

Untersuchung der Steroidausscheidung im Neugeborenen-Urin mit der Kombination Glaskapillargaschromatograph—Massenspektrometer

Von

J. Reiner und G. Spiteller*

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen,
Bundesrepublik Deutschland

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 15. Juli 1975)

*A Study of Steroids Eliminated in the Urine of the Newborn by
Combined Glass Capillary Gas Chromatography and Mass Spec-
trometry*

The steroids in the urine of newborn babies were investigated by glass capillary gas chromatography—mass spectrometry. In addition to those steroids already known, the compounds **1**, **5**, **37**, and **43–54** were identified as steroidal components of the urine of the newborn. Of special interest is the occurrence of steroids **5**, **37**, and **46** with an oxygen function at position 11, of those with a 3-oxo-4-ene structure, **44**, **50**, **53**, **54**, and of 3 β -hydroxy-androsta-5,7-diene, **51**.

Stoffwechselerkrankungen manifestieren sich häufig durch stark vermehrte Ausscheidung eines oder mehrerer Metabolite im Harn. Aus dem Auftreten hoher, normalerweise nicht vorhandener Peaks in Gaschromatogrammen von Ausscheidungsprodukten (sogenannten „Ausscheidungsprofilen“) konnten bisher unbekannte Stoffwechselerkrankungen aufgespürt werden^{1–3}. Dieses Verfahren der Diagnostik durch Aufnahme von Ausscheidungsprofilen dürfte unserer Meinung nach in Zukunft erheblich an Bedeutung gewinnen. Grundbedingung für derartige Untersuchungen ist die Kenntnis der Struktur der Stoffwechselprodukte, die unter normalen Bedingungen ausgeschieden werden. Leider ist unser Wissen in dieser Hinsicht bescheiden. Dazu kommt, daß aus der Nahrung stammende Stoffwechselprodukte die Profile teilweise verändern. Da wir in der Kombination Glaskapillar-

* Herrn Prof. Dr. O. Hromatka zum 70. Geburtstag gewidmet.

gaschromatographie und Massenspektrometrie ein sehr wirkungsvolles Trenn- und Identifizierungsverfahren zur Verfügung haben, stellten wir uns die Aufgabe, die im Harn auftretenden Produkte zu identifizieren. Um Komplikationen durch unterschiedliche Nahrungsaufnahme zu vermeiden, untersuchten wir den Harn eines Kollektivs gleich ernährter Personen, nämlich von Neugeborenen. In der vorliegenden Arbeit wird über die Steroidausscheidung berichtet.

Harn enthält eine fast unübersehbare Zahl von Metaboliten in sehr unterschiedlichen Mengenverhältnissen, so daß auch mit modernen Analysenverfahren ausgeführte Untersuchungen eine zumindest teilweise Vortrennung erforderlich machen.

Von besonderer Wirksamkeit als Trennverfahren für biologisches Material ist die Glaskapillargaschromatographie wegen der geringen Zahl notwendiger Vortrennschritte, der hohen Trennschärfe und des geringen Substanzbedarfs. Eine eindeutige Identifizierung wäre durch Messung der Kovatsindices möglich⁴, doch müßten hierzu isotherme Bedingungen eingehalten werden. Die im Harn ausgeschiedenen Produkte unterscheiden sich in ihrer Flüchtigkeit so stark, daß ihre gemeinsame Erfassung nur bei Temperaturprogrammierung möglich ist. Daher sind Gaschromatogramme ein und desselben Gemisches auch bei sorgfältiger Einhaltung der Arbeitsbedingungen zur Zeit noch nicht soweit reproduzierbar, daß man identische Retentionszeiten erhält und somit eine Identifizierung auf dieser Basis ausführen könnte. Daher ist ein zweites Charakterisierungsverfahren bei der Analyse so komplexer Gemische unbedingt erforderlich. Dafür kommt derzeit wegen des geringen Probenbedarfs nur die Massenspektrometrie in Frage.

Während die Kopplung eines Glaskapillargaschromatographen mit einem Massenspektrometer zur Untersuchung leicht flüchtiger Komponenten keine Schwierigkeiten macht und routinemäßig zur Analyse von Aromastoffen angewendet wird^{5, 6}, bereitete bisher die Analyse schwerer flüchtiger Stoffe große Probleme, weil geeignete Kopplungstechniken fehlten (z. B. Dichtungsmaterialien, Interface usw.). Dieses Problem ist nun teilweise gelöst, und entsprechende Gerätekombinationen sind im Handel erhältlich. Möglichkeiten und Grenzen dieser Gerätekombination seien an Hand einer Analyse der im Neugeborenenurin enthaltenen Steroide, die wir mit einem LKB 2091-Gerät ausführten, demonstriert:

Seit der Beobachtung, daß Neugeborene eine gegenüber Erwachsenen völlig verschiedene Steroidausscheidung zeigen⁷⁻⁹, wurden die Steroide des Neugeborenenurins eingehend untersucht. Vor allem mit Hilfe der Kombination von Gaschromatograph—Massenspektrometer ist die Struktur einer großen Zahl von Steroiden aufgeklärt worden¹⁰⁻¹⁶. Trennungen an Glaskapillaren wurden vereinzelt beschrieben, doch ist

nur bei wenigen Komponenten eine Strukturzuordnung auf Grund der Retentionszeiten getroffen worden^{17, 18}.

