunkeln wurde die Lösung mit Wasser verdünnt und die Steroide mit  $CH_2Cl_2$  extrahiert.

#### Katalytische Hydrierung

Die Steroidprobe wurde in 2 ml Äthanol gelöst. Nach Zugabe von 1 mg  $PtO_2$  wurde 3 Stdn. in  $H_2$ -Atmosphäre geschüttelt, mit  $CH_2Cl_2$  verdünnt, vom Katalysator abfiltriert und eingedampft.

<sup>25</sup> S. G. Johnson, Acta endocrin. [Kopenhagen] **21**, 127 (1956); P. Vestergaard und B. Claussen, Acta endocrin. [Kopenhagen], Suppl. **64**, 35 (1962).

<sup>26</sup> S. Liebermann, E. R. Katzenellenbogen, R. Schneider, P. E. Studer und K. Dobriner, J. Biol. Chem. **205**, 87 (1953); A. Zaffaroni und R. B. Burton, l. c. **193**, 749 (1951).