

Reaktion von Nitrophenylpropionat mit *N*^ε-Acetyl- lysin-methylamid*

Von

Helmut Zahn und Edgar Th. J. Fölsche**

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule
Aachen

(Der Schriftleitung zugegangen am 10. Februar 1966)

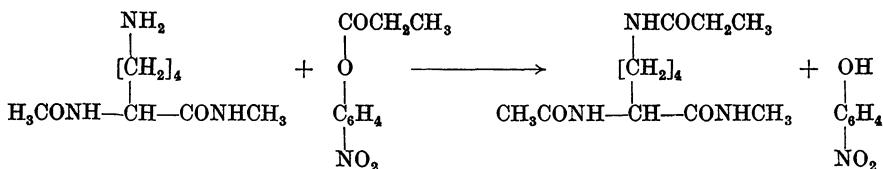
In einer früheren Mitteilung¹ wurde die Darstellung der an der α-Aminogruppe acetylierten Methylamide der trifunktionellen Aminosäuren Lysin, Histidin, Serin und Tyrosin beschrieben. In diesen Verbindungen liegen die Seitenkettenfunktionen frei vor und ihre Reaktivitäten dürften wegen des Fehlens ionischer Endgruppen oder sperriger Schutzgruppen dem Verhalten einer proteingebundenen trifunktionellen Aminosäure ähneln.

Gemeinsam mit Rouette und Schade² wurden *p*-Nitrophenylester von Dicarbonsäuren, z. B. Sebacinsäure, als Vernetzungsmittel für Faserproteine wie Kollagen und Wolle erkannt. Die Frage, mit welchen Seitenkettengruppen im Protein diese aktivierten Ester reagieren, läßt sich nur durch indirekte Methoden klären.

In der vorliegenden Mitteilung wird daher die Reaktivität der genannten Peptidmodelle gegenüber dem *p*-Nitrophenylester der Propionsäure beschrieben.

I. Umsetzungen am Autotitrator

Bei der Acylierung der ε-Aminogruppe des Lysinderivates mit *p*-Nitrophenylpropionat wird ein Äquivalent Nitrophenol freigesetzt.



* 6. Mitteil. über Nitrophenylester; 5. Mitteil. vgl. J. Schnell u. H. Zahn, Kolloid-Z. **203**, 27 [1965].

** Teil der Diplomarbeit, Abt. Chemie der Rhein.-Westf. Techn. Hochschule Aachen, 1964.

¹ H. Zahn u. K. Mella, diese Z. **344**, 75 [1966].

² H. Zahn, H.-K. Rouette u. F. Schade, CIRTEL Paris, Sect. II, S. 378 [1965].

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen (vgl. Tab. 1) war ein Teil der Aminogruppen protoniert. Daher ergab der Autotitratorenversuch bei konstantem pH einen Mehrverbrauch an Natronlauge.

Tab. 1. Umsetzung von 1 mMol Acetyl-aminosäure-methylamid in 30 ml 75proz. wäßr. Dimethylformamid und 1 mMol Propionsäure-*p*-nitrophenylester in 20 ml 75proz. Dimethylformamid am Autotitratoren bei den angegebenen pH-Werten ($t = 25^\circ$).

<i>N</i> $^\alpha$ -Acetyl-methylamid von	pH	Titrationen-dauer [Std.]	Verbrauch ml 0,1N NaOH	Reaktion
Lysin	10,0	5	16,6	Acylierung
Histidin	10,0	5	19,5	katalysierte Verseifung
Serin	9,6	5	2,4	keine Reaktion
Tyrosin	9,9	3	1,8	keine Reaktion

Das Acylierungsprodukt wurde papierchromatographisch nachgewiesen. Der annähernd doppelte Natronlaugeverbrauch und das Fehlen eines Reaktionsproduktes beim *N* $^\alpha$ -Acetyl-histidin-methylamid ist durch Annahme einer katalysierten Verseifung des Nitrophenylesters zu erklären. Damit bestand Übereinstimmung mit gleichen Beobachtungen, die an anderen Histidinderivaten gemacht wurden³.

N $^\alpha$ -Acetyl-tyrosin-methylamid und *N* $^\alpha$ -Acetyl-serin-methylamid haben unter den gewählten Bedingungen nicht reagiert. Der geringe Verbrauch an Natronlauge war auf die alkalische Verseifung des Nitrophenylesters zurückzuführen.

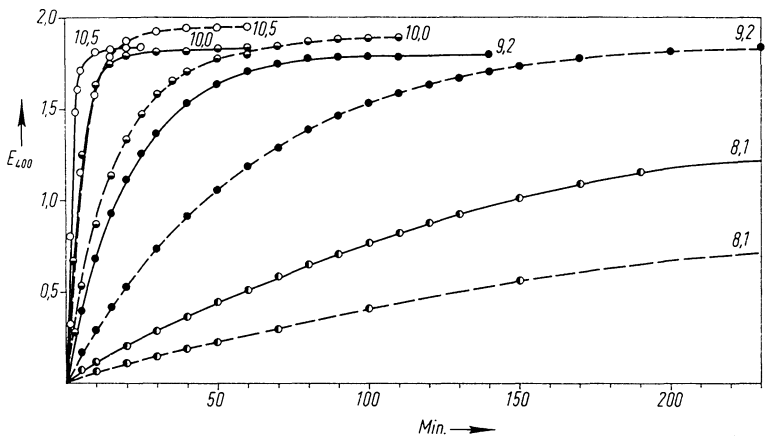
Diese Befunde bestätigen die Annahme², daß Nitrophenylsebacat in Wolle fast ausschließlich mit den ϵ -Aminogruppen des proteingebundenen Lysins reagiert. Die Autoren fanden eine Übereinstimmung zwischen der Abnahme der Zahl der Lysin- ϵ -Aminogruppen und der Zunahme der kovalenten Bindung von Sebacinsäure.

II. Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante der Acylierung der ϵ -Aminogruppe des Lysin-Modells wurden Messungen im Spektralphotometer durchgeführt. Es wurde in gepufferten Lösungen gearbeitet und durch Zugabe von Kochsalz die Ionenstärke 0,16 eingestellt. *N* $^\alpha$ -Acetyl-lysin-methylamid war im Überschuß vorhanden, so daß eine Reaktion pseudoerster Ordnung resultierte.

Verfolgt wurde die Extinktion der Lösung bei 400 m μ (Absorption des *p*-Nitrophenolat-Ions) in Abhängigkeit von der Zeit (s. Abbildung). Da im betrachteten Konzentrationsbereich das Lambert-Beersche

³ W. L. Koltun, L. Ng u. F. R. N. Gurd, J. biol. Chemistry **238**, 1367 [1963]; F. Schneider, diese Z. **334**, 26 [1963]; B. S. Hartley, Annu. Rep. Progr. Chem. **51**, 303 [1954]; Th. C. Bruice u. G. L. Schmir, Arch. Biochem. Biophysics **63**, 484 [1956].



Verseifung des Propionsäure-*p*-nitrophenylesters (gestrichelte Kurven) und Acylierung von N^{α} -Acetyl-lysin-methylamid (ausgezogene Kurven) durch Propionsäure-*p*-nitrophenylester bei verschiedenen pH-Werten (an den Kurven angegeben).
 $t = 20,0 \pm 0,3^{\circ}$.

Gesetz gültig war⁴, konnte die Geschwindigkeitskonstante k nach der Gleichung

$$k = \frac{2,303}{t} \cdot \lg \frac{E_{\infty} - E_0}{E_{\infty} - E_t}$$

E_{∞} = Extinktion für $t \rightarrow \infty$
 E_0 = Extinktion für $t = 0$
 E_t = Extinktion zur Zeit t

berechnet oder durch Auftragen des logarithmischen Faktors gegen t graphisch aus der Steigung der erhaltenen Geraden ermittelt werden. E_0 war bei allen Messungen gleich null. Für E_{∞} wurde der Wert eingesetzt, der sich ergab, wenn nach weitgehendem Ablauf der Reaktion in einem größeren Zeitraum keine merkliche Änderung der Extinktion mehr zu verzeichnen war.

Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_b mußte um die Konstante k_w der gleichzeitig verlaufenden Hydrolyse des Nitrophenylesters vermindert werden, da die Beziehung

$$k_b = k_1 + k_w$$

angenommen wurde⁴. k_w wurde jeweils in einer Lösung des Propionsäureesters von gleichem pH-Wert, gleicher Temperatur und Ionenstärke in Abwesenheit des Lysinderivates bestimmt.