Wie Abb. 1 zeigt, erhält man nach entsprechender Aufarbeitung (siehe exper. Teil) und Derivatisierung eine ausreichende Trennung der

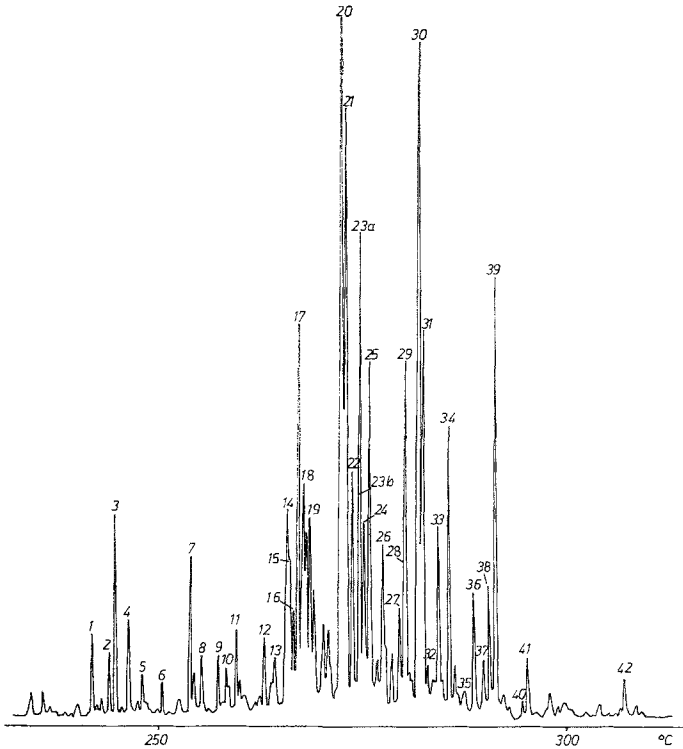


Abb. 1. Glaskapillargaschromatogramm der Steroidfraktion eines 5 Tage alten Kindes. Die Steroide wurden, wie im exper. Teil beschrieben, in Trimethylsilylderivate überführt. LKB 2091-Gerät, SE 30-Dünnschicht-Glaskapillarsäule, 25 m, Temperaturprogrammierung: 2°/min, von 100—300 °C, Einspritzblocktemp. 275 °C, Trägergas Helium, 2 ml/min

Steroidfraktion. Von jeder Einzelkomponente konnten auch Massenspektren aufgenommen werden.

Trotz der offensichtlich ausreichenden Trennung und Charakterisierung bereitet uns die Identifizierung der Komponenten erhebliche Schwierigkeiten.

Dies hat folgende Gründe: Die Spektren derivatisierter Steroide geben nämlich in der Regel nur Informationen über das Molekulargewicht der Verbindung und die Zahl anwesender Hydroxylgruppen. Eine Lokalisation der Substituenten oder gar die Ermittlung der Konfiguration gelingt

nur in Sonderfällen und setzt das Vorhandensein von Vergleichsmaterial und einen exakten Vergleich aller Peakintensitäten voraus. Dieses Vergleichsmaterial fehlte uns in den meisten Fällen. Überdies reicht die Qualität der Spektren kleiner *GC*-Peaks in der Regel nicht aus für exakte Intensitätsvergleiche. Es zeigte sich, daß zwar auch von gaschromatographischen Peaks, die nur etwa 5% der Intensität der Hauptkomponente (entsprechend einer Menge von etwa 20 ng) erreichen, noch Massenspektren erhältlich

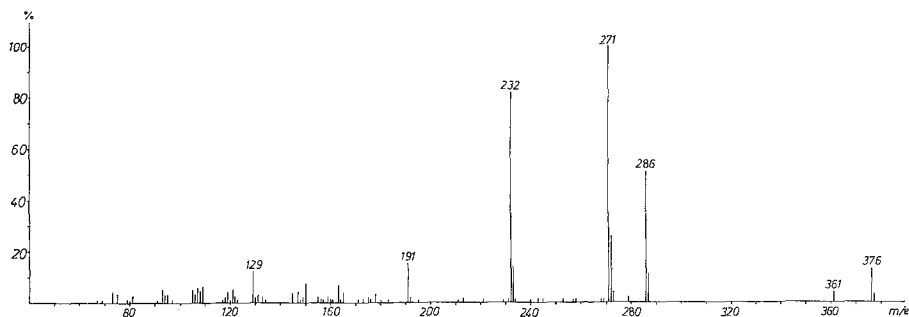


Abb. 2a. *TMS*-Äther von 3 α -Hydroxy-5 β -androstan-11,17-dion aus Neugeborenenurin (Peak 5, Abb. 1)

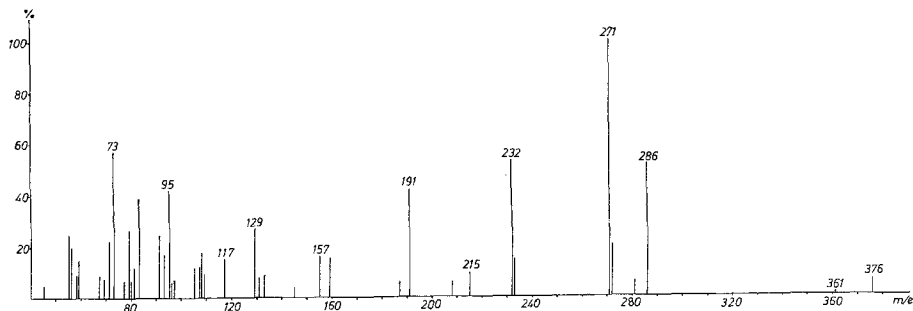


Abb. 2b. *TMS*-Äther von 3 α -Hydroxy-5 β -androstan-11,17-dion

sind. Diese weisen jedoch wegen der geringen Zahl registrierbarer Ionen stark verzerrte Intensitätswerte auf, so daß eine derartige Identifizierung, die auf Massen- und Intensitätswertvergleich einzelner Ionen basiert, nicht mehr möglich ist (siehe Abb. 2a und 2b).

Dazu kommt, daß bei derartigen Messungen unvermeidbare Spuren von Verunreinigungen zu den Ionenintensitäten beträchtlich beitragen. Da diese Intensitätsbeiträge auch durch Rechner nicht kompensierbar sind, führen sie zu einer weiteren Verschlechterung der Auswertbarkeit der Spektren.

Überdies läßt sich bei der Anwendung milder Silylierungsreagentien (z. B. *HMDS/TMCS*) nicht vermeiden, daß Silylierung von Hydroxylgruppen nur teilweise erfolgt, während unter derberen Reaktionsbedingungen auch Ketogruppen (nach Enolisierung) teilweise in Trimethylsilyl-derivate umgewandelt wurden. Die Folge davon ist, daß ein und dieselbe Komponente zwei oder mehrere Derivate liefert, die zwar alle als getrennte

Peaks im Glaskapillargaschromatogramm angezeigt werden, aber eine quantitative Erfassung erheblich erschweren. Zur Überwindung dieser Schwierigkeiten wird zwar von *Horning*¹⁹ empfohlen, Ketone vor der Trimethylsilylierung in Methoximderivate überzuführen, eigene Versuche zeigen jedoch, daß die Methoximbildung nicht quantitativ verläuft und die Bildung von *E*- und *Z*-Isomeren zu zusätzlichen Komplikationen führt.

Die Spektren freier Steroide zeigen im Gegensatz zu ihren Derivaten in der Regel oft Schlüsselionen, die zumindest eine Lokalisierung der funktionellen Gruppen, teilweise aber auch Angaben über deren Stellung (α - oder β -) erlauben^{19, 20}.

Es wäre daher wünschenswert, wenn man auf eine Derivatisierung verzichten könnte. Es ist uns zwar gelungen, auch underivatisierte Steroide an Kapillarsäulen zu trennen, doch läßt sich dieses Verfahren nicht bei der Untersuchung von Harnsteroiden anwenden:

1. Bei der Analyse von freien Steroiden findet eine viel stärkere Adsorption am Säulenmaterial statt als bei derivatisierten Steroiden, Spuren Mengen werden mitunter total verschluckt.

2. Die Trennleistung nimmt gegenüber derivatisierten Steroiden erheblich ab, so daß oft mehrere Komponenten in einem einzigen Peak auftreten.

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten ist die Messung von Retentionszeiten bei gleichzeitiger Aufnahme von Massenspektren — selbst wenn diese von schlechterer Qualität sind — in den meisten Fällen für eine Identifizierung ausreichend und damit die Anwendung der Kombination von Glaskapillargaschromatographie—Massenspektrometrie für Diagnosezwecke möglich. Notwendig ist dazu aber eine Sammlung von Vergleichsspektren entsprechender Qualität.

Da dieses Vergleichsmaterial nicht durch Anwendung der Kombination von Glaskapillargaschromatographie—Massenspektrometrie erhältlich ist, waren wir gezwungen, Harn zu poolen, um Material ansammeln zu können, und dieses zu reinigen, wodurch dann die nötigen Vergleichsspektren gewinnbar waren.

Gepoolter Kinderurin wurde zunächst an einer Amberlite XAD-2 Säule entsalzt²¹, dann das die Steroidkonjugate enthaltene Methanol eluat enzymatisch verseift und an einer Sephadex LH-20-Säule nach Molekulargröße getrennt. Die so erhaltenen Steroidfraktionen wurden an Kieselgel-Dünnschichtplatten weiter zerlegt und schließlich die einzelnen Zonen der Dünnschichtplatte nach Elution mit Methanol ohne Derivatisierung im Kombinationsgerät *GC—MS* untersucht. Auf Grund der Spektren konnten die einzelnen Verbindungen identifiziert werden. Zur Gewinnung der Vergleichsspektren der für die Untersuchung in der Kombination Glaskapillargaschromatograph—Massenspektrometer geeigneten Trimethylsilylderivate wurden die Gemische freier Steroide

