

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON 3 β -HYDROXY-5,16-PREGNADIEN-20-ON AUS DEM URIN EINES NEUGEBORENEN MIT ADRENOGENITALEM SYNDROM

NIELS E. BRANDSTRUP

Barnstukhuset Göteborg, Schweden*

und

LÁSZLÓ R. TREIBER

Klin. Kem. Institut. Sahlgrenska Sjukhuset, 413 45 Göteborg, Schweden

(Received 10 November 1970)

SUMMARY

5 mg 3 β -Hydroxy-5,16-pregnadien-20-one were isolated from urine of a two days old girl with adrenogenital syndrome. The above mentioned steroid was determined either after enzymatic hydrolysis or after a mild ether-perchloric acid solvolysis by the help of photometry and gas-liquid chromatography. The separation of the compound was accomplished using thin layer chromatography. The identification of the free compound and its derivatives was carried out by gas chromatography-mass spectrometry. The treatment with cortisone acetate resulted in an improvement of the patient's condition and at the same time the suppression of the 16-dehydropregnenolone excretion into the urine. This steroid fraction did not reappear later, despite administration of ACTH.

DIE chemisch-methodische Entwicklung der letzten Jahre ermöglichte die Charakterisierung zahlreicher Steroide im Urin und Blut von Neugeborenen. Die gaschromatographischen Untersuchungen von Gardiner *et al.*[1] haben gezeigt, daß die 16 α -Hydroxy- und 16-Oxo-derivate von C₁₉- und C₂₁- Steroiden unmittelbar nach der Geburt besonders reichlich mit dem Urin ausgeschieden werden. Nach Shackleton und Mitchell[2] nimmt die ausgeschiedene Menge bis zu dem dritten-vierten Tag des Lebens zu, dann erfolgt ein signifikanter Konzentrationsabfall. Letztere Autoren haben neben den gesunden Neugeborenen auch zwei Fälle von adrenogenitalem Syndrom untersucht und auf eine stark erhöhte 16 α -Hydroxypregnenolon†-Ausscheidung hingewiesen.

Die vorliegende Arbeit berichtet über einen Fall von adrenogenitalem Syndrom und über die Charakterisierung der Steroid-hauptfraktion im Urin.

FAMILIENANAMNESE UND KRANKENGESCHICHTE DER PATIENTIN

Beide Eltern sind gesund. Die ersten beiden Kinder des Ehepaares (ein Knabe, geb. 1956 und ein Mädchen, geb. 1959) wurden mit adrenogenitalem Syndrom geboren. Beide haben von der Geburt an Salz verloren. Kurz nach der Ent-

*Gegenwärtige Anschrift: Pædiatrisk Afdeling, Centralsygehuset, 3400 Hillerød, Danmark.

†Abkürzungen und Trivialnamen; Aldosteron: 18,11-Hemiacetal von 11 β ,21-Dihydroxy-3,20-dioxo-4-pregnen-18-al; Androsteron: 3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-on; Ätiocholanolon: 3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on; Cortisonacetat (Cortone): 17 α ,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,11-20-trion-21-Acetat; Dehydroepiandrosteron: 3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on; 16-Dehydropregnenolon: 3 β -Hydroxy-5,16-pregnadien-20-on; Desoxycorticosteron (DOCA): 21-Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion; 9 α -Fluor-cortisol (Fluorinef): 9 α -Fluor-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion; 16 α -Hydroxypregnenolon: 3 β ,16 α -Dihydroxy-5-pregnen-20-on; Pregnantriol: 5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol; Testosteron: 17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on.

bindung wurde die Desoxycorticosteron* – und Cortisonacetat† – Behandlung eingesetzt. Das Mädchen erhielt zusätzlich auch 9 α -Fluorcortisol‡. Ihre stark vergrößerte Clitoris wurde operativ entfernt. Beide Kinder bekamen über die Hormonbehandlung hinaus auch regelmäßigen Natriumchloridzufuhr. Das dritte Kind, ein Mädchen (geb. 1963) ist völlig gesund.