Bei Division der so erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten k_1 durch die wirksame Konzentration der Lysinbase konnte die wahre Konstante

⁴ W. L. Koltun, R. N. Dexter, R. E. Clark u. F. R. N. Gurd, J. Amer. chem. Soc. 80, 4188 [1958].

der Acylierungsreaktion, die nach zweiter Ordnung verläuft⁵, ermittelt werden:

$$k_2 = \frac{k_1}{c_w}.$$

Die wirksame Konzentration $c_w = [A^\ominus]$ mußte aus pK'_a , pH und Gesamtkonzentration an Lysinderivat c berechnet werden nach den Beziehungen

$$pK'_a = \text{pH} + \lg \frac{[\text{AH}]}{[A^\ominus]} \text{ und } c = [\text{AH}] + [A^\ominus].$$

Die gemessenen Werte sind in Tab. 2 und 3 zusammengefaßt.

Tab. 2. Verseifung von Propionsäure-*p*-nitrophenylester (10^{-4}M).
 $\mu = 0,16$, $t = 20,0 \pm 0,3^\circ$; 1,9 Vol.-% Äthanol in Wasser.

pH	$[\text{OH}^\ominus]$ [Mol · l ⁻¹]	k_w [Min. ⁻¹]
8,1	$1,25 \cdot 10^{-6}$	$2,51 \cdot 10^{-3}$
9,2	$15,80 \cdot 10^{-6}$	$17,50 \cdot 10^{-3}$
10,0	$100,00 \cdot 10^{-6}$	$60,00 \cdot 10^{-3}$
10,5	$316,00 \cdot 10^{-6}$	$168,00 \cdot 10^{-3}$

Tab. 3. Umsetzung von *N*^α-Acetyl-lysine-methylamid ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$) mit Propionsäure-*p*-nitrophenylester (10^{-4}M).
 $\mu = 0,16$, $t = 20,0 \pm 0,3^\circ$, $pK'_a = 10,4$; 1,9 Vol.-% Äthanol in Wasser.

pH	$[\text{OH}^\ominus]$ [Mol · l ⁻¹]	c_w [Mol · l ⁻¹]	k_b [Min. ⁻¹]	k_1 [Min. ⁻¹]	k_2 [Mol ⁻¹ · Min. ⁻¹ · l]
8,1	$1,25 \cdot 10^{-6}$	$9,970 \cdot 10^{-6}$	$5,13 \cdot 10^{-3}$	$2,62 \cdot 10^{-3}$	263
9,2	$15,80 \cdot 10^{-6}$	$1,186 \cdot 10^{-4}$	$48,40 \cdot 10^{-3}$	$30,90 \cdot 10^{-3}$	260
10,0	$100,00 \cdot 10^{-6}$	$5,690 \cdot 10^{-4}$	$219,00 \cdot 10^{-3}$	$159,00 \cdot 10^{-3}$	278
10,5	$316,00 \cdot 10^{-6}$	$1,114 \cdot 10^{-3}$	$536,00 \cdot 10^{-3}$	$368,00 \cdot 10^{-3}$	330

k_w und k_2 , jeweils gegen $[\text{OH}^\ominus]$ aufgetragen, ergab eine Gerade, deren Steigung die katalytische Wirksamkeit der Hydroxylionen zum Ausdruck brachte.

Die für die Acylierungsreaktion bei pH 10 gefundene Konstante $k_2 = 278 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot \text{l}$ entspricht in der Größenordnung der Geschwindigkeitskonstante $k_2 = 640 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot \text{l}$, die Gurd et al.³ für die Umsetzung von ε-Amino-capronsäure mit *p*-Nitrophenylacetat bei 25°, pH 10 und $\mu = 0,16$ ermittelten.

Wir danken Herrn Dr. Klaus Mella für die Überlassung von *N*^α-Acetyl-L-histidin-methylamid. Weiter danken wir dem Gesamtverband der Textilindustrie in der Bundesrepublik Deutschland — Gesamttextil — e. V., Frankfurt/Main, der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen, Bonn, für die Förderung des Forschungsvorhabens Nr. 823. Ferner danken wir dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf. Dem Verband der Chemischen Industrie, Düsseldorf, und seinen Mitgliedsfirmen danken wir für die Überlassung von Chemikalien im Rahmen von Hochschullieferungen.

⁵ W. P. Jencks u. J. Carriuolo, J. Amer. chem. Soc. **82**, 675 [1960].

Beschreibung der Versuche

1. Propionsäure-*p*-nitrophenylester

Der Ester wurde nach der Methode der gemischten Anhydride⁶ dargestellt: 7,4 g (0,1 Mol) Propionsäure wurden in 300 ml absol. Dimethylformamid gelöst und unter intensivem Rühren mit 10,1 g (0,1 Mol) Triäthylamin versetzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf -5° wurden langsam 10,8 g (0,1 Mol) Chlorameisensäure-äthylester zugetropft. Nach der Zugabe wurde noch 30 Min. bei -5° weitergerührt. Darauf wurde tropfenweise eine Lösung von 21 g (0,15 Mol) *p*-Nitrophenol in Dimethylformamid zugefügt und unter ständigem Rühren langsam auf Zimmertemperatur erwärmt. Nach Zugabe von etwa 1,5 l Wasser schied sich der Nitrophenylester kristallin ab. Er wurde abfiltriert und aus *n*-Butanol umkristallisiert. Schmp. $61-62^{\circ}$; Ausb. 10,5 g (53% d. Th.). Lit.: Schmp. 50° ; $62-63^{\circ}$.

2. Kinetik der Reaktion von Propionsäure-*p*-nitrophenylester mit *N*^α-Acetyl-L-lysin-methylamid

a) Spektralphotometrische Messungen: Die Messungen wurden im Klimaraum bei $20,0 \pm 0,3^{\circ}$ mit dem Spektralphotometer PMQ II der Firma Carl Zeiss und 1 cm Quarzküvetten ausgeführt. Gemessen wurde die Extinktion bei 400 m μ . Für jede Bestimmung genügten 3 ml des Reaktionsgemisches. Die Lösungen wurden aus 2 ml Puffer, 0,4 ml Kochsalzlösung (zur Einstellung der Ionenstärke), 0,3 ml einer wäßrigen Lösung des Lysinderivates und 0,3 ml einer Lösung des Propionsäure-*p*-nitrophenylesters in einem Gemisch von 19 Vol.-% Äthanol in Wasser bereitet. Für die Ermittlung der Verseifungsgeschwindigkeit des Nitrophenylesters wurde statt der Lösung des Lysinderivates Wasser hinzugegeben. Die Vergleichslösung enthielt jeweils statt der Lösung des Nitrophenylesters 0,3 ml der Mischung von 19 Vol.-% Äthanol in Wasser. Die Nitrophenylesterlösung wurde täglich frisch bereitet; ihre Zugabe erfolgte aus einer kalibrierten Spritze. Es wurde darauf gut durchgeschüttelt und in die Küvette gefüllt. Nach einer halben Minute konnte der erste Wert für die Extinktion abgelesen werden.

b) Bereitung der Puffer und Einstellen der Ionenstärke: Verwendung fanden Borsäure/Borax- und Natriumborat/Natronlauge-Puffer verschiedener pH-Werte. Durch Zugabe von Kochsalz wurde die Ionenstärke 0,16 eingestellt.

Folgende Stammlösungen wurden verwendet:

1. a) $0,2M H_3BO_3 + 0,05M NaCl$ $\mu = 0,05$
- b) $0,05M Na_2B_4O_7$ $\mu = 0,1$
2. a) $0,2M H_3BO_3 + 0,1M NaOH$ $\mu = 0,1$
- b) $0,1M NaOH$ $\mu = 0,1$

In Tab. 4 sind die Zusammensetzung der verwendeten Puffer, die Konzentration der zugegebenen Natriumchloridlösung und der potentiometrisch in der zur Messung verdünnten Reaktionslösung bestimmte pH-Wert angegeben.

Tab. 4. Zusammensetzung und pH der verwendeten Puffer.

Stamm-lösung	Vol.-%	μ	$\Sigma\mu$	NaCl [Mol · l ⁻¹]	pH
1a	82,9	0,04145	} 0,05855	0,9073	8,1
1b	17,1	0,01710			
1a	18,4	0,00920	} 0,09080	0,7460	9,2
1b	81,6	0,08160			
2a	59,0	0,05900	} 0,1	0,6999	10,0
2b	41,0	0,04100			
2a	51,2	0,05120	} 0,1	0,6999	10,5
2b	48,8	0,04880			

⁶ H. Zahn u. F. Schade, Chem. Ber. **96**, 1747 [1963].