Tabelle 1

Peak Nr.	MG	MS	Struktur*	Literatur
1	362	347 (24%), 272 (85), 257 (10), 244 (40), 215 (20), 201 (12), 176 (8), 129 (40), 108 (46), 73 (100)	3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on, <i>TMS</i> Phthalester nicht identifiziert	
2				
3	360	445 (2%), 370 (2), 313 (4), 205 (100), 147 (23), 133 (30), 117 (32)		
4	360	360 (11%), 345 (4), 304 (16), 270 (10), 255 (7), 231 (17), 213 (8), 172 (4), 143 (6), 129 (100)	3 β -Hydroxy-androst-5-en-17-on, <i>TMS</i>	10, 11
5	376	376 (7%), 286 (52), 271 (100), 232 (53), 191 (42), 159 (15), 129 (26)	3 α -Hydroxy-5 β -androstan- 11, 17-dion, <i>TMS</i> nicht identifiziert	
6				
7	434	434 (27%), 419 (9), 344 (50), 329 (24), 305 (40), 254 (32), 239 (54), 215 (52), 213 (30), 199 (13), 129 (100)	3 β , 17 α -Dihydroxy-androst-5-en, di- <i>TMS</i>	10, 12, 15
8	448	448 (22%), 433 (12), 358 (37), 343 (61), 304 (37), 248 (5), 235 (6), 182 (9), 169 (11), 168 (8), 147 (16), 73 (100)	3 α , 17 ξ -Dihydroxy-5 β -androst-16- en-11-on, di- <i>TMS</i>	
9				
10	386	330 (16%), 296 (18), 281 (15), 257 (52), 239 (15), 135 (50), 129 (100)	nicht identifiziert 3 β -Hydroxy-pregna-5,16-dien-20- on, <i>TMS</i>	10
11				
12	448	448 (7%), 433 (6), 343 (10), 330 (3), 304 (66), 214 (100), 199 (35), 196 (40), 175 (42), 129 (52), 117 (30)	nicht identifiziert 3 β , 16 α -Dihydroxy-androst-5-en- 17-on, di- <i>TMS</i>	10-12 15, 16
13			nicht identifiziert	

14	478	478 (2%), 388 (9), 371 (2), 333 (4), 298 (32), 283 (12), 251 (9)	3 α , 6 α -Dihydroxy-5 β -pregnan-20-on, di- <i>TMS</i> + Beimengung von Peak 15	10
15	448	448 (24%), 433 (37), 343 (7), 304 (6), 251 (4), 240 (6), 225 (11), 214 (13), 210 (14), 199 (11), 171 (16), 129 (100)	3 β , 17 β -Dihydroxy-androst-5-en-16-on, di- <i>TMS</i> + Beimengung, 522, 507, 417	10, 13, 13 15, 16
16	464	284 (3%), 269 (2), 255 (1), 188 (1), 117 (100)	3 α , 20-Dihydroxy-5 β -pregnan, di- <i>TMS</i>	10
17	478	478 (4%), 463 (20), 420 (2), 388 (23), 373 (14), 345 (10), 230 (2), 298 (30), 283 (27), 255 (60), 240 (4), 186 (21), 172 (53), 159 (31), 157 (49), 109 (37), 73 (100)	3 α , 16 α -Dihydroxy-5 β -pregnan-20-on, di- <i>TMS</i>	10
18	522	522 (7%), 507 (1), 432 (25), 417 (5), 342 (16), 329 (17), 303 (6), 252 (14), 239 (32), 213 (15), 191 (12), 129 (32), 73 (100)	3 β , 16 β , 17 α -Trihydroxy-androst-5-en, tri- <i>TMS</i>	11, 15
19	478	478 (3%), 463 (11), 388 (29), 373 (7), 345 (16), 298 (11), 283 (20), 255 (25), 186 (11), 172 (34), 159 (27), 157 (37), 109 (49), 96 (12), 73 (100)	wahrscheinlich 3 α , 16 α -Dihydroxy-5 α -pregnan-20-on, di- <i>TMS</i>	
20	522	522 (7%), 507 (2), 432 (24), 417 (4), 342 (11), 329 (20), 305 (6), 252 (15), 239 (29), 313 (19), 191 (14), 129 (25), 73 (100)	3 β , 16 α , 17 β -Trihydroxy-androst-5-en, tri- <i>TMS</i>	10-13, 15, 16
21	520	520 (59), 505 (24), 430 (8), 417 (42), 415 (4), 340 (5), 327 (13), 325 (5), 257 (3), 237 (7), 230 (15), 217 (5), 199 (3), 172 (3), 147 (19), 129 (11), 73 (100)	nicht identifiziert	
22	550	550 (7%), 535 (9), 460 (10), 445 (10), 370 (4), 355 (2), 231 (100), 217 (8), 147 (25), 117 (42)	nicht identifiziert	

* *TMS* = Trimethylsilylderivat(-äther).