Das vierte (G.J.) von uns in vorliegender Arbeit näher beschriebene Kind wurde am 9.8.1969 geboren. Die Gravidität war normal abgesehen von kleineren Blutungen, die einer Cervixerosion zugeschrieben wurden. Die Neugeborene zeigte die typischen Züge eines adrenogenitalen Syndroms: erheblich vergrößerte Clitoris. Urethra und Vagina vereinigen sich zu einer gemeinsamen Mündung an der Basis der Clitoris. Hyperpigmentierung an den Genitalorganen und Mamillae. Zeichen von Austrocknung. Am siebenten Tag trat Erbrechen ein. Die Patientin hatte zusätzlich Hyperbilirubinämie mit einem Maximum von 16,8 mg% am fünften Lebenstag.

Während der ersten Woche wurde das adrenogenitale Syndrom nicht behandelt, die Analysen spiegeln also den natürlichen Zustand wieder. Eine routinemäßige 17-Ketosteroidbestimmung [3, 4] ergab 4,4 mg/24 Stn.. Pregnantriol und Porter-Silber-positive [5] Steroide konnten nicht nachgewiesen werden, die Ausscheidung von 17-ketogenen Steroiden [6] betrug 1,6 mg/24 Stn. (Tabelle 1.).

Dieser klinische Hintergrund gab Anlass dazu, über die Routinebestimmungen hinaus die einzelnen Steroidfraktionen zu untersuchen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Aufarbeitung des Urins

(1) Enzymatische Hydrolyse: 1/10 des 24-Stunden-Urins wurde nach der Vorschrift von Shackleton und Mitchell [2] aufgearbeitet. Die mit Acetatpuffer auf pH 4,75 eingestellte Probe wurde mit *Helix pomatia* (1000 IE β -Glucuronidase + 5000 IE Sulfatase/ml Urin) bei 37°C über zwei Tage inkubiert. Die freigesetzten Steroide extrahierte man mit Chloroform. Nach Waschen mit 1 N NaOH, Wasser und Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat enthielt die Chloroformphase die gesamten neutralen Steroide.

(2) Äther-Perchlorsäure-Solvolyse [7]: 10 ml Urin wurde mit Ammoniumsulfat gesättigt, mit 1 ml 37-proz. HCl angesäuert und dreimal mit je 10 ml Äthylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen neutralisierte man mit 0,5 ml 25-proz. NH₄OH. Die Probe wurde sodann zur Trockne eingedampft und nach Zugabe von 30 ml Äther, in welchem vorher bis zur Sättigung 70-proz. Perchlorsäure gelöst wurde, fest verschlossen und während 24 Stunden bei 37°C gehalten. Die Extraktion und das Waschen erfolgten auf der unter (1) beschriebenen Weise.

(3) Isolierung und Charakterisierung der Hauptfraktion: Beide Extrakte wurden dünnschicht- und gaschromatographisch sowohl direkt als auch nach Derivatbildung untersucht. Um eine Übersicht zu erhalten, wurden die freigesetzten Substanzen ohne Vorreinigung gaschromatographisch studiert (Abb. 1). Unter denselben Bedingungen wurden auch die Gaschromatogramme der nach Clark und Wotiz [8] hergestellten Acetate (Abb. 2) aufgenommen. Unter gas-

*"DOCA", N. V. Organon, Oss, Holland.

†"Cortone", Merck Sharp & Dohme International, 110 Church Street, New York, U.S.A.

‡"Florinef", E. R. Squibb & Sons, Inc., New York, U.S.A.

Tabelle 1. Steroidausscheidung der Patientin G. J. (geb. am 9.8.1969) unter verschiedenen Behandlungen

Alter:	2 Tage	18 Tage	6 Wochen	7 Monate
Behandlung:	keine	Cortisonacetat: täglich 3 x 10 mg NaCl: täglich 4 x 0,5 mg	ACTH*: 20 IE	Cortisonacetat: täglich 2 x 5 mg
Analysierte Substanz bzw. Substanzgruppe				
11-oxygenierte 17-Ketosteroide [7]	< 20 μ g/24 Stn.	< 20 μ g/24 Stn.	0.23 mg/24 Stn.	0.1 mg/24 Stn.
Dehydroepiandrosteron [7]:	< 20 μ g/24 Stn.	< 20 μ g/24 Stn.	< 20 μ g/24 Stn.	0.20 mg/24 Stn.
Ätioholanolon [7]:	< 20 μ g/24 Stn.	< 20 μ g/24 Stn.	36 μ g/24 Stn.	0.25 mg/24 Stn.
Androsteron [7]:	< 20 μ g/24 Stn.	< 20 μ g/24 Stn.	110 μ g/24 Stn.	0.44 mg/24 Stn.
Testosteron [12]:	< 1 μ g/24 Stn.	< 1 μ g/24 Stn.	< 1 μ g/24 Stn.	nicht analysiert
16-Dehydropregnenolon:	5 mg/24 Stn.	0.2 mg/24 Stn.	< 10 μ g/24 Stn.	< 10 μ g/24 Stn.
Gesamte 17-Ketosteroide [3, 4]:	4.4 mg/24 Stn.	0.4 mg/24 Stn.	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Gesamte 17-ketogene Steroide [6]:	1.6 mg/24 Stn.	2.6 mg/24 Stn.	0.6 mg/24 Stn.	4.6 mg/24 Stn.
Porter-Silber-Chromogene [5]:	nicht nachweisbar	2.2 mg/24 Stn.	nicht nachweisbar	nicht analysiert

*Acton prolongatum: Ferring AB, Malmö/Schweden.

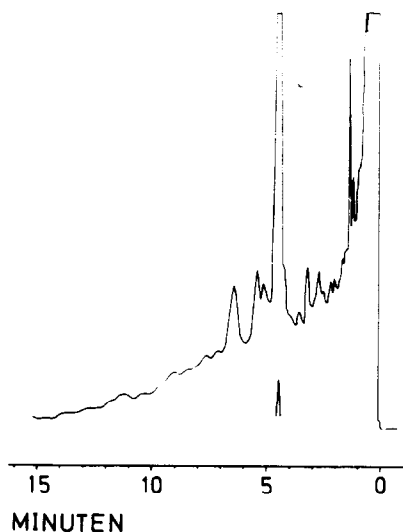


Abb. 1. Gaschromatogramm der gesamten neutralen Steroide. Versuchsbedingungen: Instrument: Hewlett-Packard Gaschromatograph, Typ F & M 402 mit Flammenionisationsdetektor. Einspritzblock: 260°C; Säule: 240°C (konstant); Detektor: 280°C; Trägergas: Helium, 50 ml/Min.; Säulefüllung: 3% UCC-W 982 auf Gas Chrom Q 80-100 mesh; Länge der Säule: 120 cm; Durchschnitt der Säule: 3 mm.

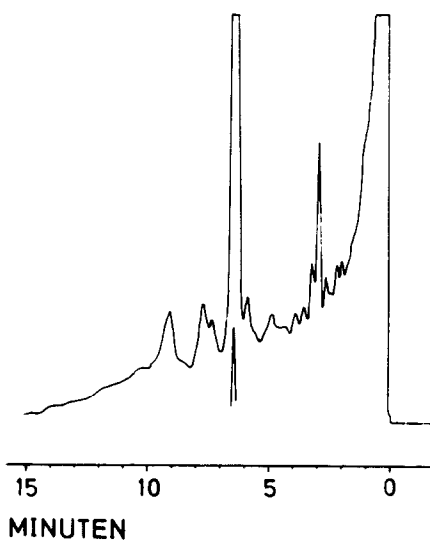


Abb. 2. Gaschromatogramm der Acetate der gesamten neutralen Steroide; Versuchsbedingungen: Siehe Abb. 1.