⁷ C. Huggins u. J. Lapidés, J. biol. Chemistry **170**, 467 [1947].

Zusammenfassung

Propionsäure-*p*-nitrophenylester acyliert die freie ε -Aminogruppe im *N* $^{\alpha}$ -Acetyl-lysin-methylamid. Das entsprechende Histidinderivat katalysiert die Verseifung des Esters. Die Tyrosin- und Serinderivate werden nicht acyliert.

Summary

Propionic acid-*p*-nitrophenyl ester acylates the free ε -amino group of *N* $^{\alpha}$ -acetyl-lysine-methylamide. The corresponding derivative of histidine catalyses the saponification of the ester. The derivatives of tyrosine and serine are not acylated.

Professor Dr.-Ing. H. Zahn, Deutsches Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule, 51 Aachen, Veltmanplatz.

Über Steroid-Konjugate in Plasma, XIX¹ Direkter und indirekter Metabolismus von i. v. verabreichtem ³H- und ³⁵S-markiertem Androstenson-sulfat*

Von

Georg W. Oertel, Paul Knapstein und Laszlo Treiber

Aus der endokrinologischen Abteilung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie,
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

(Der Schriftleitung zugegangen am 11. Februar 1966)

In den letzten Jahren mehren sich experimentelle Befunde, denen zufolge ein „direkter Metabolismus“ von Steroid-sulfaten möglich ist und unter physiologischen Bedingungen eine gewisse, in ihrem Umfang noch unbekannte Bedeutung besitzt. So kann z. B. aus Pregnenolon-sulfat das im Plasma vorherrschende Androstenson-sulfat entstehen², Verbindungen, die in der Nebennierenrinde synthetisiert³ und von ihr offenbar sezerniert werden⁴. Auch die Umwandlung von Δ^5 -Androstendiol-(3 β .17 β)-sulfat in Androstenson-sulfat ließ sich demonstrieren⁵. Ob ein direkter Metabolismus auch für die im allgemeinen als Endprodukte bezeichneten Steroid-glucuronide⁶ zutrifft, bleibt angesichts jüngster Berichte offen⁷.

Da die oben erwähnten Steroid-sulfate im Plasma jedoch offensichtlich als Steroid-sulfatide vorliegen⁸, erhob sich die Frage, inwieweit sie in dieser Form den gleichen Stoffwechselreaktionen unterliegen. Erste Untersuchungen in dieser Richtung¹ erbrachten bereits deutliche Hinweise dafür, daß der direkte Metabolismus von endogen gebildetem [7α -³H]Androstenson-[³⁵S]sulfatid bis zu den entsprechenden Sulfo-Konjugaten von 5β -Androstanolon und Androsteron führen kann. In

* Verwendete Trivialnamen s. S. 223.

¹ XVIII. Mittell.: G. W. Oertel u. P. Knapstein, diese Z. **344**, 159 [1966].

² H. Calvin, R. L. Vande Wiele u. S. Lieberman, *Biochemistry* **2**, 648 [1963].

³ E. Z. Wallace u. S. Liebermann, *J. clin. Endocrinol. Metabolism* **23**, 90 [1963]; J. B. Adams, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **82**, 572 [1964].

⁴ E. E. Baulieu, *J. clin. Endocrinol. Metabolism* **20**, 900 [1960]; **22**, 501 [1962]; R. L. Vande Wiele, P. C. MacDonald, E. Bolte u. S. Lieberman, *J. clin. Endocrinol. Metabolism* **22**, 1207 [1962]; R. Gurpide, P. C. MacDonald, R. L. Vande Wiele u. S. Lieberman, *J. clin. Endocrinol. Metabolism* **23**, 346 [1963]; G. W. Oertel, diese Z. **336**, 263 [1964].

⁵ E. E. Baulieu, C. Corpechot u. R. Emiliozzi, *Steroids* **2**, 429 [1963].

⁶ P. Siiteri u. S. Lieberman, *Biochemistry* **2**, 1171 [1963].

⁷ P. Robel, R. Emiliozzi u. E. E. Baulieu, *C. R. hebdom. Séances Acad. Sci.* **261**, 4886 [1965].

⁸ G. W. Oertel, *Biochem. Z.* **334**, 431 [1961].

der vorliegenden Arbeit soll nun die Rolle des direkten Metabolismus von Sulfo-Konjugaten im allgemeinen Stoffwechsel von C_{19} - (und C_{18} -) Steroiden anhand der freien und konjugierten Steroide in Plasma, Galle und Harn dargelegt werden.

Material und Methodik

Das hier beschriebene Experiment wurde an einer 22jährigen, gesunden weiblichen Versuchsperson am 12. Tag ihres Zyklus durchgeführt. Vor der i. v. Injektion von $0,234 \mu\text{g}$ Natrium- $[7\alpha\text{-}^3\text{H}]\text{androstenolon-}[^{35}\text{S}]\text{sulfat}$ mit $8191000 \text{ Ipm } ^3\text{H}$ und $3880000 \text{ Ipm } ^{35}\text{S}$ ($^3\text{H}/^{35}\text{S}=2,1$) in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung wurde der Versuchsperson eine Sonde ins mittlere Duodenum gelegt, so daß klare, gelbe und alkalisch reagierende Galle frei abfloß. Die nach Beendigung der i. v. Injektion anfallende Galle sammelte man in 10-Min.-Portionen. Nach 120 Min. wurden 4 ml Äther durch die Sonde ins Duodenum infundiert, zur Kontraktion der Gallenblase. Insgesamt konnten $124,7 \text{ ml}$ Galle — durchschnittlich $8,9 \text{ ml}$ in 10 Min. — erhalten werden.

Die Entnahme von 170 ml Blut aus der Armvene erfolgte 12—14 Min. nach Injektion. Aus dem mit Liquemin (Hoffmann-La Roche, Grenzach) heparinisierten Blut (100 IE/ml) gewann man $73,8 \text{ ml}$ Plasma. Über 24 Stdn. wurden außerdem 905 ml Harn gesammelt.

Chromatographie

Die zur Isolierung von Steroid-Konjugaten und freien Steroiden benutzten chromatographischen Systeme sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tab. 1. Chromatographische Systeme für die Trennung von freien und konjugierten Steroiden.

Systeme*			Laufmittel
A	DSC	Kieselgel G	Heptan/Äther 1:1 (v/v)
B	DSC	Kieselgel G	Chloroform/Methanol/Ammoniak 20:5:0,2 (v/v)
C	DSC	Kieselgel G	Chloroform/Methanol/Ammoniak 10:10:0,2 (v/v)
D	PC	Papier MN 214 FF	Diisopropyläther/Petroläther/ <i>t</i> -Butanol/ Ammoniak/Wasser 5:2:3:1:9 (v/v)
E	PC	Papier Whatman DE-20	1,0M Acetatpuffer, pH 4.75 ⁹
F	DSC	Aluminiumoxyd	Cyclohexan/Butylacetat/ <i>n</i> -Butanol 50:45:5 (v/v)
G	DSC	Kieselgel G	Chloroform/Äthanol 19:1 (v/v) ¹⁰
H	DSC	Kieselgel G	Äthylacetat/Cyclohexan 1:1 (v/v) ¹¹
I	DSC	Kieselgel G	Benzol/Äthanol 9:1 (v/v) ¹⁰
K	PC	Papier MN 214 FF	Propylenglykol*-Toluol ¹²
L	PC	Papier MN 214 FF	Propylenglykol*-Methylcyclohexan ¹³

*DSC = Dünnschichtchromatographie; PC = Papierchromatographie.

** Imprägnierungsmittel.

⁹ G. W. Oertel u. E. Kaiser, Biochem. Z. **336**, 10 [1962].

¹⁰ B. P. Lisboa, Acta endocrinol. [Copenhagen] **43**, 47 [1963].

¹¹ B. P. Lisboa u. E. Diczfalusy, Acta endocrinol. [Copenhagen] **40**, 60 [1962].

¹² A. Zaffaroni, Rec. Progr. Hormone Res. **8**, 51 [1953].

¹³ K. Savard, J. biol. Chemistry **202**, 457 [1953].