Peak Nr.	MG	MS	Struktur *	Literatur
23a	476	476 (5%), 461 (15), 386 (25), 371 (10), 343 (4), 330 (6), 296 (19), 281 (13), 257 (15), 186 (7), 172 (30), 159 (23), 157 (22), 129 (55), 109 (14), 73 (100)	3 β ,16 α -Dihydroxy-pregn-5-en-20-on, di- <i>TMS</i>	10-13, 15, 16
23b	504	504 (49%), 489 (5), 414 (11), 399 (2), 386 (15), 360 (10), 324 (9), 311 (20), 297 (12), 285 (12), 270 (8), 231 (9), 218 (4), 129 (26), 73 (100)	3,16 α ,17 β -Trihydroxy-östra-1,3,5(10)-trien, tri- <i>TMS</i>	10, 11
24	564	549 (3%), 521 (56), 474 (5), 459 (1), 431 (100), 405 (6), 391 (26), 369 (1), 341 (22), 315 (9), 251 (11), 225 (8), 211 (7), 197 (7), 143 (15), 129 (11), 117 (7)	wahrscheinlich 3 β ,16 α ,17 α -Trihydroxy-pregn-5-en-20-on, tri- <i>TMS</i>	
25	462	462 (2%), 447 (1), 372 (3), 357 (1), 282 (3), 267 (2), 231 (3), 117 (100)	3 β ,20 α -Dihydroxy-pregn-5-en, di- <i>TMS</i>	12
26	536	521 (10%), 431 (22), 417 (17), 404 (20), 191 (22), 129 (23), 73 (100)	Trihydroxyandrostanon, tri- <i>TMS</i>	10-12, 15
27	566	551 (8%), 476 (9), 461 (6), 386 (6), 371 (3), 296 (3), 217 (100), 172 (10), 159 (8), 157 (11)	1 ζ ,3 ζ ,16 ζ -Trihydroxy-pregnan-20-on, tri- <i>TMS</i>	10
28	610	595 (3%), 417 (100), 340 (2), 327 (4), 237 (4)	Androsten-tetrol, tetra- <i>TMS</i>	10-13, 15
29	610	610 (4%), 595 (2), 520 (6), 505 (3), 430 (5), 417 (64), 191 (100)	Androsten-tetrol, tetra- <i>TMS</i>	10-13, 15
30		521 (19%), 505 (100), 431 (27), 341 (4), 151 (3), 129 (5), 117 (8)	nicht identifiziert	
31	548	548 (8%), 533 (10), 458 (8), 443 (10), 368 (5), 353 (2), 231 (100), 117 (22)	nicht identifiziert	

32	638	638 (5%), 623 (7), 548 (10), 535 (3), 458 (4), 231 (100), 217 (35), 191 (16)	nicht identifiziert	
33	610	610 (3%), 595 (1), 520 (4), 191 (100)	Androsten-tetrol, tetra- <i>TMS</i>	10-13, 15
34	610	610 (1%), 595 (3), 520 (43), 505 (35), 430 (42), 417 (95), 404 (17), 390 (51), 191 (82), 129 (43)	Androsten-tetrol, tetra- <i>TMS</i>	10-13, 15
35	566	551 (7%), 476 (3), 449 (100), 431 (21), 359 (79), 341 (53), 269 (55), 251 (68), 129 (25), 117 (63)	3 β , 16 α , 17 α , 20 α -Tetrahydroxy-pregn-5-en, tri- <i>TMS</i>	10
36	550	550 (4%), 535 (1), 447 (10), 357 (7), 267 (100), 129 (24)	3 β , 20 α , 21-Trihydroxy-pregn-5-en, tri- <i>TMS</i>	10-12, 15
37	652	652 (57%), 637 (4), 562 (7), 547 (10), 331 (57), 318 (3), 305 (3), 243 (11), 117 (25), 73 (100)	3 α , 17 α , 21-Trihydroxy-5 β -pregnan-11,20-dion, tetra- <i>TMS</i>	
38			nicht identifiziert	
39	458	458 (35%), 443 (13), 368 (73), 353 (35), 329 (100), 129 (98)	3 β -Hydroxy-cholest-5-en, <i>TMS</i>	11
40	654	654 (3%), 564 (5), 331 (100), 305 (6), 243 (15), 169 (25), 147 (17)	wahrscheinlich 3 α , 11 β , 17 α , 21-Tetrahydroxy-5 β -pregnan-20-on, tetra- <i>TMS</i> + Beimengung 636, 546, 531	
41	638	638 (3%), 623 (2), 535 (100), 445 (96), 355 (42), 329 (8), 265 (38), 217 (49)	3 β , 16 α , 20 α , 21-Tetrahydroxy-pregn-5-en, tetra- <i>TMS</i>	10, 12
42	591	591 (20%), 501 (71), 411 (100), 321 (84), 129 (80)	nicht identifiziert	

* *TMS* = Trimethylsilylderivat(-äther).

am *GC* getrennt, in Glaskapillaren aufgefangen und davon dann Derivate hergestellt. Nach diesen Untersuchungen können die Peaks des in Abb. 1 reproduzierten Gaschromatogramms in folgender Weise charakterisiert werden:

Von den in Tab. 1 angeführten Steroiden waren Nr. 1, 5, 37 noch nicht als Bestandteile des Neugeborenenurins bekannt. Besonders bemerkenswert ist das Auffinden von Steroiden mit einer Carbonylgruppe in der Stellung 11, weil man bisher aus dem Fehlen solcher Steroide im Neugeborenenurin annahm, daß Babies nicht zur Bildung von Steroiden mit einer Sauerstofffunktion in Stellung 11 befähigt sind.

Darüber hinaus konnten durch das oben geschilderte Aufarbeitsverfahren noch eine Reihe bisher als Harnbestandteile unbekannter Spurensteroiden gefunden werden, die auch bei einer Analyse mit dem Glaskapillargaschromatographen (teils wegen ihrer kleinen Menge, teils, weil sie von größeren Peaks verdeckt sind) nicht faßbar sind. Von besonderem Interesse ist hierbei das Auffinden eines Steroids 46 mit einer Hydroxylgruppe in Stellung 11 und das Auftreten von Steroiden mit 3-Oxo-4-en-Struktur 44, 50, 53, 54. Das Vorhandensein von Steroiden mit einem 5,7-Diensystem im Harn war bisher ebenfalls noch unbekannt. Ob diesen Verbindungen eine physiologische Bedeutung zukommt, läßt sich noch nicht abschätzen.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft und Toto—Lotto-Mitteln des Landes Niedersachsen gefördert, wofür wir an dieser Stelle bestens danken.