chromatographischer Kontrolle wurden die freien Fraktionen und Acetate dünn-schichtchromatographisch gereinigt und zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse vorbereitet. Die freigesetzten Substanzen wurden in den Systemen Chloroform-Dioxan (94:6 v/v), Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (4:1 v/v) und Benzol-Äthylacetat (4:1 v/v) chromatographiert. Für die Chromatographie der Acetate wurden die Systeme Benzol-Äthylacetat (9:1 v/v), Benzol-

Diisopropyläther (9:1 v/v) und Chloroform herangezogen. Die Trennung erfolgte jedesmal auf aktiviertem Kieselgel G (Schichtdicke: 0,25 mm). Zur Lokalisierung der Fraktionen auf der Trennschicht hat man das Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer (C. Zeiss, Oberkochen/Württ., Bundesrepublik Deutschland) herangezogen.

Auf einem anderen Wege wurden die nach Treiber und Oertel[9] in die 2,4-Dinitrophenylhydrazonderivate überführten Oxofractionen dünnstichtchromatographisch isoliert. Die gereinigten Substanzen wurden photometriert ($\lambda_{\max.} = 383 \text{ nm}$), anschließend mit Athanol konz. Schwefelsäure-Reagenz[10] angefärbt und erneut photometriert ($\lambda_{\max.} = 405 \text{ nm}$). Zur Identifizierung wurde die durch Dünnschicht- und Gaschromatographie isolierte Hauptfraktion einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen (Abb. 3).

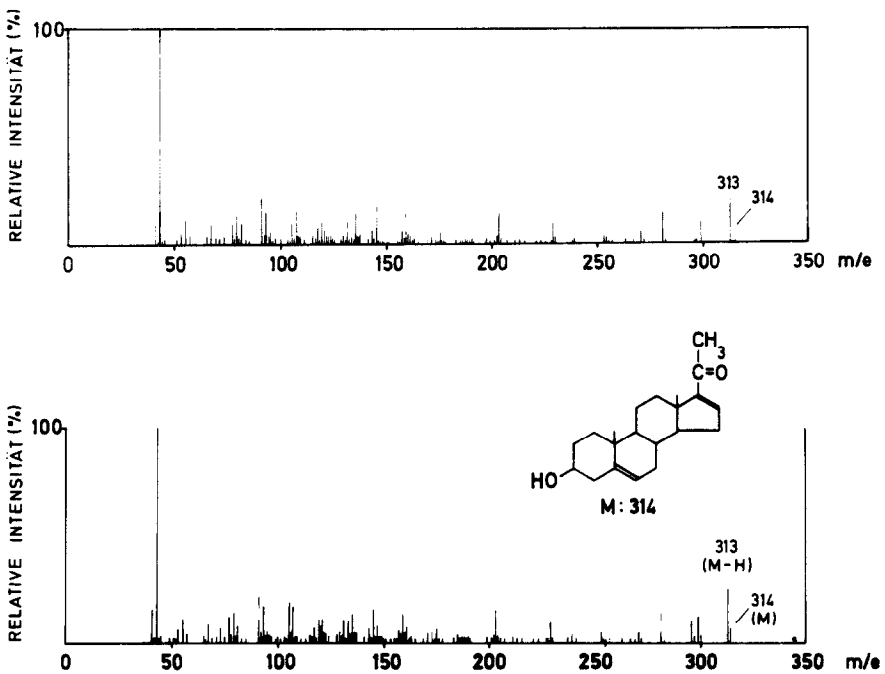


Abb. 3. Massenspektrogramm von 16-Dehydropregnenolone. Oben: Aus dem Urin isolierte Substanz. Unten: authentisches Material. Versuchsbedingungen: Instrument: LKB gas chromatograph-mass spectrometer, Type 9000 (LKB-Produkte AB., Stockholm-Bromma 1, Sweden). Gaschromatograph: Einspritzblock: 250°C; Säule: 230°C; Trägergas: Helium, 40 ml/Min.; Säulefüllung: 3% SE-30 auf Gas Chrom Q 80-100 mesh. Massenspektrometer: Ionenquelle: 290°C; Separator: 260°C; Ionisationsenergie: 70 eV.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Obgleich die routinmäßige 17-Ketosteroidbestimmung[3,4] mit dem klinischen Bild scheinbar übereinstimmte (4,4 mg/24 Stn.), so wurden weitere Untersuchungen auf Grund der Familienanamnese und widersprüchlichen Analyseergebnisse unbedingt notwendig. Die parallel durchgeführten dünnsticht- und gaschromatographischen Untersuchungen zeigten nämlich keine erhöhte 17-Ketosteroidausscheidung (Tabelle 1). Dagegen wurde eine Fraktion isoliert,

welche in einer Menge von 5 mg/24 Stn. ausgeschieden wurde und mit Zimmermann-Reagenz positive Reaktion gab ($\lambda_{\max.} = 510 \text{ nm}$). Das 2,4-Dinitrophenylhydrazon hat sein Absorptionsmaximum bei 383 nm. Die freie Verbindung konnte auch mit Hilfe des Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometers bei 240 nm lokalisiert werden, sodaß die Anwesenheit einer α,β -ungesättigten Oxogruppe bewiesen wurde[9]. Neben der Oxogruppe konnte man auch eine acetylierbare Hydroxylfunktion nachweisen. Gas- und dünnschichtchromatographische Vergleichsuntersuchungen haben die Möglichkeit ausgeschlossen, daß es sich hier um ein Steroid mit mehr als je eine Oxo- und Hydroxylgruppe handelt. Die Retentionszeiten der freien und acetylierten Substanz (4.5 bzw. 6.5 Min.) stehen in guter Übereinstimmung mit den Verhältnissen bei den entsprechenden Pregnenolonderivaten (5.0 bzw. 7.0 Min.) unter denselben Bedingungen. Die unbekannte Verbindung und ihre Derivate zeigten in den verschiedenen chromatographischen Systemen stets niedrigere Polarität, als die 11-oxygenierten 17-Keto-3-ole oder sogar Testosteron.

Nach den vorangehenden Resultaten bestand die Aufgabe lediglich darin, die ermittelte Hydroxy- und α,β -ungesättigte Oxogruppe im Pregnanskelett zu lokalisieren.

Man hat die Erfahrungstatsache zur Hilfe gezogen, daß die Stellen 3 und 20 unter physiologischen Bedingungen von Hydroxyl- und Ketogruppen bevorzugt belegt werden.

Es wurde neulich gezeigt, daß α,β -ungesättigte Ringketone, wie Testosteron, Testosteronacetat, Aldosteron- γ -lacton syn- und anti-2,4-Dinitrophenylhydrazone ergeben, die sich im System Benzol-Äthylacetat (4:1 v/v) auftrennen lassen[12]. Unter denselben Bedingungen erhielt man aus der unbekannt Substanz nur eine Fraktion. Dieser Befund deutete auf eine Δ^{16} -20-Keto-Konfiguration hin.

Analog zu den 3β -Hydroxy- Δ^5 -steroiden[13], wie Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon u.s.w. gelang es auch hier nicht durch CrO_3 /Eisessig-Oxydation ein charakteristisches Diketoderivat zu erhalten. Die positive Oertel-Eik-Nes-Reaktion[10] ergab einen weiteren Beweis für die vermutete 3β -Hydroxy- Δ^5 -Struktur.

An Hand der vorangehenden Resultate hat man Vergleichsuntersuchungen mit authentischem 3β -Hydroxy-5.16-pregnadien-20-on durchgeführt, wobei auch die gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung (Abb. 3) positiv ausfiel.

Reynolds *et al.*[14, 15] konnten während der letzten Zeit aus der normalen menschlichen Plazenta 4.16-Pregnadien-3.20-dion isolieren und das Vorkommen von 16-Dehydropregnenolon ausschließen. Über die Existenz von 16-Dehydropregnenolon im Faeces von Neugeborenen unter normalen Bedingungen wurde von Gustavsson *et al.*[16] soeben berichtet. Letztere Autoren konnten diese Substanz im Urin nur in Spuren nachweisen.