Folgende Steroide wurden in den einzelnen Fraktionen aus Plasma, Galle oder Harn bestimmt:

Androstentriol [Δ^5 -Androstentriol-(3 β .16 α .17 β)]
 7 α -Hydroxy-androstenolon[3 β .7 α -Dihydroxy- Δ^5 -androstenon-(17)]
 3 β .17 β -Dihydroxy- Δ^5 -androstenon-(16)
 16 α -Hydroxy-androstenolon [3 β .16 α -Dihydroxy- Δ^5 -androstenon-(17)]
 7-Oxo-androstenolon [3 β -Hydroxy- Δ^5 -androstandion-(7.17)]
 Δ^5 -Androstendiol-(3 β .17 β)
 Testosteron [17 β -Hydroxy- Δ^4 -androstenon-(3)]
 Androstenolon [3 β -Hydroxy- Δ^5 -androstenon-(17)]
 5 β -Androstanolon [3 α -Hydroxy-5 β -androstanon-(17)]
 Androsteron [3 α -Hydroxy-5 α -androstanon-(17)]
 Δ^4 -Androstendion-(3.17)
 5 β -Androstandion-(3.17)
 5 α -Androstandion-(3.17)
 Östriol [$\Delta^{1.3.5(10)}$ -Östratrientriol-(3.16 α .17 β)]
 Östradiol [$\Delta^{1.3.5(10)}$ -Östratriendiol-(3.17 β)]
 Östron [3-Hydroxy- $\Delta^{1.3.5(10)}$ -Östratrienon-(17)]

Die Wanderungsgeschwindigkeit vorgenannter Steroide und ihrer Konjugate in verschiedenen chromatischen Systemen geht aus den Tab. 2 und 3 hervor.

Tab. 2. Relative Wanderungsgeschwindigkeiten der freien Steroide in den verschiedenen Chromatographie-Systemen.

Steroide	R_F - bzw. R_F^* -Wert in System					
	F	G	H	I	K	L*
Androstentriol	0,05	0,06	0,08		0,02	0,00
3 β .17 β -Dihydroxy- Δ^5 -androstenon-(16)	0,06	0,22	0,20		0,07	0,00
16 α -Hydroxy-androstenolon	0,06	0,22	0,20		0,14	0,00
X ¹	0,10	0,30			0,20	0,05
Δ^5 -Androstendiol-(3 β .17 β)	0,22	0,36	0,31		0,29	0,32
Testosteron	0,27	0,40				1,00
X ₂	0,29	0,50				1,36
Androstenolon	0,32	0,50			0,63	1,87
5 β -Androstanolon	0,29	0,43			0,63	2,20
Androsteron	0,37	0,51			0,70	3,05
X ₃	0,37	0,51				3,50
Δ^4 -Androstendion-(3.17)	0,47	0,61			0,73	4,20
5 β -Androstandion-(3.17)	0,68	0,69				5,10
5 α -Androstandion-(3.17)	0,68	0,69				5,70
Östriol			0,06	0,11		
E _x			0,20	0,27		
Östradiol			0,41	0,36		
Östron			0,59	0,52		

* Wanderungsgeschwindigkeit bezogen auf Testosteron = 1.

Messung der Radioaktivität

Die quantitative Bestimmung von ^3H und ^{35}S wurde simultan im Packard-Tricarb-Spektrometer 314 EX durchgeführt unter Verwendung von 20 ml Methanol/Toluol 1:200 (v/v) mit 0,4% 2,5-Diphenyl-oxazol (PPO) und 0,04% 1,4-Bis-[4-methyl-5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP; Packard Instr. Comp.

Tab. 3. Relative Wanderungsgeschwindigkeit der Steroidkonjugate in den verschiedenen Chromatographie-Systemen.

Steroidkonjugate	R _F - bzw. R _F [*] -Wert in System				
	A	B	C	D*	E**
Steroid-glucuronide	0,00	0,00	0,13	0,00	
Steroid-sulfatide	0,65				
Androstentriol-sulfat	0,00	0,00	0,36	0,00	
7 α -Hydroxy-androstenolon-sulfat	0,00	0,00	0,51	0,00	0,77
7-Oxo-androstenolon-sulfat	0,00	0,08	0,54	0,17	0,56
3 β .17 β -Dihydroxy- Δ^5 -androstenon-(16)-sulfat	0,00	0,11	0,58	0,35	
16-Hydroxy-androstenolon-sulfat					
Δ^5 -Androstendiol-(3 β .17 β)-sulfat	0,00	0,15	0,66	0,67	0,10
Testosteron-sulfat				1,00	
Östron-sulfat	0,00	0,19	0,65	1,15	
Androstenolon-sulfat	0,00	0,22	0,63	1,55	0,42
5 β -Androstanolon-sulfat	0,00	0,22	0,68	1,79	0,48
Androsteron-sulfat	0,00	0,22	0,69	2,35	0,37

* = Wanderungsgeschwindigkeit bezogen auf Testosteron-sulfat = 1,00.

** = Teilweise desaktiviertes Anionenaustauscher-Papier.

La Grange, Ill. USA). Zur Auswertung bediente man sich der von Okita u. a.¹⁴ angegebenen Discriminator-Ratio-Methode, wobei durch kombinierte, individuelle Gain-Wahl an Hand entsprechender Standards [7α - ^3H]Androstenolon und Androstenolon [^{35}S]sulfat) eine bessere Trennung der beiden Isotope erreicht wurde. Da sich die Messungen über einen längeren Zeitraum hingen, mußte der Zerfall von ^{35}S (Halbwertszeit: 87 Tage) berücksichtigt werden. An Stelle einer entsprechenden Korrektur wurde daher in den jeweiligen Tabellen das gleichzeitig gemessene Verhältnis $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ des injizierten Materials als Bezugswert (= Standard in Tab. 4, 5, 7, 9, 11) angegeben. Eine qualitative, und semi-quantitative Messung markierter Substanzen ließ sich durch Messung der Chromatogramme im Berthold-Dünnschichtscanner LB 2720 erreichen.

Aufarbeitung von Plasma

Das heparinisierte Plasma wurde zunächst dreimal mit je 2 Vol. Methylenchlorid extrahiert zwecks Entfernung freier Steroide. Der Gesamtextrakt wurde sodann mit 0,2 Vol 0,1N NaOH und zweimal mit je 1 Vol. Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingedampft. Aus der alkalischen Phase trennte man die Fraktion der phenolischen Steroide in üblicher Weise¹⁵ ab und chromatographierte sie in den Systemen H und I vor Messung der Einzelverbindungen. Die neutralen Steroide wurden durch Chromatographie in System L aufgetrennt.

Zur Gewinnung der gesamten Steroid-Konjugate wurde das präextrahierte Plasma dreimal mit je 5 Vol. Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) bei 37° extrahiert. Nach Eindampfen des Filtrates im Rotationsverdampfer bei 37° bis auf 5 ml versetzte man mit 25 ml Chloroform/Methanol 1:9 (v/v) und chromatographierte die filtrierte Lösung an einer Säule (2,5 $\times$ 25 cm) aus aktiviertem und vorbehandeltem DEAE-Sephadex A-25¹⁶. Für die Abtrennung der Steroid-glucuronide aus den beiden ersten, vornehmlich Steroid-sulfatide enthaltenden Eluatensorgte eine Lösungsmittelverteilung zwischen Äthylacetat und 5% Natrium-

¹⁴ G. J. Okita, J. J. Kabara, F. Richardson u. G. V. LeRoy, Nucleonics 15, 111 [1957].

¹⁵ L. L. Engel u. I. T. Nathanson, J. biol. Chemistry 185, 255 [1950].

¹⁶ G. W. Oertel, Biochem. Z. 339, 125 [1963].

hydrogencarbonat-Lösung. Der weiteren Reinigung der im organischen Lösungsmittel befindlichen Steroid-sulfatide diente eine Dünnschichtchromatographie in System A, während die Steroid-glucuronide und die im letzten Säuleneulat enthaltenen Steroid-sulfate in System B chromatographiert wurden.

Die bei Dünnschichtchromatographie der Sulfatid-Fraktion (R_F 0,65) in System A durch Zersetzung entstandenen Steroid-sulfate (R_F 0,00) wurden nunmehr einer Chromatographie in System B unterzogen, wobei außer freiem Androstenolon (R_F 0,71) zwei Fraktionen mit einem R_F -Wert von 0,07—0,14 und 0,18—0,26 auftraten. Entsprechende Fraktionen erhielt man bei Chromatographie der Steroid-sulfate aus dem letzten Säuleneulat. Die Auftrennung der Steroid-sulfate gelang durch Dünnschichtchromatographie der polaren Verbindungen in System C oder Papierchromatographie der weniger polaren Substanzen in System D. Aliquote Teile der isolierten Verbindungen wurden nun der quantitativen Messung von ^3H und ^{35}S zugeführt. Die unversehrten Steroid-sulfatide (R_F 0,65 in System A) waren für andere Versuche vorgesehen.