Experimenteller Teil

Die gaschromatographische Trennung und Aufnahme der Massenspektren von freien Steroiden erfolgte mit einem Varian MAT-CH-7-Massenspektrometer, kombiniert über einen Separator (Biemann-Watson-Typ) mit einem Varian 1700-Gaschromatograph. Ionisierungsenergie 70 eV; 1,50 m-Glassäule (Innendurchmesser 2 mm, 3% SE-30 auf Chromosorb W, AW, DMCS, 80—100 mesh), Trägergas He, 20 ml/min, Injektortemp. 270 °C, Säulentemp. von 100 bis 300 °C, mit 10 °C/min programmiert.

Die Trennung und Aufnahme der Massenspektren von *TMS*-Äthern erfolgte mit einem LKB 2091-Massenspektrometer mit 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-Dünnschicht), Trägergas He, 2 ml/min, Injektortemp. 275 °C, Säulentemp. von 100 bis 300 °C, mit 2 °C/min programmiert.

Die Retentionsindizes der *TMS*-Äther wurden mit einem Varian 1400-Gaschromatographen gemessen. Detektor *FID*, Injektortemp. 275 °C, Temperaturprogramm: 100—300 °C, 2 °C/min; Dünnschichtglaskapillarsäulen (25 m, 0,3 mm Innendurchmesser) belegt nach statischer Methode²¹. Es wurde Alkaliglas (Hilgenberg-Glas, Malsfeld) verwendet; Kapillarsäulenziehgerät Hupe und Busch.

Extraktion und Trennung der Steroidfraktion

1. Einzelurinproben

2 ml Urin wurden auf eine Säule mit 5 g XAD-2²⁰ gegeben und mit 20 ml Wasser entsalzt. Die adsorbierten Stoffe wurden mit 30 ml Methanol eluiert. Der im Vak. getrocknete Methanolextrakt wurde mit 20 ml 0,1M-Acetatpuffer versetzt und mit 0,2 ml Helicase (3×10^6 Roy-Einheiten Sulfatase und 2×10^5 Fishman-Einheiten β -Glucuronidase) 3 Tage bei 38 °C inkubiert. Die freien Steroide wurden durch dreimalige Extraktion mit je 20 ml Essigester gewonnen. Der Essigesterextrakt wurde in 50 μ l Methanol gelöst und davon 1 μ l nach Silylierung zur Aufnahme der Steroidprofile verwendet.

2. Gepoolter Urin

900 ml Sammelurin von 2–6 Tagen alten Knaben wurden bis zur Verarbeitung bei – 18 °C gelagert. Die Schwebstoffe wurden durch Zentrifugation entfernt.

Zur Abtrennung der org. Bestandteile wurde der Urin auf eine Säule von 1 kg Adsorberharz Amberlite XAD-2 (Rohm & Haas) gegeben, mit 1,2 l Wasser entsalzt und die adsorbierten Stoffe mit 2 l Methanol eluiert. Der Methanolextrakt wurde in 300 ml Wasser aufgenommen und durch dreimaliges Ausschütteln mit je 300 ml Diäthyläther die freien Steroide (Fraktion A) extrahiert.

Die wäßr. Phase wurde mit Acetatpuffer auf pH 4,8 eingestellt und drei Tage unter N₂ bei 37 °C mit 20×10^6 Fishman-Einheiten β -Glucuronidase inkubiert. Die verseiften Steroide wurden 3mal mit je 300 ml Essigester extrahiert. Durch Ausschütteln mit 200 ml 2N-NaOH unter Eiskühlung wurden die sauren Bestandteile entfernt (**BI** = 217 mg). Der Essigesterextrakt (Fraktion **BI**) wog 258 mg.

Chromatographie an Sephadex LH-20

Fraktion A und **BI** wurden in je 20 ml Äthanol gelöst und auf eine Sephadex LH-20 Säule gegeben. Als Laufmittel wurde Äthanol verwendet. Nach einer Abnahme von 100 ml Vorlauf wurden je 7 Fraktionen aufgefangen (**A**₁–**A**₇ und **BI**₁–**BI**₇). Die Inhaltsstoffe dieser Fraktion wurden ohne Derivatisierung in der Kombination *GC*–*MS* untersucht. Wenn im Gaschromatogramm keine ausreichende Trennung angezeigt wurde, wurden die Sephadexfraktionen auf *DC*-Platten (20 \times 20 cm, 0,5 mm Schichtdicke, Laufmittel Chloroform/Methanol 9 : 1) vorgetrennt.

Fraktion A: Hauptmenge der Steroidfraktion war Cholesterin, diese Fraktion wurde nicht weiter untersucht.

Fraktion BI: Sephadex LH-20 Vortrennung.

Äthanoleluat	Fraktion	Inhaltsstoffe
100–280 ml	BI ₁	Cholesterin, β -Sitosterin
280–320 ml	BI ₂	Cholesterin, Pregnane
320–340 ml	BI ₃	Cholesterin, Pregnane, Androstane
340–360 ml	BI ₄	Pregnane, Androstane
360–380 ml	BI ₅	Pregnane, Androstane
380–440 ml	BI ₆	Pregnane, Androstane
440–640 ml	BI ₇	keine Steroide

*β -Sitosterin (43)*Sephadexfraktion **BI**₁, DC-Zone 2 (R_f 0,15—0,27).

