

Freie und konjugierte C₁₈-, C₁₉- und C₂₁-Steroide im Liquor¹⁾

Von G. W. OERTEL und P. BRÜHL

Aus der Endokrinologischen Abteilung, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar,
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Zimmermann)

(Eingegangen am 26. Juli 1965)

Die Konzentration freier und konjugierter C₁₈-, C₁₉- und C₂₁-Steroide im menschlichen Liquor wurde untersucht. Nach Extraktion freier Steroide trennte man die Steroidkonjugate durch Ionenaustauscher-Chromatographie und Lösungsmittelverteilung in Steroidsulfatide, -glucuronoside und -sulfate, zerlegte die Konjugate und isolierte Steroidgruppen, bzw. einzelne Steroide mittels Dünnschicht- und Papierchromatographie. Die qualitative und quantitative Bestimmung erfolgte mit bekannten Farbreaktionen. Es zeigte sich, daß die Liquorspiegel freier und konjugierter C₁₈-, C₁₉- und C₂₁-Steroide unter den entsprechenden Plasmawerten liegen.

The concentration of free and conjugated C₁₈-, C₁₉- and C₂₁-steroids in human cerebrospinal fluid was determined. After the extraction of the free steroids, the steroid conjugates were separated by ion exchange chromatography and solvent partition, into steroid sulphatides, glucuronosides and sulphates. The conjugates were hydrolysed and the steroid groups or individual steroids were isolated by thin layer or paper chromatography. Known colour reactions were employed for the qualitative and quantitative determination. It was shown that the levels of free and conjugated C₁₈-, C₁₉- and C₂₁-steroids in cerebrospinal fluid are lower than those found in plasma.

Nachdem bereits verschiedentlich über den Gehalt des Liquor cerebrospinalis an 17-Hydroxy-corticosteroiden berichtet wurde (1—3), wobei man vergleichsweise erheblich niedrigere Konzentrationen als im Plasma fand, erhob sich die Frage, ob im Liquor auch Steroid-konjugate vorkommen. Aus diesem Grunde wurden, wie im folgenden dargelegt, größere Mengen Sammelliquor auf freie und konjugierte C₁₈-, C₁₉- und C₂₁-Steroide untersucht.

Methode

Extraktion freier Steroide

220 bzw. 285 ml Liquor cerebrospinalis, der überwiegend von Patienten mit Erkrankungen des Zentralnervensystems gesammelt wurde, extrahierte man dreimal mit je 2 Vol. Chloroform. Der Gesamtextrakt wurde durch Waschen mit 0,1 *n* Natronlauge und Wasser gereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Rotationsverdampfer bei 37° zur Trockne eingedampft.

Extraktion und Trennung der Steroid-konjugate

Präextrahierter Liquor wurde mit 6 Vol. Äthanol-Aceton (1:1 v/v) versetzt und ausgefallenes Eiweiß abgesaugt. Nach Einengen des Filtrates im Rotationsverdampfer bei 37° bis auf etwa 5 ml und Verdünnen mit 25 ml Chloroform-Methanol (1:9 v/v) wurde die Lösung filtriert und auf eine Säule (1,5 × 15 cm) aus aktiviertem und vorbehandeltem DEAE-Sephadex A-50 gebracht. Die Elution der Säule erfolgte, wie früher eingehend beschrieben (4) mit Chloroform-Methanol-Wasser (1:9:2 v/v), 80% Methanol, 50% Methanol, 25% Methanol, Wasser und 1-*m* Ammoniumsulfat-Lösung mit 0,1 Vol. 1-*n* Schwefelsäure. Für die Abtrennung der Steroid-glucuronoside aus den lipid-haltigen ersten beiden Eluatensorgte eine Lösungsmittelverteilung des betreffenden Rückstandes zwischen Äthylacetat und 5-proz. Natriumbicarbonat-Lösung. Die in der organischen Phase befindlichen Steroid-sulfatide wurden durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G in Heptan-Äther (1:1 v/v) (R_F = 0,40—0,45) gereinigt.