Es ist bis heute nicht bekannt, welcher Platz im Steroidmetabolismus dem neulich gefundenen 16-Dehydropregnenolon zugeordnet werden kann. Dadurch jedoch, daß die letztgenannte Substanz in diesem Falle des adrenogenitalen Syndroms als Hauptfraktion erschien, kommt man zwangsläufig zu der Annahme, daß der metabolische Defekt in einem mangelhaften Enzymsystem zu suchen ist, wodurch die Bildung der für die ersten Lebensstage charakteristischen 16α -Hydroxysteroido blockiert wurde.

Die am siebenten Lebenstag eingesetzte Cortisonacetat-Behandlung sowie Natriumchloridzufuhr bewirkte eine rasche Verbesserung des Zustandes der Patientin. Die nach einwöchiger Behandlung durchgeführte Analyse zeigte einen starken Abfall der 16-Dehydropregnenolon-Ausscheidung. Während der sechsten Woche nach der Entbindung wurde ein ACTH-Test vorgenommen. Die Analysen zeigten keine wesentliche Erhöhung der Steroidausscheidung. 16-Dehydropregnenolon konnte gleichzeitig nicht nachgewiesen werden. Die bisher zur Verfügung stehenden Angaben lassen vermuten, daß der von uns isolierten Substanz eine diagnostische Bedeutung zukommt.

ANMERKUNG

Herrn Prof. Dr. Egon Diczfalusy (Karolinska Sjukhuset, Stockholm) sei hiermit für wertvolle Diskussionen und Ratschläge bestens gedankt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. W. L. Gardiner, C. J. W. Brooks, E. C. Horning and R. M. Hill: *Biochim. biophys. Acta* **130** (1966) 278.
2. C. H. L. Shackleton and F. L. Mitchell: *Steroids* **10** (1967) 359.
3. W. Zimmermann und D. Pontius: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **297** (1954) 157.
4. I. Ernest, B. Håkansson, J. Lehmann and B. Sjögren: *Acta endocrinol. (Kbh.)* **46** (1964) 552.
5. R. M. Silber and C. C. Porter: *Meth. Biochem. Anal.* **4** (1957) 139.
6. J. D. Few: *J. Endocrin.* **22** (1961) 31.
7. L. Treiber and G. W. Oertel: *Clin. chim. Acta* **17** (1967) 81.
8. S. J. Clark and H. H. Wotiz: *Steroids* **2** (1963) 535.
9. L. Treiber und G. W. Oertel: *Z. klin. Chem. klin. Biochem.* **5** (1967) 83.
10. G. W. Oertel and K. B. Eik-Nes: *Anal. Chem.* **31** (1959) 98.
11. L. Treiber, W. Rindt und G. W. Oertel: *Z. klin. Chem. klin. Biochem.* **5** (1967) 102.
12. L. Treiber: unveröffentlichte Ergebnisse (1969).
13. L. Treiber: *Zur Bestimmung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin*, Dissertation, Saarbrücken (1968).
14. J. W. Reynolds, N. Wiqvist and E. Diczfalusy: *Biochem. biophys. Acta* **176** (1969) 886.
15. J. W. Reynolds, N. Wiqvist and E. Diczfalusy: *Acta endocrinol. (Kbh.)* **61** (1969) 533.
16. J.-Å. Gustafsson, C. H. L. Shackleton and J. Sjövall: *Acta endocrinol. (Kbh.)* **65** (1970) 18.

APPENDIX

Beim Abschluß der Untersuchungsserie war die Patientin sieben Monate alt. Sie erhielt täglich zweimal 5 mg Cortisonacetat und sie befand sich in gutem Gesundheitszustand. Ihre Entwicklung entsprach ihrem Alter. Ihre Steroidausscheidung im Urin wurde als normal bezeichnet. Eine plastische Operation wurde an den Genitalorganen mit Erfolg durchgeführt.