MS: 414 (60, M^+), 399 (15), 396 (20), 381 (10), 354 (4), 329 (15), 303 (25), 285 (3), 273 (10), 255 (15), 231 (10), 214 (10), 213 (21), 205 (5), 199 (11), 185 (5), 173 (51), 159 (15), 145 (15).

*Cholest-4-en-3-on (44)*Sephadexfraktion **BI**₁, DC-Zone 3 (R_f 0,27—0,41).

MS: 384 (100, M^+), 369 (35), 356 (4), 353 (10), 342 (25), 327 (11), 300 (19), 299 (21), 286 (4), 271 (30), 261 (51), 255 (29), 245 (15), 229 (71), 201 (11), 175 (29), 161 (12), 147 (17), 133 (15), 124 (39).

*3 β -Hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-on (45)*Sephadexfraktion **BI**₂, DC-Zone 3 (R_f 0,27—0,41).

MS: 316 (80, M^+), 301 (22), 298 (10), 283 (50), 273 (74), 265 (19), 255 (86), 239 (12), 213 (14), 201 (21), 187 (22), 173 (30), 161 (51), 145 (45), 133 (42), 119 (48).

3 α ,11 β ,20 α -Trihydroxy-5 β -pregnan (46)

Sephadexfraktion **BI**₂, DC-Zone 2 (R_f 0,15—0,27). Retentionsindex: OV-101 2890 (Vergleichsverb.: 2887), SE-30 2900 (Vergleichsverb.: 2900).

MS: 336 (2, M^+), 318 (30), 285 (25), 274 (10), 267 (17), 255 (19), 246 (6), 241 (14), 232 (62), 214 (40), 199 (27), 187 (15), 174 (15), 173 (22), 160 (22), 159 (40), 147 (35), 133 (41).

*3 β ,17 α -Dihydroxy-pregn-5-en-20-on (47)*Sephadexfraktion **BI**₂, DC-Zone 2 (R_f 0,15—0,27).

MS: 332 (31, M^+), 317 (1), 314 (5), 299 (6), 289 (22), 271 (16), 253 (21), 245 (4), 239 (10), 213 (5), 199 (14), 185 (6), 171 (10), 159 (21), 145 (21).

*3 β -Hydroxy-pregn-5-en-20-on (48)*Sephadexfraktion **BI**₃, DC-Zone 3 (R_f 0,27—0,41).

MS: 316 (65, M^+), 301 (20), 298 (17), 283 (21), 273 (10), 265 (5), 255 (8), 241 (3), 231 (15), 213 (3), 205 (23), 187 (6), 173 (6), 159 (20), 145 (29).

3 α -Hydroxy-5 β -pregnan-20-on (49)

Sephadexfraktion **BI**₃, DC-Zone 4 (R_f 0,41—0,55). Retentionsindex: SE-30 2702 (Referenzsteroid SE-30, 2700).

MS: 318 (25, M^+), 300 (100), 285 (51), 272 (3), 267 (5), 258 (8), 246 (14), 229 (7), 215 (25), 205 (19), 204 (23), 191 (28), 190 (30), 187 (24), 175 (15), 161 (25), 145 (28), 131 (26).

*16 α -Hydroxy-androst-4-en-3,20-dion (50)*Sephadexfraktion **BI**₃, DC-Zone 5 (R_f 0,55—0,69).

MS: 302 (93, M^+), 284 (30), 274 (4), 271 (4), 260 (2), 245 (2), 243 (1), 230 (46), 229 (40), 215 (29), 212 (14), 199 (14), 188 (13), 187 (25), 174 (15), 173 (16), 124 (51), 105 (100).

3 β -Hydroxy-androsta-5,7-dien (51)

Sephadexfraktion **BI**₄, DC-Zone 5 (*R_f* 0,55—0,69).

MS: 272 (89, *M*⁺), 257 (20), 254 (51), 239 (100), 256 (5), 255 (6), 213 (38), 199 (30), 197 (16), 183 (19), 171 (17), 158 (23), 157 (27), 143 (64), 131 (41), 119 (61), 105 (61), 91 (92).

3 β -Hydroxy-androst-5-en (52)

Sephadexfraktion **BI**₄, DC-Zone 6 (*R_f* 0,69—0,84).

MS: 274 (34, *M*⁺), 259 (15), 256 (24), 241 (51), 214 (6), 199 (7), 189 (39), 173 (15), 163 (60), 145 (51), 135 (43), 119 (45), 105 (81), 91 (96), 41 (100).

Androst-4-en-3,17-dion (53)

Sephadexfraktion **BI**₅, DC-Zone 6 (*R_f* 0,68—0,84).

MS: 286 (57, *M*⁺), 271 (7), 268 (5), 258 (6), 244 (45), 229 (6), 216 (8), 215 (9), 201 (21), 187 (10), 173 (14), 159 (20), 148 (34), 124 (66), 91 (100).

Androst-4-en-3-on (54)

Sephadexfraktion **BI**₆, DC-Zone 6 (*R_f* 0,69—0,84).

MS: 272 (51, *M*⁺), 257 (20), 241 (5), 239 (10), 230 (81), 215 (29), 207 (39), 201 (20), 187 (89), 174 (25), 161 (31), 157 (40), 149 (21), 124 (38), 41 (100).