Spaltung der Konjugate

Während die Steroid-sulfatide und die mit saurer Ammoniumsulfat-Lösung von der Säule eluierten Steroid-sulfate durch Solvolyse

in Äthylacetat-Schwefelsäure (5) zerlegt wurden, hydrolysierte man evtl. vorhandene Steroid-glucuronoside durch 48 stdg. Bebrütung mit 25000 Einheiten β-Glucuronidase („Ketodase“ der Fa. Warner-Chilcott, Morris Plains, NJ, USA) in Acetat-Puffer von pH = 4,75. Die Solvolysate wie die Äthylacetat-Extrakte des enzymatischen Hydrolysats wurden mit 1-*n* Natronlauge und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter Stickstoff bei 37° zur Trockne eingedampft.

Trennung und Isolierung der Steroide

Die aus den alkalischen Waschflüssigkeiten in üblicher Weise (6) erhältlichen phenolischen Steroide wurden ebenso wie die neutralen Steroide im ersten Versuch lediglich durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxyd (Akt. 1, neutral; Fa. Woelm, Eschwege) unter Verwendung von 0,25% und 12,5% Methanol in Benzol von letzten Verunreinigungen befreit und als Gruppen geeigneten Farb-reaktionen unterworfen.

Im zweiten Versuch chromatographierte man die phenolischen Steroide auf Kieselgel G in Cyclohexan-Äthylacetat (1:1 v/v) (7), eluierte die anhand von Standard-Verbindungen festgelegten Abschnitte mit Oestron, Oestradiol und Oestriol und chromatographierte die Einzelverbindungen nochmals auf Kieselgel G in Benzol-Äthanol (9:1 v/v) (8) zwecks anschließender quantitativer Bestimmung.

Für die Trennung der neutralen Steroide in polare und weniger polare Verbindungen, bzw. für eine erste Isolierung verschiedener Steroide empfahl sich die Dünnschichtchromatographie (9) auf Kieselgel G in Chloroform-Äthanol (19:1 v/v). Von den polaren Steroiden wurden 5-Androsten-3β, 17β-diol (Androstendiol), 5-Pregnen-3β, 17α-diol-20-on (17-Hydroxy-pregnenolon), 4-Pregnen-11β, 21-diol-3,20-dion (Corticosteron) und 4-Pregnen-11β, 17α, 21-triol-3,20-dion (Cortisol) durch eine zweite Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G in Benzol-Äthanol (4:1 v/v) (9) endgültig gereinigt. Zur Reinigung und Isolierung von 4-Pregnen-3,20-dion (Progesteron), 5-Pregnen-3β-ol-20-on (Pregnenolon), 4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion (17-Hydroxy-progesteron), 5-Androsten-3β-ol-17-on (Dehydroepiandrosteron), Androstan-3α-ol-17-on (Androsteron) und Ätiocholan-3α-ol-17-on (Ätiocholanolon) — die letzten 5 Verbindungen mit einem R_F-Wert zwischen 0,55 und 0,70 wurden gemeinsam eluiert — benutzte man die Chromatographie auf besonders gereinigtem Papier (MN 2261 ff Fa. Macherey & Nagel, Düren) in Propylenglykol/Methylcyclohexan (10). Die den gesuchten Steroiden entsprechenden Chromatogrammschnitte wurden dabei stets anhand der jeweiligen Standardsubstanzen ermittelt, eluiert und die in den Eluatensorgte befindlichen einzelnen Verbindungen sodann der Analyse unterworfen.

¹⁾ Vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, durchgeführt.