Zur weiteren Charakterisierung der verschiedenen Steroid-sulfate, insbesondere des aus der Sulfatid-Fraktion stammenden Androstenolon-, 5β -Androstanolon- und Androsteron-sulfats verdünnte man aliquote Teile der entsprechenden Fraktionen mit authent. Steroid-sulfaten, chromatographierte die Gemische in den Systemen C, E und D und bestimmte die spezif. Aktivität unter Anwendung einer Mikro-Zimmermann-Reaktion¹⁷. Außerdem wurden Aliquote von 5β -Androstanolon-, Androsteron- und Östron-sulfat nach umgekehrter Isotopenverdünnung mit etwa 10 mg authent. Steroid-sulfaten zweimal aus Methanol-Äther bzw. Äthanol-Äthylacetat-Hexan umkristallisiert und die spezif. Aktivität der in Kristallen und Mutterlauge enthaltenen Substanzen festgelegt. Den zweiten Teil der Sulfat-Fractionen unterwarf man einer Solvolyse in Äthylacetat-Schwefelsäure¹⁸, extrahierte und reinigte die freigesetzten Steroide und trennte die Einzelverbindungen durch Chromatographie in den Systemen G und K (polare C_{19} -Steroide) bzw. F und L (unpolare C_{19} -Steroide).

Die gesamten Steroid-glucuronide wurden mittels β -Glucuronidase hydrolysiert, die freigesetzten Steroide extrahiert, gereinigt und wie im Falle der solvolysierten Steroid-sulfate durch Chromatographie in den Systemen G und K bzw. F und L in Einzelverbindungen zerlegt und gemessen. Die aus den jeweiligen alkalischen Extrakten erhältlichen phenolischen Steroide wurden durch zweimalige Chromatographie in den Systemen H und I isoliert.

Aufarbeitung von Galle

Nach Extraktion der freien Steroide mit dreimal je 1 Vol. Methylenchlorid versetzte man mit jeweils 15 Vol. Chloroform/Methanol 1:1 (v/v), filtrierte und chromatographierte das eingedampfte Filtrat einmal in System A, um evtl. vorhandene lipophile Steroid-Konjugate abzutrennen. Während die freien, neutralen Steroide in den Systemen G und K bzw. F und L, die phenolischen Anteile dagegen in den Systemen H und I chromatographiert wurden, trennte man die hydrophilen Steroid-Konjugate durch Dünnschichtchromatographie in System B. Ein Aliquot der Sulfat-Fraktion wurde zur Isolierung einzelner Steroid-sulfate einer mehrfachen Chromatographie in den Systemen C und D unterworfen, bevor man die quantitative Messung und Charakterisierung der isolierten Verbindungen durch umgekehrte Isotopenverdünnung und chromatographische Reinigung bis zu konstanter spezif. Aktivität in den Systemen D, C und F (nach Solvolyse) vornahm. Der Rest der Sulfat-Fraktion wurde einer Solvolyse unterworfen und aufgearbeitet wie für das Plasma beschrieben.

Die gesamten Steroid-glucuronide unterwarf man der enzymatischen Hydrolyse mit 1000 IE β -Glucuronidase/ml Galle und verfuhr im übrigen wie bei den aus Steroid-sulfaten freigesetzten Steroiden. Da früheren Untersuchungen zufolge

¹⁷ F. Ceresa u. C. A. Cravetto, Acta endocrinol. [Copenhagen] **29**, 321 [1958].

¹⁸ S. Burstein u. S. Lieberman, J. biol. Chemistry **233**, 331 [1958].

nur geringe Mengen markierter phenolischer Steroide nach Gabe von Androstenson-sulfat in der Galle auftreten, wurden lediglich die gesamten phenolischen Auszüge (aus freien Steroiden, Steroid-sulfaten und Steroid-glucuroniden) der üblichen Trennung in den Systemen H und I zugeführt.

Aufarbeitung von Harn

Durch Extraktion mit zweimal je 3 Vol. Methylenchlorid ließen sich zunächst alle freien Steroide entfernen. Anschließend versetzte man mit 50% (g/v) Ammoniumsulfat, extrahierte zweimal mit je 3 Vol. Tetrahydrofuran, dampfte den Extrakt zur Trockne ein und chromatographierte den Rückstand an einer Säule (2,5 × 35 cm) aus aktiviertem und vorbehandeltem DEAE-Sephadex A-25.

Die in den beiden ersten Eluat anfallenden Steroid-glucuronide wurden durch eine zweite Säulenchromatographie an Florisil mit Aceton-Äthanol-Gemischen von steigendem Äthanol-Gehalt¹⁹ gereinigt und mit 1000 IE β -Glucuronidase/ml Harn bebrütet. Freigesetzte Steroide wurden extrahiert, gewaschen, getrocknet und, wie bereits zuvor erwähnt, in den Systemen G und K bzw. F und L oder H und I chromatographiert. Ein aliquoter Teil der gewonnenen Steroid-sulfate konnte durch Dünnschichtchromatographie in System B in die schon genannten Fraktionen polarer und weniger polarer Steroid-sulfate zerlegt werden. Diese Fraktionen wurden sodann durch weitere Chromatographie in den Systemen C und D in Einzelverbindungen aufgetrennt und letztere quantitativ bestimmt. Den zweiten Teil der Sulfat-Fraktion unterwarf man der Solvolyse, extrahierte die phenolischen Steroide und chromatographierte die gereinigten Extrakte der neutralen und phenolischen Steroide in den Systemen G und K, bzw. F und L oder H und I, bevor die quantitative Messung der Einzelverbindungen erfolgte.

Ergebnisse und Diskussion

Wie Tab. 2 und 3 veranschaulichen, gestatten die hier benutzten chromatographischen Systeme eine einwandfreie Isolierung freier und konjugierter Steroide. Tab. 4 enthält eine Übersicht über die in den verschiedenen Fraktionen aus Plasma, Galle und Harn nachweisbare Radioaktivität.

Tab. 4. Radioaktivität in Steroid-Fractionen aus Plasma, Galle und Harn nach i. v. Injektion von ³H- und ³⁵S-markiertem Androstenson-sulfat.

Material	Freie Steroide	Sulfatide		Sulfate		Glucuronide
	³ H [Ipm]	³ H [Ipm] ³⁵ S [Ipm]	³ H/ ³⁵ S*	³ H [Ipm] ³⁵ S [Ipm]	³ H/ ³⁵ S*	³ H [Ipm]
Plasma (73,8 ml)	650 (0,01% **)	291260 235700 (3,56% **)	1,23	37750 31600 (0,41% **)	1,19	425 (0,01% **)
Galle (124,7 ml)	9945 (0,11% **)	— —	—	92670 14190 (1,08% **)	6,54	3295 (0,04% **)
Harn (905 ml)	675 (0,01% **)	— — —	—	2450000 484000 (29,91% **)	5,06	106000 (1,30% **)

* ³H/³⁵S des Standards = 2,10 bzw. 3,15 (Harn).

** Anteil der insgesamt eingesetzten ³H-Aktivität.

¹⁹ E. E. Baulieu, S. Michaud u. R. Bentramon, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 155, 1003 [1961].

1. Steroide im Plasma

Den vorliegenden Ergebnissen zufolge wird i. v. verabreichtes Androstenolon-sulfat ($^3\text{H}/^{35}\text{S} = 2,10$) rasch in Androstenolon-sulfatid übergeführt, so daß bereits nach 15 Min. mehr als 85% der im Plasma befindlichen ^3H -Aktivität (3,56% der injizierten ^3H -Aktivität) in Form lipophiler und solvolysierbarer Steroid-sulfatide ($^3\text{H}/^{35}\text{S} = 1,23$) vorlagen. Für die einwandfreie Abtrennung der Sulfatide von den Sulfaten oder Glucuroniden sorgten Ionenaustauscherchromatographie, Lösungsmittelverteilung und Dünnschichtchromatographie, in deren Verlauf sich das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis nur unwesentlich änderte. Geringfügig niedrigere Werte als im Ausgangsmaterial sind auf den „quenched-effect“ verunreinigender Lipoide bei Messung von ^3H zurückzuführen.

Die relative Zusammensetzung der Plasma-steroide läßt sich aus Tab. 5 entnehmen, als deren Ergänzung die Ergebnisse (Tab. 6 und 7) einer umgekehrten Isotopenverdünnung und chromatographischen Reinigung bzw. Umkristallisation der Steroid-sulfate bis zu konstanter spezif. Aktivität anzusehen sind.

Wie bereits in früheren Untersuchungen festgestellt²⁰, trat bei der Dünnschichtchromatographie der Steroid-sulfatide auf Kieselgel G die

Tab. 5. Aktivitätsverteilung bei den freien und konjugierten Plasma-Steroiden. Bei den freien Steroiden und bei den Glucuroniden war keine ^{35}S -Aktivität nachweisbar ($^3\text{H}/^{35}\text{S} > 100$).

Steroide	freie Steroide	Sulfatide		Sulfate		Glucur- onide
	^3H [Ipm]	^3H [Ipm] ^{35}S [Ipm]	$^3\text{H}/^{35}\text{S}$	^3H [Ipm] ^{35}S [Ipm]	$^3\text{H}/^{35}\text{S}$	^3H [Ipm]
Androstenolon	210	51500 25800	1,99	9990 4100	2,44	260
5 β -Androstanolon	88	36450 17350	2,11	3010 1100	2,74	
Androsteron	76	11600 5560	2,09	1220 422	2,92	114
Δ^5 -Androstendiol-(3 β .17 β)		4240 2060	2,06	1040 445	2,34	
Δ^4 -Androstendion-(3.17)		1800 870	2,07			337 189
Androstentriol		790 396	1,99	875 400	2,20	
Östron	36	660 324	2,04			
Östradiol	42					
Östriol						
7 α -Hydroxy-androstenolon		2840	< 0,01	8200	< 0,01	
7-Oxo-androstenolon		3350	< 0,01	2410	< 0,01	
Standard			2,10		2,86	

²⁰ G. W. Oertel u. K. Groot, diese Z. **341**, 1 [1965].

Tab. 6. Spezifische Aktivität verschiedener Steroid-sulfate aus der Sulfatid-Fraktion des Plasmas im Verlauf zusätzlicher Chromatographie.

Steroid-Komponenten	Spezif. Akt. nach Chromatographie [Ipm/ μ g]					
	DSC in Syst. C		PC in Syst. E		PC in Syst. D	
	^3H	^{35}S	^3H	^{35}S	^3H	^{35}S
Androstenolon	132	63	122	56	121	60
5 β -Androstanolon	50	24	45	22	47	22
Androsteron	11,8	4,9	10,4	4,4	11,0	5,0

* DSC = Dünnschichtchromatographie; PC = Papierchromatographie.

Tab. 7. Spezifische Aktivität verschiedener Steroid-sulfate aus der Sulfatid-Fraktion des Plasmas im Verlauf einer zweimaligen Umkristallisation.

Steroid-Komponenten	Material	Spezif. Akt. [Ipm/ μ g]		$^3\text{H}/^{35}\text{S}$
		^3H	^{35}S	
5 β -Androstanolon	K-1	7,3	3,0	2,4
	M-1	6,9	2,7	2,6
	K-2	7,0	2,7	2,7
	M-2	7,1	2,7	2,6
Androsteron	K-1	0,22	0,093	2,4
	M-1	0,19	0,079	2,5
	K-2	0,21	0,096	2,2
	M-2	0,20	0,084	2,4
Östron	K-1	0,40	0,096	4,2
	M-1	0,42	0,087	4,9
	K-2	0,41	0,096	4,2
	M-2	0,43	0,098	4,3

K = Kristalle; M = Mutterlauge.

 $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ des Standards = 2,6 bzw. 4,4.

Unbeständigkeit solcher aliphatischer Ester von Steroid-sulfaten zu Tage. Die durch partielle Zersetzung entstandenen Steroid-sulfate boten dafür die Möglichkeit zur Isolierung der Einzelverbindungen, die vermittle wiederholter Chromatographie in verschiedenen Systemen gelang und gleichzeitig der Identifizierung ehemaliger Steroid-sulfatide diente. Da alle abgetrennten Steroid-sulfate — natürlich mit Ausnahme des verständlicherweise nur ^{35}S enthaltenden 7 α -Hydroxy- und 7-Oxo-Androstenolons — einen annähernd unveränderten $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Quotienten aufwiesen, erscheint ihre Entstehung durch direkten Metabolismus von Androstenolon-sulfatid gesichert. Dieser umfaßt nicht nur Veränderungen des Moleküls in Ring B und D, etwa durch Reduktion der 17-Oxo-Gruppe oder Hydroxylierung in 7 α - und 16 α -Stellung, sondern erstreckt sich auch auf Oxydation und Reduktion in Ring A. Nur in diesem Sinne läßt sich die Isolierung von 5 β -Androstanolon- und Androsteron-sulfat aus der Sulfatid-Fraktion deuten. Als Zwischenstufen in dieser Reaktionsfolge müssen die Enol-sulfate von Δ^4 -Androstendion-(3.17), von 5 α - und 5 β -Androstandion-(3.17) angenommen werden, wenngleich die Charak-

terisierung dieser Verbindungen infolge Mangels an Vergleichssubstanzen und geringer Aktivität sich auf die Isolierung der zugrunde liegenden freien Steroide beschränkte. In diesem Zusammenhange sei vermerkt, daß die Isolierung der freien Steroide nach Hydrolyse oder Solvolyse durch mehrfache Chromatographie in geeigneten Systemen für ausreichend erachtet und nur in einzelnen Fällen (z. B. 5β -Androstanolon und Androsteron) durch umgekehrte Isotopenverdünnung und chromatographische Reinigung bis zu konstanter spezif. Aktivität ergänzt wurde. Aufgrund einer vorausgegangenen, ausgiebigen Chromatographie der aus Sulfatiden gewonnenen Steroid-sulfate dürfte die Identität der meisten Verbindungen dennoch als erwiesen gelten. Das Vorkommen von Östron-sulfat ($^3\text{H}/^{35}\text{S} = 2,04$) in der ehemaligen Sulfatid-Fraktion entspricht gleichfalls den Vorstellungen eines direkten Metabolismus. Eine Aromatisierung²¹ erfordert jedoch zunächst die Oxydation von Androstenolon-sulfatid zur Stufe des Δ^4 -Androstendions-(3.17). Daß letztere Verbindung — das 3-Enol-sulfat des Δ^4 -Androstendions-(3.17) — tatsächlich gebildet werden kann, zeigte die in-vitro-Bebrütung von Mikrosomen aus Tumorgewebe der menschlichen Nebennierenrinde mit ^3H - und ^{35}S -markiertem Androstenolon-sulfatid bzw. -sulfat. Im Verlauf dieser Experimente fand man nämlich beträchtliche Mengen von Δ^4 -Androstendion-(3.17) in der doppeltmarkierten Sulfatid- bzw. Sulfat-Fraktion, wobei wiederum Androstenolon-sulfatid höhere Ausbeuten als Androstenolon-sulfat lieferte²². Versuche, aus den Sulfo-Konjugaten des Δ^4 -Androstendions-(3.17) auf biosynthetischem Wege die Sulfo-Konjugate von Östrogenen herzustellen, sind noch im Gang.

Die Analyse der C_{19} -Steroide in der Sulfatid- bzw. der daraus gebildeten Sulfat-Fraktion erbrachte vor und nach Solvolyse vergleichbare Resultate. Eine endgültige Aussage über die quantitative Zusammensetzung der Sulfatid-Fraktion scheint nur in begrenztem Umfang möglich, weil lediglich die bei Zersetzung der Sulfatide anfallenden Steroid-sulfate untersucht und zudem oft einer unterschiedlichen Aufarbeitung unterworfen wurden.

Die Fraktion der eigentlichen Steroid-sulfate besaß bei einer der Sulfatid-Fraktion ähnlichen Aktivitätsverteilung nur etwa 11% der ^3H -Aktivität im Plasma, während in der Fraktion der Steroid-glucuronide sogar nur 0,13% gefunden wurden (Tab. 4). Östrogene und Ring-A-gesättigte 17-Oxosteroide, wie 5β -Androstanolon und Androsteron traten hier als Steroid-Komponente auf (Tab. 5). Ist die Bildung der Steroid-glucuronide nur nach Spaltung der Schwefelsäureester-Bindung von Sulfatiden (oder Sulfaten) denkbar, so bleibt die Frage offen, ob die

²¹ K. J. Ryan, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **27**, 658 [1958]; K. J. Ryan, *J. biol. Chemistry* **234**, 268 [1959]; J. E. Longchamps, C. Gual, M. Ehrenstein u. R. I. Dorfman, *Endocrinology* **66**, 416 [1960]; H. Breuer u. P. Grill, *diese Z.* **324**, 254 [1961]; A. S. Meyer, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **24**, 1435 [1955]; C. Gual, T. Morato, M. Hayano, M. Gut u. R. I. Dorfman, *Endocrinology* **71**, 920 [1962].