Synthese von 3 β -Hydroxy-androsta-5,7-dien

0,5 g Dehydroepiandrosteron wurden in 8 ml Triglykoll, 2,5 ml n-Butanol und 2 ml 98proz. Hydrazin unter Rückfluß erhitzt. Innerhalb von 2 Stdn. wurde 1 g KOH zugegeben. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert und das Reaktionsgemisch weitere 4 Stdn. auf 210 °C gehalten. Nach Umkristallisation aus Methanol wurden 0,4 g 3 β -Hydroxy-androst-5-en erhalten.

Dieses wurde in trockenem CCl₄ gelöst und mit 0,3 g N-Bromsuccinimid und 10 μ g Benzoylperoxid unter Rückfluß gekocht. Das entstandene Succinimid wurde abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt der Bromierung wurde mit 1,5 ml Collidin und 10 ml Xylol 1,5 Stdn. erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Collidinhydrobromid abfiltriert und das Filtrat mit verd. HCl gewaschen.

Das Reaktionsprodukt wurde in der Kombination Gaschromatograph—Massenspektrometer untersucht.

MS: 272 (91%, *M*⁺), 257 (21), 254 (55), 239 (100), 256 (5), 255 (7), 213 (40), 199 (31), 197 (14), 183 (15), 171 (15), 158 (25), 157 (26), 143 (69), 131 (41), 119 (58), 105 (58), 91 (89).

Herstellung der Trimethylsilyläther

Die Proben wurden in methanol. Lösung in kleine Reaktionsröhrchen gebracht und das Lösungsmittel abgesaugt. Nach Zusatz von 10 μ l N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoacetamid (*MSTFA*)²² wurden die Röhrchen zugeschmolzen und 24 Stdn. bei Zimmertemp. gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde ohne weitere Aufarbeitung in der Kombination GC—MS untersucht.

Literatur

- ¹ P. Eneroth, H. Ferngren, J.-Å. Gustafsson, B. Ivemark und A. Stenberg, *Acta endocr.* **70**, 113 (1972).
- ² F. L. Mitchell, C. H. L. Shackleton, J.-Å. Gustafsson und J. Sjövall, *Excerpta Med.*, Internat. Congr. Ser. No. 219 (1970).
- ³ R. W. M. Edwards und D. J. H. Trafford, *Biochem. J.* **108**, 185 (1968).
- ⁴ E. Kovats, *Helv. Chim. Acta* **41**, 1915 (1958).
- ⁵ K. Grob und G. Grob, *J. Chromatogr.* **62**, 1 (1971).
- ⁶ N. Neuner-Jehle, F. Etzweiler und G. Zarske, *Chromatographia* **6**, 211 (1973).
- ⁷ K. Birchall, D. M. Cathro, C. C. Forsyth und F. L. Mitchell, *Lancet* **1961**, 26.
- ⁸ D. M. Cathro, K. Birchall, F. L. Mitchell und C. C. Forsyth, *J. Endocrin.* **27**, 53 (1963).
- ⁹ W. L. Gardner, C. J. W. Brooks, E. C. Horning und R. M. Hill, *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 278 (1966).
- ¹⁰ C. H. L. Shackleton, J.-Å. Gustafsson und J. Sjövall, *Steroids* **17**, 265 (1971).
- ¹¹ P. G. Devaux, M. G. Horning, R. M. Hill und E. C. Horning, *Anal. Biochem.* **41**, 70 (1971).
- ¹² C. H. L. Shackleton und J.-Å. Gustafsson, *Steroids* **18**, 175 (1971).
- ¹³ E. M. Chambaz, C. J. W. Brooks, M. G. Horning, E. C. Horning und R. M. Hill, *C. R. hebdomad. Sé. Acad. Sci. Paris* **268**, 2817 (1969).
- ¹⁴ C. H. L. Shackleton, *J. Steroid Biochem.* **5**, 113 (1974).
- ¹⁵ R. A. Anderson, G. Defaye, C. Madani und E. M. Chambaz, *J. Chromatogr.* **99**, 485 (1974).
- ¹⁶ J. W. Reynolds, *Steroids* **8**, 719 (1966).
- ¹⁷ E. C. Horning, M. G. Horning, J. Szafranek, P. van Hout, A. L. German, J. P. Thenot und C. D. Pfaffenberger, *J. Chromatogr.* **91**, 367 (1974).
- ¹⁸ J. A. Luyten und G. A. F. Rutten, *J. Chromatogr.* **91**, 393 (1974).
- ¹⁹ M. G. Horning, A. M. Moss und E. C. Horning, *Anal. Biochem.* **22**, 284 (1968).
- ²⁰ M. Ende und G. Spiteller, *Mh. Chem.* **102**, 929 (1971).
- ²¹ H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, *Chem. Ber.* **103**, 1497 (1970) und spätere Arbeiten.
- ²² H. L. Bradlow, *Steroids* **11**, 265 (1968).
- ²³ J. Bouche und M. Verzele, *J. Gaschromatogr.* **6**, 501 (1968).
- ²⁴ J. Donike, *J. Chromatogr.* **42**, 103 (1969).

Korrespondenz und Sonderdrucke:

Prof. Dr. G. Spiteller
Organisch-Chemisches Institut
Universität Göttingen
Tammannstraße 2
D-3400 Göttingen
Bundesrepublik Deutschland