Analyse isolierter Steroide

Zwecks quantitativer Bestimmung der isolierten Steroide wurden folgende *Farbreaktionen* angewandt:

- die ITTRICH-Reaktion für Oestrogene (11)
- die ZIMMERMANN-Reaktion für 17-Ketosteroide (12, 13)
- die OERTEL-EIK-NES-Reaktion für Δ^5 -3 β -Hydroxysterone (14)
- die UV-Absorption für Progesteron
- die Vanillin-Phosphorsäure-Reaktion für 17-Hydroxyprogesteron (15)
- die Fluorometrie für Corticosteron (16)
- die PORTER-SILBER-Reaktion für Cortisol (17)

Ergebnisse

Die Wanderungsgeschwindigkeit der analysierten C_{18} -, C_{19} - und C_{21} -Steroide in den verschiedenen, zur Isolierung eingesetzten chromatographischen Systemen läßt sich aus Tabelle 1 entnehmen. In Tabelle 2 findet man die Konzentration von Oestrogenen (ITTRICH-Chromogenen), 17-Ketosteroiden (ZIMMERMANN-Chromogenen) und 17-Hydroxy-corticosteroiden (PORTER-SILBER-Chromogenen) in den aus Sammelliquor gewonnenen verschiedenen Fraktionen freier und konjugierter Steroide. Tabelle 3 enthält entsprechende Liquorspiegel der einzelnen Verbindungen, wie sie in freier und konjugierter Form aus den verschiedenen Fraktionen isoliert wurden.

Tab. 1

Wanderungsgeschwindigkeit der analysierten Steroide in verschiedenen, zur Isolierung benutzten chromatographischen Systemen

Steroid	Wanderungsgeschwindigkeit				
	1 R_F	2 R_F	3 R_F	4 R_T^*	5 R_F
Oestron	0,58	0,48			
Oestradiol	0,36	0,26			
Oestriol	0,04	0,09			
Dehydroepiandrosteron			0,57	1,85	
Androsteron			0,60	3,25	
Ätiocholanolon			0,58	2,20	
Androstendiol			0,43		0,35
Pregnenolon			0,59	3,35	
Progesteron			0,78	7,20	
17-OH-Pregnenolon			0,48		0,47
17-OH-Progesteron			0,64	0,44	
Corticosteron			0,36		0,38
Cortisol			0,12		0,25

*) R_T = Wanderungsgeschwindigkeit bezogen auf Testosteron = 1,00.

Chromatographie-Systeme:

- Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in Cyclohexan-Äthylacetat (1:1 v/v)
- Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in Benzol-Äthanol (9:1 v/v)
- Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in Chloroform-Äthanol (19:1 v/v)
- Papierchromatographie in Propylenglykol/Methylcyclohexan
- Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in Benzol-Äthanol (4:1 v/v)

Tab. 2

Konzentration verschiedener Steroidgruppen im Liquor

Steroide- gruppe	Konzentration in $\mu\text{g}/100 \text{ m}^l$				Gesamt
	frei	-sulfatid	-sulfat	-glucu- ronosid	
Oestrogene	0,22	0,45	0,18	<0,1	0,85
17-Ketosteroide	2,35	54,6	16,5	<0,5	73,5
17-Hydroxy-corticosteroide	6,54	4,30	0,28	<0,25	11,1

Tab. 3

Konzentration einzelner Steroide im menschlichen Liquor

Steroid	Konzentration in $\mu\text{g}/100 \text{ m}^l$				Gesamt
	frei	-sulfatid	-sulfat	-glucu- ronosid	
Oestron	0,10	0,14	0,04	<0,01	0,28
Oestradiol	0,09	0,13	0,02	<0,01	0,24
Oestriol	0,06	0,06	0,02	<0,01	0,14
Dehydroepiandrosteron	2,7	32,0	7,8	<0,25	42,5
Androsteron	<0,5	6,3	2,0	<0,5	8,3
Ätiocholanolon	<0,5	5,8	1,8	<0,5	7,6
Androstendiol	0,9	4,0	2,1	<0,25	7,0
Pregnenolon	<0,25	2,8	1,6	<0,25	4,4
Progesteron	0,6	<0,5	<0,5	<0,5	0,6
17-OH-Pregnenolon	0,9	2,0	1,1	<0,25	4,0
17-OH-Progesteron	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Corticosteron	0,4	0,6	0,2	<0,1	1,2
Cortisol	5,3	4,8	1,9	<0,25	12,0