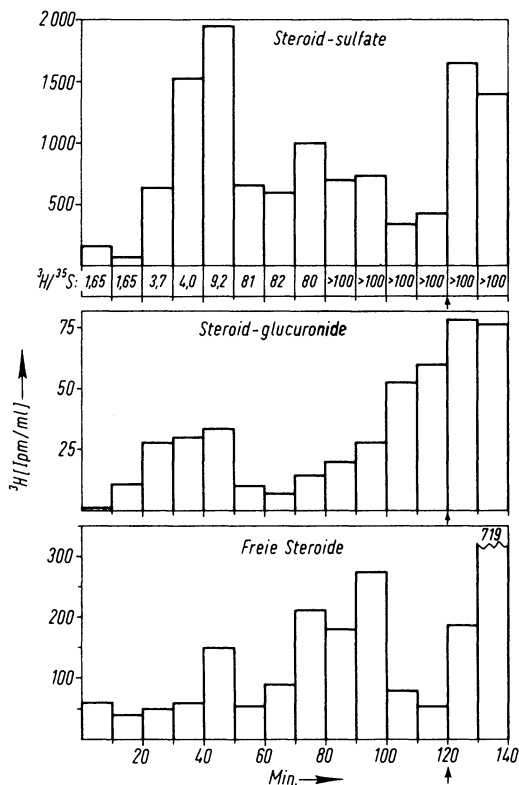
²² XX. Mitteil.: G. W. Oertel u. L. Treiber, *diese Z.* **344**, 163 [1966].

verschiedenen Steroid-sulfate durch Metabolismus von Androstenson-sulfat oder aber im Zuge der Aufarbeitung infolge Zersetzung entsprechender Sulfatide entstanden.

2. Steroide in der Galle

Was die Ausscheidung von markierten Steroiden in der Galle betrifft, so ließen sich 1,23% der injizierten ^3H -Aktivität in Form freier und konjugierter C_{19} - und C_{18} -Steroide isolieren. Da die in 140 Min. gesammelte Galle 124,7 ml betrug, dürfte (bei einer Tagesproduktion von 1200—1500 ml) im geschilderten Versuch annähernd die gesamte Lebersekretion erfaßt worden sein.

Während die Abbildung die Ausscheidung von markierten freien und konjugierten Steroiden in der Galle in ihrem zeitlichen Verlauf wiedergibt, findet man die relative Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen



Zeitlicher Verlauf der Ausscheidung von freien und konjugierten Steroiden in der Galle. Zu dem mit $\rightarrow$ bezeichneten Zeitpunkt wurden 4 ml Äther durch die Sonde verabreicht. Das Aktivitätsverhältnis $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ für die verabreichte Substanz betrug 2,10.

aus der über 2 Stdn. gesammelten Gesamtgalle in Tab. 8. Die spezif. Aktivität von Steroidsulfaten aus Galle bei wiederholter Chromatographie, Solvolyse und Rechromatographie der freigesetzten Steroide geht aus Tab. 9 hervor.

Tab. 8. Aktivitätsverteilung bei den freien und konjugierten Gallen-Steroiden.

Steroide	freie Steroide	Sulfate*	Glucuronide**
	^3H [Ipm]	^3H [Ipm]	^3H [Ipm]
5 β -Androstanolon	348	24890	743
Androstenolon	1680	7950	467
Δ^5 -Androstendiol-(3 β .17 β)	606	1220	506
Androsteron	252	1560	505
Δ^4 -Androstendion-(3.17)	214	1640	—
Androstentriol	—	1530	—
5 α -Androstandion-(3.17) }	205	602	—
5 β -Androstandion-(3.17) }			
X ₂	516	—	258

* nach Solvolyse und Chromatographie.

** nach Bebrütung mit β -Glucuronidase und Chromatographie.

Tab. 9. Spezifische Aktivität verschiedener Steroid-sulfate aus Galle im Verlauf wiederholter Chromatographie (Gesamtgalle: 0—140 Min.).

Steroid-Komponenten	Spezif. Akt. nach Chromatographie [Ipm/ μg]				
	PC in Syst. D		DSC in Syst. C		PC in Syst. L*
	^3H	^{35}S	^3H	^{35}S	^3H
Androstenolon	3,8	1,17	4,5	1,00	3,5
5 β -Androstanolon	36,0	5,1	35,0	5,4	32,5
Androsteron	8,9	1,5	9,5	1,5	7,9
Δ^5 -Androstendiol-(3 β .17 β)	23,4	4,2	22,6	4,2	22,1

* = nach Solvolyse und Chromatographie in System L. $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ des Standards = 2,10.

PC = Papierchromatographie; DSC = Dünnschichtchromatographie.

In der Fraktion der freien Steroide befand sich ein zwar geringer, doch signifikanter Prozentsatz der ^3H -Aktivität (0,11% der verabreichten ^3H -Aktivität, s. Tab. 4), der sicher auf Hydrolyse von Sulfo-Konjugaten in der Leber beruht. Die Ausscheidungsrate von Steroid-sulfaten erreichte gemäß der Abbildung rund 40—50 Min. nach Injektion ein Maximum, so wie bei vergleichbaren Untersuchungen am Meer-schweinchen²³. Auf Grund der Beobachtung, daß schon nach 15 Min. der weitaus größte Teil der im Plasma zirkulierenden Sulfo-Konjugate aus Sulfatiden besteht, muß eine Hydrolyse der Schwefelsäureester-Bindung unter Entstehung von Sulfatidsäure und freiem Steroid stattgefunden haben, der dann eine Resulfurylierung des freien Steroids folgte. Belief sich doch das $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnis in den ersten Minuten auf 1,65 — wobei

²³ J. Neiser, W. Rindt, P. Knapstein u. G. W. Oertel, Europ. J. Steroids, im Druck 1966.

der scheinbare ^3H -Verlust der Anwesenheit von nur ^{35}S -markiertem 7-Hydroxy-androstenolon zuzuschreiben ist —, um dann stetig anzusteigen, so daß nach 70 Min. kein ^{35}S in der Sulfat-Fraktion nachweisbar war. Offensichtlich passiert das anfänglich noch vorhandene Androstenolon-sulfat die Leber, ohne eine wesentliche Hydrolyse zu erleiden. Da weiter im 24-Stdn.-Harn Steroid-sulfate mit einem vergleichsweise unveränderten $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Quotienten ($^3\text{H}/^{35}\text{S} = 5,06$) erschienen, sollte der Exkretionsmechanismus von Steroiden in Leber und Niere grundsätzlich verschieden sein. Aus der Verschiebung des $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Verhältnisses in der Sulfat-Fraktion der Galle, dem Maximum dieser Fraktion nach rund 45 Min. und einer deutlich vermehrten Ausscheidung freier und an Glucuronsäure gebundener Steroide in der zweiten Stunde folgt, daß bei einem gleichbleibenden Leberstoffwechsel unverzüglich nach Gabe von Androstenolon-sulfat eine chemische Umsetzung des injizierten Materials innerhalb des Organismus ablief, die durch Bildung von Sulfatid leicht erklärt wird.

Im Gegensatz zu den Steroid-sulfaten (1,08% der injizierten ^3H -Aktivität) beträgt der Anteil der Steroid-glucuronide aus der Gesamtgalle etwa 0,04% der verabreichten ^3H -Aktivität. Das Verhältnis von Steroid-Konjugaten zu freien Steroiden lag bei 9,55:1. Welche Rolle den freien Steroiden hinsichtlich einer Rückresorption im Darm²⁴ zukommt, bedarf noch der experimentellen Klärung. Von Androstenolon-Metaboliten konnten in der Galle im Großen und Ganzen die gleichen wie im Plasma nachgewiesen werden (Tab. 8).

3. Steroide im Harn

Betrachtet man die Exkretion markierter Steroide im Harn, so fällt auf, daß innerhalb der ersten 24 Stdn. nur 31,2% der injizierten Radioaktivität ausgeschieden wurden. Hiervon entfielen etwa 30% auf Steroid-sulfate, 1,3% auf Steroid-glucuronide und 0,01% auf freie Steroide (Tab. 4). Fand man in der Fraktion der Steroid-sulfate vornehmlich 3β -Hydroxy- Δ^5 -steroiden neben 5β -Androstanolon und Androsteron, so überwogen in der Fraktion der Steroid-glucuronide die 3α -Hydroxy-Verbindungen (Tab. 10 und 11). Wie schon erwähnt, deutet der relativ niedrige $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ -Quotient ($= 5,06$ gegenüber > 100 in der Galle der 2. Stde.), auf eine partielle Hydrolyse der zirkulierenden Steroid-sulfatide — möglicherweise in der Niere — zu Steroid-sulfaten, die dann im Harn eliminiert werden. Zugleich findet eine Spaltung von Steroid-sulfatiden — wahrscheinlich in der Leber — zu Sulfatidsäure und freien Steroiden statt, wobei letztere weitgehend einer Resulfurylierung unterliegen. Eine Verdünnung der im Harn auftretenden ^3H - und ^{35}S -markierten Steroid-sulfate durch ^3H -markierte Steroid-sulfate ist aus der Zunahme des

²⁴ R. P. Martin, D. L. Loriaux u. G. S. Farnham, *Steroids*, Suppl. II, 149 [1965]; B. P. Lisboa, J. Drossé u. H. Breuer, *diese Z.* **342**, 106 [1965]; D. L. Berliner, G. F. Learg, D. M. Cases u. M. L. Berliner, *Amer. J. Physiol.* **202**, 420 [1962].

Tab. 10. Aktivitätsverteilung bei den konjugierten Harn-Steroiden.

Steroide	Sulfate* ³ H[Ipm]	Glucuronide** ³ H[Ipm]
Androsteron	42470	17080
16-Hydroxy-androstenolon	44240	1760
5β-Androstanolon	22540	14200
Androstentriol	25200	—
3β.17β-Dihydroxy-Δ ⁵ -androstenon-(16)	22270	—
Androstenolon	9140	1950
X ₁	4490	—
5α-Androstandion-(3.17)	2370	—
Testosteron	1568	230
X ₃	1522	—
Δ ⁵ -Androstendiol-(7.17)	1320	—
5β-Androstandion-(3.17)	882	—
X ₂	288	—
Δ ⁴ -Androstendion-(3.17)	268	—

* = nach Solvolyse und Chromatographie.
** = nach Bebrütung mit β-Glucuronidase und Chromatographie.

Tab. 11. Aktivität der aus Harn isolierten Steroidsulfate.

Steroid-Komponenten	³ H[Ipm]	³⁵ S[Ipm]	³ H/ ³⁵ S
Androsteron	51990	11530	4,50
16-Hydroxy-androstenolon	} 68430	13130	5,20
3β.17β-Dihydroxy-Δ ⁵ -androstenon-(16)			
5β-Androstanolon	28830	4450	6,50
Androstenolon	12690	2100	6,05
Δ ⁵ -Androstendiol-(3β.17β)	1520	314	4,85

³H/³⁵S des Standards = 3,15

³H/³⁵S-Quotienten um rund 40% zu erkennen, was einer mengenmäßig bemerkenswerten Resulfurylierung freigesetzten Steroids innerhalb von 24 Stdn. entspricht. Neben der Ausscheidung von Steroid-Sulfaten stellt die Konjugation freier oder freigesetzter C₁₉-Steroide mit Glucuronsäure — sei es in der Leber (3% der Gesamt-Konjugate in der Galle der ersten 2 Stdn. und 4% der Gesamt-Konjugate im Harn) oder in der Niere²⁵ nur eine Nebenreaktion im Stoffwechsel des Androstenolon-sulfatids dar.

Schließlich sei auf die Umwandlung des ³H- und ³⁵S-markierten Androstenolon-sulfatids in Östrogene hingewiesen. Unsere, in Tab. 12 zusammengefaßten Befunde ergänzen die Beobachtungen anderer Autoren²⁶ über eine signifikante Biosynthese von phenolischen Steroiden

²⁵ G. L. Cohn, M. Hume u. P. K. Bondy, I. Int. Congr. Endocrinology, Kopenhagen 1960, Nr. 366; G. L. Cohn u. M. Hume, J. clin. Invest. **39**, 1584 [1960].
²⁶ E. E. Baulieu u. F. Dray, J. clin. Endocrinol. Metabolism **23**, 1298 [1963]; E. Bolte, S. Mancuso, G. Eriksson, N. Wiquist u. E. Diezfalusy, Acta endocrinol. [Copenhagen] **45**, 535 [1964]; **45**, 560 [1964]; **45**, 576 [1964]; P. K. Siiteri u. P. MacDonald, Steroids **2**, 713 [1963].

Tab. 12. Aktivität der Östrogene und ihre Konjugate in Plasma, Galle und Harn.

Östrogen	³ H[Ipm]					
	Plasma (73,8 ml)			Galle (124,7 ml) Gesamt-Aktiv.	Harn (905 ml)	
	freie Östroge	Sulfatide + Sulfate	Glucu- ronide		Sulfate	Glucu- ronide
Östron	36	825	—	246	648	70
Östradiol	42	516	337	951	624	180
E _x	—	274	—	—	1770	90
Östriol	—	34	189	518	182	480

aus Androstenolon-sulfat. Obgleich die Ausbeute an freien und konjugierten Östrogenen relativ gering war, scheint Androstenolon-sulfatid auf Grund seiner langen Halbwertszeit²⁷ doch eine wichtige Vorstufe für Östrogene zu sein, deren Bildung durch direkten Metabolismus von Konjugaten sowie auf indirektem Weg verlaufen kann. Die Verbindung E_x aus der Reihe der phenolischen Steroide entzog sich ebenso wie die Verbindungen X₁₋₃ in den neutralen Fraktionen bislang jeder Identifizierung. Im Gesamtgeschehen kommt ihnen wohl auch eine untergeordnete Rolle zu.

Vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, durchgeführt.

Zusammenfassung

Nach i. v. Injektion von [7 α -³H]Androstenolon-[³⁵S]sulfat wurden bei einer weiblichen Versuchsperson Plasma, Galle und Harn auf freie und konjugierte Steroide untersucht. Im Plasma waren nach 15 Min. über 85% der vorhandenen Radioaktivität in der Fraktion der Steroid-sulfatide enthalten, aus der u. a. Androsteron-, 5 β -Androstanolon- und Östron-sulfat mit praktisch unverändertem ³H/³⁵S-Verhältnis neben zahlreichen anderen Steroiden isoliert werden konnten. Die in einzelnen Portionen gesammelte 2-Stdn.-Galle wies vornehmlich Steroid-sulfate mit rasch zunehmendem ³H/³⁵S-Verhältnis auf. Da die im 24-Stdn.-Harn aufgefundenen Steroid-sulfate nur ein geringfügig erhöhtes ³H/³⁵S-Verhältnis erkennen ließen, wird angenommen, daß die gebildeten Steroid-sulfatide in der Niere zu Steroid-sulfaten, in der Leber aber zu freiem Steroid abgebaut werden. Neben einer Resulfurylierung des freien Steroids besitzt die Konjugation mit Glucuronsäure in der Leber kaum eine quantitative Bedeutung.

Summary

After i. v. injection of [7 α -³H]androstenolone[³⁵S]sulfate into a female subject, plasma, bile and urine were analysed for free and conjugated steroids. After 15 minutes more than 85% of radioactivity in plas-

²⁷ G. W. Oertel u. K. Groot, diese Z. **341**, 204 [1965].

ma were obtained from the steroid-sulfatides fraction, from which androsterone, 5β -androstanolone, and estrone sulfate with a practically unchanged $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ ratio, as well as numerous other steroids could be isolated. In the 2-hour bile, collected in several portions, mainly steroid sulfates with a rapidly increasing $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ ratio were found. Since the steroid sulfates in the 24-hour urine exhibited an only slightly increased $^3\text{H}/^{35}\text{S}$ ratio, it is assumed that the steroid sulfatides formed are hydrolyzed to steroid sulfates in the kidney and to free steroids in the liver. Besides a re-sulfurylation of the free steroid the conjugation with glucuronic acid in the liver seems of little quantitative importance.

Doz. Dr. Georg W. Oertel, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität, 665 Homburg/Saar.