Diskussion

Wie aus den Tabellen 1—3 hervorgeht, sind auch im Liquor signifikante Mengen an verschiedenen C_{18} -, C_{19} - und C_{21} -Steroiden enthalten. Dies betrifft nicht nur freie Verbindungen, sondern auch Steroid-konjugate. Die hier angeführten Liquorspiegel der Oestrogene, 17-Ketosteroide und 17-Hydroxy-corticosteroide liegen ebenso wie die der einzelnen Steroide deutlich unter den entsprechenden Plasmakonzentrationen (Gesamt-17-ketosteroide : 100—120 $\mu\text{g}/100 \text{ m}^l$; Gesamt-17-hydroxy-corticosteroide : 25—30 $\mu\text{g}/100 \text{ m}^l$). Auf der anderen Seite übersteigen die in Tabelle 2 und 3 aufgeführten Konzentrationen von 17-Hydroxy-corticosteroiden oder Cortisol ganz beträchtlich die von anderen Arbeitsgruppen (1, 2), teils allerdings nur in semiquantitativer Analyse ermittelten Normalwerte. Da es sich im vorliegenden Fall um *Sammelliquor* verschiedenster Patienten aus zahlreichen Kliniken handelt, ist ein solcher Vergleich mit Normalwerten kaum möglich. Vielmehr könnte man die Liquorspiegel vorgenannter Steroide mit denjenigen vergleichen, die in pathologischen Fällen nachzuweisen waren (1). Eine Übereinstimmung läßt sich auch bei dem Vergleich der in Tabelle 2 und 3 angegebenen Liquorspiegel von 17-Ketosteroiden mit den von SCHWARZ (18) gefundenen Liquorkonzentrationen erkennen. Steroid-glucuronoside konnten im Gegensatz zu Steroid-sulfatiden und Steroid-sulfaten in nachweisbaren Konzentrationen nicht isoliert werden. Inwieweit die Konzentration freier und konjugierter Steroide von deren Löslichkeit (oder Polarität) in Blut und Liquor abhängt, bleibt abzuwarten. Immerhin wäre

es denkbar, daß aufgrund lipophiler oder hydrophiler Eigenschaften eine gewisse Blut-Liquor Schranke für freie und konjugierte Steroide besteht, wobei Steroid-sulfatide als lipophile Konjugate gegenüber den hydrophilen Steroid-glucuronosiden eine bevorzugte Stellung einnehmen könnten.

Was die Identität der untersuchten C_{18} -, C_{19} - und C_{21} -steroide angeht, so gestatten die angewandten chromatographischen Trennverfahren eine einwandfreie Isolierung der Einzelverbindungen mit Ausnahme von Pregnenolon und Androsteron — letztere Steroide wurden in ali-

quoten Teilen des gemeinsamen Eluats mittels geeigneter Farbreaktionen bestimmt — die im Verein mit den mehr oder weniger spezifischen Farbreaktionen einen ausreichenden qualitativen und quantitativen Nachweis gewährleisten sollten.

Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung von freien und konjugierten Steroiden im menschlichen Liquor erhebt sich schließlich die Frage, ob diesen im Regulationsmechanismus für Steroide innerhalb des Hypophysen-Nebennierenrinden(Gonaden)-Systems eine bestimmte Rolle zukommt.

Literatur

1. SANDBERG, A. A., K. B. EIK-NES, D. H. NELSON und F. H. TYLER, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 43, 874 (1954). — 2. ABELSON, D., D. N. BARON und J. G. TOAKLEY, J. Endocr. 12, 87 (1955). — 3. IANNIRUBERTO, A., G. MARANDOLA und S. PARISI, Minerva pediatr., Torino 13, 746 (1961). — 4. OERTEL, G. W. und E. KAISER, Biochem. Z. 336, 10 (1952). — 5. BURSTEIN, S. und S. LIEBERMAN, J. biol. Chemistry 233, 331 (1959). — 6. ENGEL, L. L. und I. T. NATHANSON, J. biol. Chemistry 185, 255 (1950). — 7. LISBOA, B. P. und E. DICZFALUSY, Acta endocr. K'hvn 40, 60 (1962); 43, 545 (1963). — 8. STRUCK, H., Mikrochim. Acta, 634 (1961). — 9. LISBOA, B. P., Acta endocr. K'hvn 43, 47 (1963). —
10. SAVARD, K., J. biol. Chemistry 202, 457 (1953). — 11. ITTRICH, G., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 312, 1 (1958). — 12. ZIMMERMANN, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 233, 257 (1935). — 13. CERESA, F. und C. A. CRAVETTO, Acta endocr. K'hvn. 29, 321 (1958). — 14. OERTEL, G. W. und K. B. EIK-NES, Analytic Chem. 31, 98 (1959). — 15. CARSTENSEN, H., G. W. OERTEL, und K. B. EIK-NES, J. biol. Chemistry 234, 2570 (1959). — 16. BRAUNSBURG, H. und V. H. T. JAMES, J. endocr. 21, 327 (1960). — 17. KORNEI, L., Metabolism 11, 1019 (1962). — 18. SCHWARZ, K., Dtsch. Zschr. Nervenhk. 177, 464 (1958).

Dozent Dr. G. W. Oertel
Universität des Saarlandes,
Inst. für Hygiene und Mikrobiologie
665 Homburg (Saar)

Zum Nachweis von 5-Carbamyl-5H-dibenzo [b, f] azepin im Liquor cerebrospinalis mittels Dünnschichtchromatographie

Von F. SCHEIFFARTH, F. WEIST und L. ZICHA

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg (Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning)

(Eingegangen am 14. August 1965)

Es wurde ein empfindliches, dünnschichtchromatographisches Nachweisverfahren für 5-Carbamyl-5H-dibenzo [b, f] azepin ausgearbeitet, mit dessen Hilfe es gelang, diese Substanz im Liquor und anderen Körperflüssigkeiten nachzuweisen. Zwei im Liquor auftretende Metaboliten des „Tegretal®“ konnten außerdem charakterisiert werden. Auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigt sich eine erhebliche Affinität des „Tegretal“ zum Hirngewebe, was auch durch den Nachweis dieser Substanz im Leichengehirn unter Beweis gestellt werden konnte.

A sensitive, thin layer chromatographic method for the detection of 5-carbamyl-5H-dibenzo [b, f] azepin was devised. It was used to demonstrate this substance in cerebrospinal fluid and other body fluids. Furthermore, two metabolites of „Tegretal“, which appear in the CSP, were characterised. The experimental results show that „Tegretal“ has a high affinity for brain tissue, which was confirmed by the demonstration of this substance in post mortem brain.

Eine Reihe von günstigen therapeutischen Effekten bei der Behandlung der Epilepsie, der Trigeminusneuralgie und des Diabetes insipidus im Ablauf einer Röntgenbestrahlung von Hypophysentumoren und schließlich auch bei der Hirsutismustherapie (1), ließ darauf schließen, daß 5-Carbamyl-5H-dibenzo [b, f] azepin¹⁾ die Blut-Liquorschranke zu passieren vermag. Erfahrungsgemäß sind jedoch die Konzentrationen von Pharmaka im Liquor oft noch niedriger als im Blut (2), so daß die Entwicklung sehr empfindlicher Nachweismethoden für

die Bearbeitung der vorgesehenen Fragestellungen notwendig wurde. Die Dünnschichtchromatographie bringt einerseits eine untere Bestimmungsgrenze von 0,1 bis 0,001 μg , andererseits hat sie sich auch für den quantitativen Nachweis von zahlreichen physiologischen und pharmakologischen Substanzen sowie zur Isolierung von Metaboliten bewährt (3—6).

Methodik

Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung kamen die Originalmethode nach STAHL (3) sowie quantitative und präparative Modifikationen zur Anwendung. Als Sorptionsschicht wurde Kieselgel-G,

¹⁾ TEGRETAL®; Herstellerfirma: J. R. Geigy A. G., Basel; Pharma-Herstellung und Vertrieb für Deutschland: Fa. Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss.