

Kombination chromatographischer Trennmethoden mit der Massenspektrometrie – ein modernes Verfahren zur Stoffwechseluntersuchung

Neue analytische Methoden (26)

Von Gerhard Spiteller*

Die in den letzten Jahrzehnten entwickelten potentiellen Trennverfahren, insbesondere die Glaskapillargaschromatographie (GC) und die Flüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) können uns in Kombination mit empfindlichen Nachweismethoden wie der Massenspektrometrie (MS) neue Einblicke in Stoffwechselprozesse gewähren. Damit wird die Forschung auf einem Gebiet, das lange Zeit als nahezu abgeschlossen galt, neu belebt. Neue Perspektiven eröffnen sich auch für Untersuchungen über die Metabolisierung von Nahrungs-, Genuss- und Arzneimitteln im Körper sowie über die Art, wie sich der Organismus schädlicher Stoffe entledigt und wie und wann diese Verbindungen in das körpereigene Stoffwechselgeschehen eingreifen.

1. Einleitung

Untersucht man mit modernen analytischen Methoden biologisches Material, dann stellt man sehr schnell fest, daß unsere Kenntnisse auf diesem Gebiet noch erschreckend lückenhaft sind. Manche Verbindungen, die in relativ großen Mengen (Milligramm pro Tag) im Harn ausgeschieden werden, sind noch unbekannt. Noch schlechter ist es um unser Wissen über Spurenverbindungen bestellt, von denen wir nur wenige kennen.

In diesem Fortschrittsbericht soll gezeigt werden, wie man diesen Verbindungen durch Kombination chromatographischer Verfahren mit der Massenspektrometrie auf die Spur kommen kann und wie chromatographische Methoden zur Lösung biologischer und medizinischer Probleme beitragen, aber auch welche Schwierigkeiten die Erstellung solcher „biologischer Profile“ bereitet.

Eine Übersicht über ein so weites Feld zwingt zu einer willkürlichen Auswahl der weit verstreuten Literatur, die deshalb nur teilweise berücksichtigt ist.

2. Allgemeines zur Aufarbeitung biologischer Flüssigkeiten und zur Charakterisierung der Einzelkomponenten

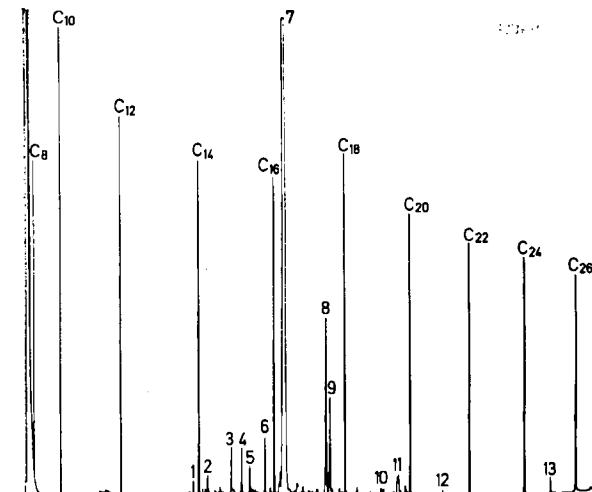
Harn und andere biologische Flüssigkeiten sind sehr komplexe Gemische. Sie enthalten niedrig- und hochmolekulare Stoffe mit sehr unterschiedlicher Polarität. Nur ein Teil von ihnen ist mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar und damit in einfacher Weise einer Analyse zugänglich. Selbst viele der weniger polaren Stoffe liegen in Körperflüssigkeiten in Form von „Konjugaten“, d.h. als Ester der Schwefelsäure oder Glucuronsäure, vor. Will man diese polaren Konjugate extrahieren, muß man vor der Aufarbeitung enzymatisch hydrolysieren.

Polare Verbindungen kann man aber auch an zugesetzten Adsorbentien, an Ionenaustauschersäulen oder an „reversed phase“-Säulen (Sep-Pak-Säulen) adsorbieren und nach dem Eluieren durch HPLC trennen. Oft wird man die

Eluate später enzymatisch spalten, grob in saure, neutrale und basische Anteile trennen und die Fraktionen chromatographieren.

Da sich die Mengen der Substanzen, die zu einer Stoffklasse gehören, meist um viele Größenordnungen unterscheiden, lassen sich zwar als Hauptbestandteil vorhandene Stoffe mit einer einzigen chromatographischen Methode erkennen, viele Spurenstoffe entgehen aber so noch einem Nachweis (Abb. 1). Ihre Anreicherung gelingt erst durch eine Kombination chromatographischer Trennmethoden.

Durch solche kombinierten Trennverfahren kann man praktisch jede in biologischem Material vorhandene Substanz bis zu Molekulargewichten von etwa 2000 so weit an-



reichern, daß eine Charakterisierung und Strukturaufklärung gelingt, vorausgesetzt, die Substanz läßt sich in ein flüchtiges Derivat überführen, das eine gaschromatographische Trennung ermöglicht. Der zeitliche und apparative Aufwand für die Trennung kann allerdings sehr hoch sein, und sie erfordert Erfahrung und Geschick.

Weniger befriedigend ist die quantitative Erfassung der einzelnen Stoffe in gelöster Form. Bei jedem Trennschritt treten Verluste ein, die sich bei mehreren Trennschritten summieren. Die Verluste einer Verbindung können zwar durch geeignete Versuchsanordnungen sehr gering gehalten werden, die gleichzeitige quantitative Bestimmung einer Vielzahl von Inhaltsstoffen biologischer Flüssigkeiten, auf die es meist ankommt, ist aber wegen unterschiedlicher Eigenschaften in der Regel problematisch.

Die Relationen in einem Chromatogramm entsprechen nicht unbedingt den Relationen der Substanzen, denn nicht nur unterschiedliche Substanzerluste bei der Aufarbeitung fallen ins Gewicht, sondern auch die Tatsache, daß Peakintensitäten auch von Substanz-eigenschaften abhängen. Dient z. B. bei einer GC-Trennung ein Flammenionisationsdetektor zur Substanzeinzeige, so hängt die Peakintensität auch entscheidend vom Sauerstoffgehalt der Verbindung ab^[1]. Je höher der Sauerstoffgehalt ist, um so niedriger ist die Intensität. Quantitative Messungen erfordern daher die Beimischung mehrerer Standards.

Glücklicherweise ist die genaue quantitative Erfassung einzelner Stoffe nicht unbedingt notwendig, weil sich Stoffwechselstörungen im allgemeinen durch massive Änderungen in der Menge einzelner Stoffwechselprodukte (teilweise um Größenordnungen) zu erkennen geben, so daß sie kaum übersehen werden können.

Eine Identifizierung gelingt immer dann, wenn sich eine Verbindung – entsprechend derivatisiert – gaschromatographisch an Kapillarsäulen trennen läßt und danach ein

Massenspektrum aufgenommen wird. Massenspektrum und Retentionsindex reichen für eine Identifizierung fast immer aus, selbst bei Vorliegen von Isomeren.

Sehr viel schwieriger ist die Charakterisierung von Verbindungen, die wegen ihrer Polarität nur durch HPLC trennbar sind, denn in diesem Falle ist die Verbindung nur mit Hilfe der Retentionszeit charakterisierbar. Zwar versucht man, die HPLC mit der Massenspektrometrie zu kombinieren, doch sind die Erfolge auf diesem Gebiet noch wenig überzeugend^[2].

Gas- oder Flüssigkeitschromatogramme von Gemischen aus biologischen Flüssigkeiten werden nach einem Vorschlag von Horning et al. „biologische Profile“ genannt^[3].

3. Aufarbeitung biologischer Flüssigkeiten zur Erstellung von Säureprofilen

Am einfachsten sind Säureprofile von Harn und anderen eiweißarmen biologischen Flüssigkeiten (z. B. Speichel) zu erhalten: Man säuert die biologische Flüssigkeit an, extrahiert mit einem organischen Lösungsmittel, überführt die Säuren mit Diazomethan in ihre Methylester^[4] oder trimethylsilyliert sie^[5] und trennt die Derivate gas-chromatographisch^[3b].

Auf diese Weise gehen allerdings teilweise sehr flüchtige Säuren (z. B. Isovaleriansäure) und auch stark polare Säuren (z. B. Citronensäure) verloren; die meisten Verbindungen sind durch solch eine einfache Trennung nicht erkennbar und kommen erst nach Abtrennen der Hauptprodukte zum Vorschein (Abb. 2).

Will man vorwiegend flüchtige Säuren fassen, so säuert man die Probe an und unterwirft sie direkt einer GC-Trennung^[6]; es ist aber auch möglich, die Säuren durch Vaku-

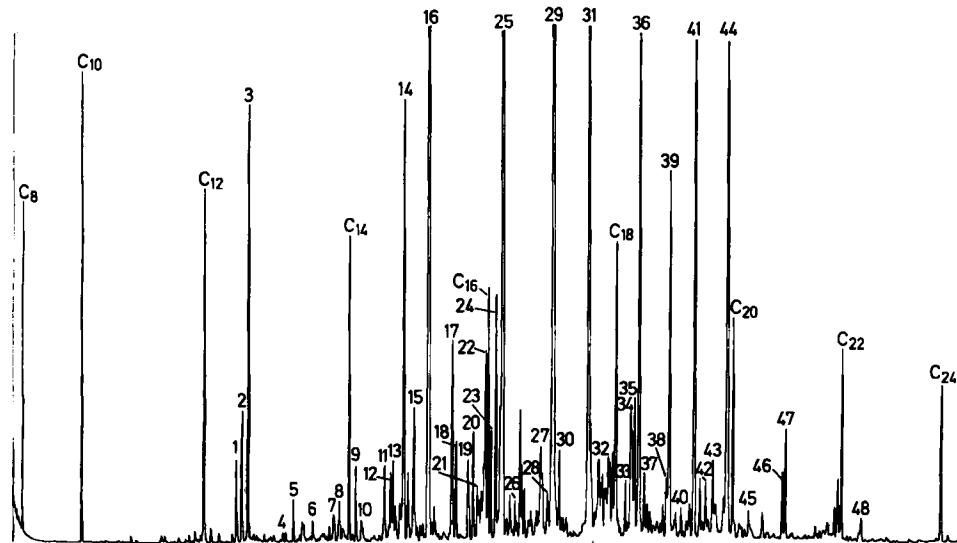


Abb. 2. Glaskapillargaschromatogramm (Aufnahmebedingungen vgl. Abb. 1) einer (mit Diazomethan methylierten) Fraktion, die durch Säulenchromatographie aus der in Abbildung 1 dargestellten Gesamtsäurefraktion erhalten wurde. Die Hauptanteile der Säuren – wie Hippur- und Citronensäure – sind abgetrennt; Produkte, die in geringer Menge im Harn enthalten sind, treten hervor. Als eine Auswahl der numerierten Peaks seien die der Mono-, Di- oder Trimethylester folgender Säuren herausgegriffen: 2-Methylhexandisäure (1), 3-Methylhexandisäure (2), 2-Hydroxyphenylsäure (3), 3,5-Dimethyloctandisäure (15), Nonandisäure (16), 3,4-Dimethyloctandisäure (17), Hexandisäure (24), 5-Decandisäure (25), 3-Methylfuran-2,5-dipropansäure (29), 2-(3-Carboxy-4-methyl-5-n-propyl-furanyl)-n-propansäure (31), 2-(3-Carboxy-4-methyl-5-n-pentyl-furanyl)-n-propansäure (41).

um-Destillation^[7] oder Extraktion^[8] zu gewinnen. Eine Übersicht über die Untersuchung flüchtiger Stoffe geben Zlatkis et al.^[9] und Politzer et al.^[10].

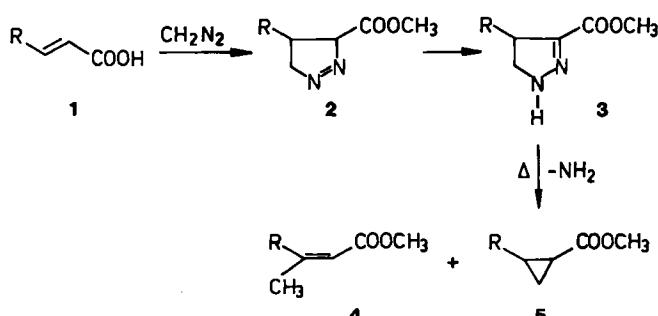
Konjugate, in denen vorwiegend phenolische Säuren vorliegen, werden durch β -Glucuronidase/Arylsulfatase sehr rasch gespalten^[11]. Danach sind die freien Säuren extrahierbar.

Polare Säuren gewinnt man, indem man die biologische Flüssigkeit zuerst über einen Ionenaustauscher laufen läßt^[12] und nach Entsalzung von diesem mit einem organischen Solvens eluiert^[12], wobei wieder die Art des Solvens das Aussehen des Profiles stark beeinflußt.

Bei der Aufarbeitung von Serum und eiweißreichen biologischen Flüssigkeiten müssen zuerst die Peptide abgetrennt werden, weil diese die Säulen verstopfen würden. Da beim Fällen teilweise auch Säuren mitgerissen werden, ist es zweckmäßig, das Eiweiß durch einstufige^[13] – oder besser zweistufige^[14] – Ultrafiltration zu entfernen. Die Filtrate lassen sich dann ähnlich einfach wie Harn aufarbeiten.

Aber auch bei der Trennung von Harn an Ionenaustauschersäulen kommt es zu Komplikationen. Stark polare Verbindungen werden sehr stark an Ionenaustauscher gebunden und allmählich bei späteren Ansätzen miteluiert. Die vollständige Reinigung von Spurenbestandteilen, die an einer Säule adsorbiert sind, kann ein Waschen mit vielen Litern Lösungsmittel und einen Zeitaufwand bis zu 14 Tagen erfordern^[15].

Weitere Schwierigkeiten ergeben sich bei der zur gaschromatographischen Trennung notwendigen Derivatisierung. Dient zur Veresterung Diazomethan^[4], so reagieren nicht nur saure und phenolische Gruppen unter der gewünschten Bildung von Estern bzw. Ethern, sondern es werden auch teilweise Aminosäurekonjugate am Stickstoff methyliert (z. B. Hippursäure zu *N*-Methylhippursäuremethylester (Abb. 1)). Diazomethan wird auch an Doppelbindungen eventuell vorhandener α,β -ungesättigter Säuren addiert^[16] (Schema 1).

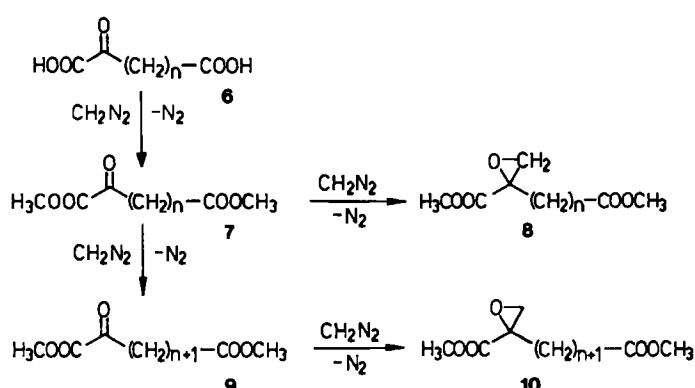


Schema 1. Umsetzung einer α,β -ungesättigten Carbonsäure mit Diazomethan.

Aus α,β -ungesättigten Säuren 1 gebildete 4,5-Dihydro-3*H*-pyrazole 2 reagieren unter Verschiebung der Doppelbindung zu den Isomeren 3. Diese können sich im Gaschromatographen teilweise zu in 3-Stellung methylsubstituierten α,β -ungesättigten Estern 4 oder Cyclopropanderivaten 5 zersetzen^[17].

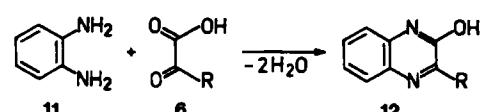
α -Oxosäuren 6 bilden mit Diazomethan nicht nur die entsprechenden Methylester 7, sondern werden auch in

Epoxyverbindungen 8, und unter Einbau von CH₂-Gruppen in homologe Methylester 9 überführt (Schema 2). Die entstandenen Homologen 9 können in gleicher Weise mit Diazomethan zu 10 weiter reagieren^[17], so daß manchmal aus einer Verbindung mehrere Produkte entstehen, und so Säureprofile die Gegenwart einer meist größeren Zahl von Verbindungen anzeigen, als tatsächlich vorhanden sind.



Schema 2. Umsetzung einer α -Oxosäure mit Diazomethan.

Um solche Artefaktbildung zu vermeiden, muß man Umwege gehen. Beispielsweise stellt man zur Analyse von α -Oxosäuren 6 durch Umsetzung mit *o*-Phenyldiamin 11 Chinoxalin-Derivate 12 her (Schema 3), die auch sehr gut für eine quantitative gaschromatographische Bestimmung geeignet sind^[18].



Schema 3. Umsetzung von α -Oxosäuren 6 mit *o*-Phenyldiamin 11 zu Chinoxalin-Derivaten 12.

Wegen der Gefahr von Nebenreaktionen bei der Einwirkung von Diazomethan auf Säuren zieht man vor allem bei quantitativer Messung bekannter Stoffe die Trimethylsilylierung^[5] vor. Diese hat aber gegenüber der Derivatisierung mit Diazomethan – abgesehen von der Hydrolyseempfindlichkeit trimethylsilylierter Säuren – den entscheidenden Nachteil, daß die Massenspektren der Trimethylsilyl-Derivate im allgemeinen weniger klare Hinweise auf die Struktur einer Verbindung geben als die entsprechender Methylester, so daß eine Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen kaum gelingt, und gerade dies ist in vielen Fällen notwendig.

Biologische Flüssigkeiten enthalten in der Regel eine so große Zahl von Säuren, daß die in Gaschromatogrammen angezeigten Peaks mehrere Komponenten enthalten, wenn man mit gepackten Säulen arbeitet. Daher ist eine eindeutige Identifizierung der Peaks selbst massenspektrometrisch nicht immer möglich. Durch Aufnahme vieler Spektren während eines Durchlaufes kann man überlagerte Spektren voneinander subtrahieren^[19]. Selbst bei Verwendung von Glaskapillarsäulen ist dieses Verfahren mitunter noch von Nutzen; im allgemeinen wird man heute aber in

solchen Fällen ein weiteres chromatographisches Verfahren anschließen (siehe Abb. 2 und 3).

4. Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen

Aus den Massenspektren GC-getrennter Substanzen lässt sich die Struktur unbekannter Verbindungen ableiten, wenn man Vergleichsspektren in den zahlreichen Spektrenkatalogen findet^[20]. Für eine derartige Spektrensuche lassen sich selbstverständlich auch Rechner einsetzen^[21].

Gelingt eine Strukturzuordnung nicht mit Vergleichsspektren, so wird man zwar in den allermeisten Fällen aus einem Spektrum Hinweise über die Struktur ablesen, aber nur in wenigen Glücksfällen die gesamte Struktur ableiten können. Man wird in der Regel davon ausgehen, daß es sich trotzdem um eine bereits beschriebene Verbindung handeln kann. Für eine Literatursuche benötigt man die Bruttoformel. Diese ist beim heutigen Stand der Technik durch Hochauflösung der GC-getrennten Fraktionen erhältlich^[22]; die Meßzeit für die einzelnen Ionen einer Glaskapillar-GC-Fraktion ist aber so kurz, daß zur Erzielung ausreichender Ionenströme die Geräte weit unter ihrer optimalen Auflösungsfähigkeit betrieben werden müssen^[1] (z. B. mit einer „Auflösung von 3000“ anstatt der möglichen „Auflösung von 50 000“) und damit die Massenbestimmung eine große Zahl möglicher Bruttoformeln er gibt^[22].

Der Aufwand zur Auswahl der richtigen Formel aus einer Vielzahl möglicher Formeln ist groß, erfordert die Kenntnis zusätzlicher Substanzparameter und ein Abwagen, welche massenspektrometrischen Zerfallswege möglich sein könnten. Trotz zeitaufwendiger Überlegungen gelingt eine eindeutige Bestimmung der Bruttoformel so nicht immer. Deshalb bleibt meist nur der Weg, die Substanz soweit anzureichern, daß eine Massenbestimmung durch „peak matching“^[1**] möglich ist.

Zur Anreicherung wird das Gemisch der Methylester dünnenschichtchromatographisch vorgetrennt. Die Platten werden willkürlich in Zonen zerlegt, diese Zonen eluiert, und jede Fraktion wird mit der Glaskapillargaschromatographie untersucht. Notfalls sucht man die Fraktion, die die angereicherte unbekannte Verbindung enthält, unter Zuhilfenahme der Massenspektrometrie^[23]. Im folgenden Schritt wird durch HPLC weiter getrennt und wieder in beliebige Fraktionen unterteilt, die ebenfalls mittels Gaschromatographie auf den Trennerfolg überprüft werden.

Wenn die unbekannte Verbindung auf etwa 20% der Gesamtmenge angereichert ist, und eine Überprüfung der

Massenspektren der Begleitstoffe ergibt, daß diese andere Schlüsselionen enthalten als die unbekannte Verbindung, läßt sich aus dem Gemisch die exakte Masse der Ionen und somit die Bruttoformel der Verbindung ermitteln, womit eine Literatursuche möglich wird.

Verläuft diese Literatursuche ergebnislos, so liefert oft die Bestimmung der Bruttoformeln der Bruchstück-Ionen weitere Hinweise. Allerdings reichen auch die Hochauflösungsdaten der Schlüsselionen – aus einigen Mikrogramm angereicherter Probe gewonnen – nur in Sonderfällen zur Strukturbestimmung aus^[24].

Abgeleitete Teilstrukturen können in der Folge durch chemische Umsetzungen mit angereicherter Probe im Mikromaßstab unter nachfolgender Analyse der Reaktionsprodukte mit der Kombination GC/MS bestätigt oder verworfen werden. Für Hydrierungen, die Anlagerung von OsO₄^[25] oder H₃CSSCH₃^[26] an Doppelbindungen, Ozonolysen, Acylierungen, Methylierungen etc. genügen einige Mikrogramm an angereichertem Material. Etwa 5- bis 10fache Probenmengen sind für den Nachweis einer Carbonylgruppe durch Oximbildung, einer Methoxycarbonylgruppe durch LiAlH₄-Reduktion oder für oxidative Abbaureaktionen erforderlich, weil entstehende polare Produkte oft sehr stark adsorbiert werden.

Von besonderem Vorteil sind Reaktionen, bei denen die Elektronendichte in einzelnen Molekülteilen stark verändert wird – denn so wird die Ionisation und damit die Initiierung der Bruchstückbildung von einem Molekülteil in den anderen verschoben, so daß in günstigen Fällen einmal aus dem Massenspektrum des einen, dann des anderen Molekülteils wichtige Informationen zugänglich sind.

Bei jeder dieser Mikroreaktionen werden durch Lösungsmittel, Filter, Belegmaterial von Säulen, durch die Berührung von Glasgefäßen mit Fingern, aus der Raumluft^[27] etc. zum Teil viel größere Mengen an Verunreinigungen eingeschleppt, als die Menge der umgesetzten Probe beträgt. Daher ist die Abtrennung der eingeschleppten Stoffe durch nachfolgende Gaschromatographie eine unabdingbare Voraussetzung für eine Spektreninterpretation. Das Auffinden der „richtigen“ Umsetzungsprodukte in den Gaschromatogrammen ist oft mühsam und erfordert die Durchsicht vieler Spektren, denn je kleiner die umgesetzten Probenmengen sind, um so häufiger kommt es vor, daß das Reaktionsprodukt als kleiner Peak auftritt, der von Peaks eingeschleppter Verunreinigungen an Intensität übertroffen wird.

Einfach hingegen ist es, das Mißlingen einer Umsetzung festzustellen, wenn das Edukt zurückhalten wird, denn von diesem kennt man Retentionsindex und Massenspektrum und kann daher innerhalb des Bereiches des bekannten Retentionsindex auch Spuren der Substanz anhand der Schlüsselionen erkennen.

Mit Mikroreaktionen allein wird die Struktur eines unbekannten Moleküls meist nur teilweise aufklärbar sein. So läßt sich die Stellung von Substituenten an aromatischen und heterocyclischen Ringen aus Massenspektren nur selten erschließen. Daher bleibt letztlich nichts anderes übrig, als wenigstens 1 mg Probe genügender Reinheit zu sammeln, um NMR- und andere spektroskopische Daten zu bestimmen.

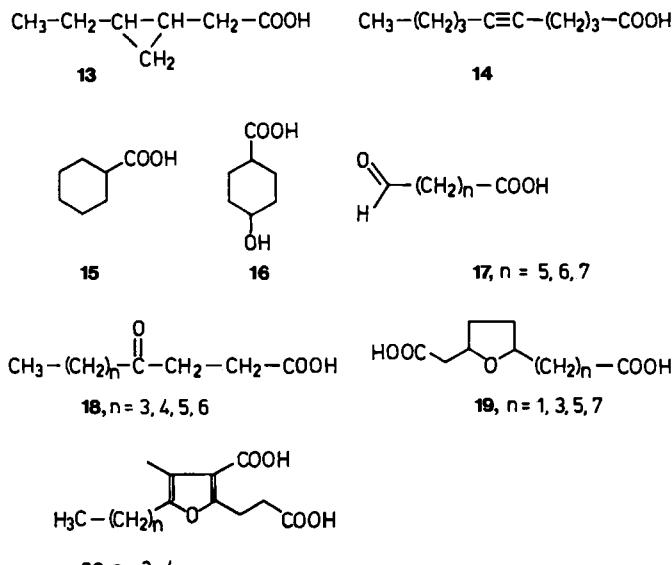
Mit dieser Menge gelingt in der Regel heute eine eindeutige Strukturableitung, vorausgesetzt, das Molekül hat ein

[*] Unter Auflösung versteht man, daß zwei verschiedene Massen voneinander durch ein „Tal“ getrennt sind; z. B. ist bei einer Auflösung $R = M/\Delta M = 50\,000$ eine zu messende Masse mit 500 Da von einer benachbarten Masse mit 500.01 Da noch durch ein Tal getrennt, während bei einer Auflösung von $R = 3000$ die Massen 500.00 und 500.01 Da nicht mehr getrennt sind. In diesem Fall ist nur eine Trennung von Masse 500.00 und 500.17 Da möglich.

[**] Hierbei wird die zu bestimmende Substanz zusammen mit einer Referenzverbindung, die Ionen bekannter Massen liefert, in das Massenspektrometer eingeführt. Nun werden diejenigen unterschiedlichen Beschleunigungsspannungen gemessen, die zur „deckungsgleichen“ Fokussierung eines Referenzpeaks bekannter Masse und des unbekannten Peaks notwendig sind. Der Spannungsquotient ist identisch mit dem Quotienten der beiden Massen. Damit kann man die genaue Masse des unbekannten Ions (z. B. des Molekül-Ions) mit einem sehr kleinen Fehler (< 5 ppm) berechnen.

Molekulargewicht unter etwa 2000, die notwendigen mikrochemischen Abbauversuche wurden sorgfältig geplant, und die Reaktionsprodukte sind gaschromatographisch – zumindest nach Derivatisierung – trennbar. Beispielhaft für derartige kombinierte Strukturaufklärungen sind die Arbeiten von Bergström et al. an Prostaglandinen^[28].

In den letzten Jahren wurden in biologischen Flüssigkeiten eine große Zahl bisher unbekannter Säuren identifiziert, die zum Teil recht ungewöhnliche Strukturen aufweisen. Aus Harn isoliert man z.B. die Cyclopropansäure **13**^[29], die Acetylenverbindung **14**^[30], die Cyclohexancarbonsäure **15**^[31], die 4-Hydroxycyclohexancarbonsäure **16**^[32], die Aldehydsäuren **17**^[33], die 4-Oxosäuren **18**^[33] oder die Tetrahydrofuransäuren **19**^[34] und die Urofuransäuren **20**^[23] (Schema 4), die darauf hinweisen, daß uns bisher noch viele Wege des Stoffwechsels verborgen geblieben sind.



Schema 4. Kürzlich entdeckte Carbonsäuren in Humanurin.

5. Säuren als Abbauprodukte körpereigener Stoffe und von Nahrungsmitteln

Es ist nicht leicht zu entscheiden, ob eine Verbindung im Körper gebildet wird oder eventuell als Nahrungsmittelbestandteil unverändert den Körper passiert. Eine Klärung dieser Frage gelingt durch folgendes Experiment: Ist die betreffende Verbindung auch im Harn von Säuglingen zu finden, die ausschließlich mit Muttermilch ernährt werden, und verläuft die Suche nach der Verbindung in der Muttermilch ergebnislos, so ist der Beweis erbracht, daß sie im Körper entsteht^[35].

Die Vermutung, daß ein Stoff aus einem bestimmten Nahrungsmittel stammt, kann untermauert werden, indem man dieses Nahrungsmittel nicht zu sich nimmt und feststellt, daß die betreffende Verbindung aus den Harnproben verschwindet. Eindeutigere Aussagen bringt auch die Untersuchung vor, während und nach einer „Nulldiät“: Stoffe, die den Körper unverändert passieren (z. B. 3,4-Dihydroxybenzoësäure), werden schon nach eintägiger Null-

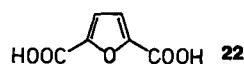
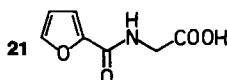
diät nicht mehr im Harn gefunden. Stoffe, die zwar exogenen Ursprungs sind, aber metabolisiert werden, findet man noch bis zu einer Woche nach Beginn der Nulldiät im Harn (z. B. Metaboliten von Piperin), während im Stoffwechsel aus körpereigenen Depots gebildete Stoffe auch nach längeren Hungerperioden noch ausgeschieden werden (z. B. **19**)^[15].

Bisher suchte man immer zuerst nach physiologisch aktiven Verbindungen und isolierte diese dann für eine Strukturaufklärung. Jetzt könnte man auch den umgekehrten Weg gehen: Physiologisch aktive Verbindungen werden oft nur in sehr kleinen Mengen gebildet und häufig in inaktive Verbindungen umgewandelt, die dann im Harn, wo sie sich anhäufen, ausgeschieden werden. Über solche Abbauprodukte sollte man daher an die aktiven Vorstufen gelangen können.

Bei der Suche nach eventuell aktiven Vorstufen können mögliche Vorstufen synthetisiert werden. In Tierversuchen läßt sich feststellen, ob diese zu den betreffenden Harninhaltsstoffen abgebaut werden^[36]. Man kann aber auch in Leber, Niere und anderen Organen nach entsprechenden Vorstufen suchen. Durch solche Untersuchungen wurde z. B. nachgewiesen, daß die Tetrahydrofurandiessigsäure **19** ($n=1$) durch oxidativen Abbau aus höheren Homologen, die im Körper gebildet werden, entsteht^[35]. Die Suche nach den physiologisch aktiven Vorstufen erscheint in diesem Falle lohnend. Dagegen sind die Aldehydsäuren **17** weniger interessant. Sie sind nämlich Oxidationsprodukte der Linolensäure und gelangen wahrscheinlich bereits mit der Nahrung in den Körper^[37], ebenso wie die Cyclohexancarbonsäure **15**^[31].

Soviel wir heute wissen, stammen die meisten der im Harn ausgeschiedenen Säuren aus Nahrungs- oder Genußmitteln. Nur ein Bruchteil aller ausgeschiedenen Säuren sind Produkte, die nur der Körper herzustellen vermag. Auf die Erforschung dieser Verbindungen sollte sich unser Interesse in Zukunft richten, weil sie uns ermöglichen, noch unbekannte Stoffwechselprozesse aufzufinden. Voraussetzung für derartige Untersuchungen ist die Kenntnis, welche Stoffe in Nahrungsmitteln enthalten sind. Aber auch auf diesem Gebiet ist unser Wissen ähnlich lückenhaft wie auf dem des Stoffwechsels. Moderne Analysemethoden werden zwar vielfach zur Untersuchung von Aroma- und Geschmacksstoffen, kaum aber zur Ermittlung der Gesamtinhaltsstoffe pflanzlicher Nahrungsbestandteile herangezogen.

Der Gehalt an Säuren in Nahrungsmitteln ist sehr unterschiedlich^[38], so daß allein durch die aufgenommene Nahrung erhebliche individuelle Unterschiede in den Profilen zu erwarten sind. Jedoch besteht die Möglichkeit, daß mit der Nahrung aufgenommene Säuren in den Stoffwechsel eingebunden werden und so ein Gleichgewicht zwischen aufgenommenen und abgegebenen Säuren zustande kommt. Nur wenig Untersuchungen wurden bisher darüber angestellt^[39]; so weiß man etwa, daß gemüsereiche Ernährung die Ausscheidung aromatischer Säuren fördert^[40]. Trotzdem werden einige dieser Säuren wie Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure, die auch aus Catecholaminen entstehen, dazu herangezogen, die Konzentration dieser Amine zu erschließen^[40, 41]. Auch 2-Furoylglycin **21** und 2,5-Furandicarbonsäure **22** (Schema 5) werden über die Nahrung dem Körper zugeführt^[42].



Schema 5. 2-Furoylglycin 21 und 2,5-Furandicarbonsäure 22.

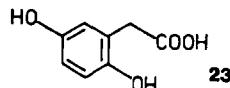
In Ermangelung gesicherter Erkenntnisse hat man die Ausscheidungsmengen an Säuren von Einzelindividuen gemittelt und diese Mittelwerte als „Normalprofil“ gewertet^[43]. Besser wäre es sicher, die körpereigenen Säuren von den mit der Nahrung aufgenommenen Säuren zu trennen und nur für diese „Normalwerte“ festzulegen.

Das Aufstellen eines „Normalprofils“ setzt voraus, daß die Säureausscheidung in einem Individuum sich nicht regelmäßig oder durch äußere Umstände bedingt ändert. Diese Voraussetzung ist aber nicht immer erfüllt. So beobachtet man eine starke Änderung der Säureausscheidung bei körperlicher Anstrengung. Der Gehalt an Propylurofuransäure 20 fällt z. B. innerhalb von drei Stunden auf 1/5 der ursprünglichen Menge ab^[44]. Allerdings fehlt es auch auf diesem Gebiet an eingehenden Studien.

6. Untersuchung von Stoffwechselkrankheiten, die mit der Ausscheidung ungewöhnlich hoher Säremengen verbunden sind

Säureprofile tragen entscheidend zur Aufdeckung angeborener Stoffwechseldefekte bei, weil in vielen dieser Fälle durch Enzymdefekte eine Anhäufung von sauren Metaboliten bewirkt wird, die zu abnorm hohen Ausscheidungsmengen im Harn führen.

Einige dieser meist sehr seltenen, genetisch bedingten Stoffwechselkrankheiten sind schon seit der Jahrhundertwende bekannt, z. B. die Alkaptonurie: Patienten, die an dieser Krankheit leiden, mangelt es an Homogentisinsäure-Oxidase, so daß Homogentisinsäure 23 (Schema 6) in Mengen von 4–8 g pro Tag im Harn ausgeschieden wird^[45].



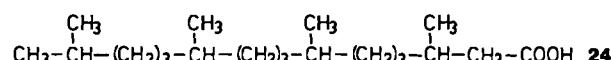
Schema 6. Homogentisinsäure 23.

Viele der etwa 1400 heute bekannten genetisch bedingten Stoffwechselkrankheiten^[46] führen sehr rasch zu schwerwiegenden körperlichen und geistigen Schäden. Beobachtet man nach der Geburt oder im frühen Säuglingsalter Muskelkrämpfe, unstillbares Erbrechen, Acidose etc., so ist eine gründliche Untersuchung auf Stoffwechseldefekte angezeigt^[47].

Heute spielt bei diesen Untersuchungen die GC/MS eine wichtige Rolle^[48], wobei Harnprofile der Patienten mit denen Gesunder verglichen werden. Treten in den Gaschromatogrammen des Harns von Kranken ungewöhnliche Peaks auf, so kann dies ein Hinweis auf einen Stoffwechseldefekt sein. Durch Massenspektren dieser Fraktionen kann dann die Struktur bestimmt werden^[49].

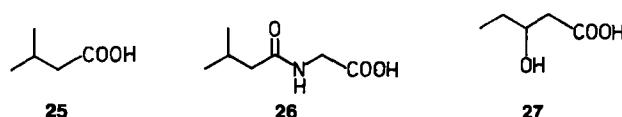
Bemerkenswert ist, daß man zwar oft auf diese Weise ein bisher unbekanntes Stoffwechselprodukt fand, bei genauer Untersuchung stellte sich aber heraus, daß die offenbar für die Krankheit „spezifische“ Verbindung auch im Harn Gesunder enthalten ist, jedoch in so kleiner Menge, daß sie erst gefunden wird, wenn man nach ihr sucht. Das für die Krankheit spezifische Merkmal ist also nicht das Vorhandensein der Verbindung, sondern ihre extrem große Menge.

Erstmals wurde die GC/MS bei der Untersuchung einer Lipidspeicher-Krankheit („Refsum-Syndrom“) 1963 eingesetzt und damit im Harn des Patienten Phytansäure 24 identifiziert^[50] (Schema 7).



Schema 7. Phytansäure 24.

1966 konnten Tanaka et al. nachweisen, daß bei einer bis dahin unbekannten Stoffwechselkrankheit Isovaleriansäure 25 und ihr Glycinkonjugat 26 sowie 3-Hydroxyvaleriansäure 27 (Schema 8) in großen Mengen ausgeschieden werden^[51].



Schema 8. Isovaleriansäure 25, ihr Glycinkonjugat 26 und 3-Hydroxyvaleriansäure 27.

Mit der Verbesserung der Nachweismethodik wurden bei Vorliegen dieser „Isovaleriansäure-Urie“ immer neue ungewöhnliche Metaboliten, die durch den Mangel an Isovaleryl-Coenzym-A-Dehydrogenase hervorgerufen werden, entdeckt^[52].

In der Folge wurden – vor allem durch die Untersuchungen von Jellum et al.^[53a,c] initiiert – mit Hilfe der GC/MS eine große Zahl bisher unbekannter Stoffwechseldefekte gefunden, die alle durch eine übermäßige Ausscheidung von Säuren charakterisiert sind, z. B. die Methylmalonsäure-Urie^[53,54], die Pyroglutaminsäure-Urie^[53a], die Hydantoin-5-propionsäure-Urie^[55], die Propionsäure-Urie^[56], die Glutarsäure-Urie^[57] und die Glutarsäure-Urie II^[58]. In Anschlußarbeiten konnte dann mit besseren Methoden gezeigt werden, daß teilweise sehr viele ungewöhnliche Metaboliten entstehen, wie bei der Propionsäure-Urie^[59], die auf eine Störung im Stoffwechsel von Propionyl-CoA zurückgeht, oder bei der Tyrosin-Urie, die durch einen Defekt der Tyrosinamino-Transferase entsteht^[60]. Besonders zahlreich sind Defekte im Stoffwechsel der Aminosäure Leucin, die je nach Enzymdefekt eine Palette von Krankheiten verursachen können^[61].

Mit Hilfe der GC/MS-Kombination wurden mehr als fünfzig bisher unbekannte angeborene Krankheiten auf Stoffwechseldefekte zurückgeführt, für eine noch größere Zahl wurde die Gaschromatographie als geeignete Methode zu ihrer eindeutigen Identifizierung erkannt^[62].

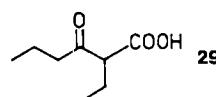
Säuren, die im Harn von Patienten mit Stoffwechselstörungen gefunden werden, müssen nicht unbedingt eine Folge des Krankheitsgeschehens sein. So wurde beispielsweise kürzlich über das Auftreten von 3-Ethyl-3-hydroxy-glutarsäure **28** (Schema 9) im Harn von Kindern, die an Propionsäure-Urie leiden, berichtet^[63].



Schema 9. 3-Ethyl-3-hydroxy-glutarsäure **28**.

Da bei der gaschromatographischen Trennung mit gepackten Säulen gearbeitet wurde, der betreffende Peak durch seine Breite die Gegenwart einer Beimengung andeutet und überdies nicht sehr hoch ist, obendrein dieselbe Verbindung auch im Harn Gesunder auftritt und wahrscheinlich aus Nahrungsmittelbestandteilen stammt^[64], sollten solche Ergebnisse besonders kritisch überdacht werden.

Gründliche Überlegungen wären sicher auch darüber anzustellen, ob die im Harn von Diabetikern gefundene 2-Ethyl-3-oxohexansäure **29**^[65] (Schema 10) ein körpereigenes Stoffwechselprodukt ist und nicht etwa ein Abbauprodukt eines Artefaktes, denn der betreffende Alkohol wird aus Dioctylphthalat gebildet, das nahezu ubiquitär in allen biologischen Materialien zu finden ist und über Weichmacher in den Körper gelangt. Immerhin scheinen Diabetiker Schwierigkeiten zu haben, 2-Ethyl-3-oxohexansäure weiter abzubauen.

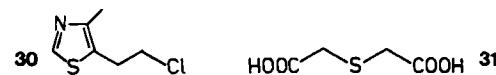


Schema 10. Im Harn von Diabetikern entdeckte 2-Ethyl-3-oxohexansäure **29**.

7. Untersuchung von Arzneimittelmetaboliten

Säuren werden häufig bei der Metabolisierung von Arzneimitteln gebildet. Vergleicht man Profile vor, während und nach der Verabreichung des Medikamentes, so geben sich die aus dem Arzneimittel gebildeten Säuren durch zusätzliche Peaks in dem während der Behandlung aufgenommenen Gaschromatogramm der Urinsäurefraktion zu erkennen. Diese Methode mag daher Stoffwechseluntersuchungen mit radioaktiv markierten Verbindungen ergänzen.

Beispielsweise wird 5-(2-Chlorethyl)-4-methylthiazol (Clomethiazol oder Distraneurin[®]) **30**, ein vielfach verwendetes Medikament zur Minderung der Entzugserscheinungen bei Alkoholikern, nicht nur durch oxidativen Angriff an den Kohlenstoffatomen der Seitenkette^[66] abgebaut, sondern auch durch Oxidation an C2 mit nachfolgender Ringspaltung. Da hierbei das die Markierung tragende C2 als CO₂ verloren geht, entgingen einige wichtige Metaboliten dem Nachweis. Jedoch erbrachte der Vergleich der Profile des unbehandelten und behandelten Individuums Hinweise auf weitere vermutete Metaboliten, die C2 verloren hatten, z.B. Thiodiessigsäure **31**^[67] (Schema 11).



Schema 11. 5-(2-Chlorethyl)-4-methylthiazol (Distraneurin[®]) **30** und die wahrscheinlich aus der Seitenkette durch Umsetzung mit Glutathion entstandene Thiodiessigsäure **31**.

Neben Harn ist Speichel eine ohne großen Aufwand erhältliche biologische Flüssigkeit. Im Speichel sind die gleichen Stoffwechselprodukte wie in anderen Körperflüssigkeiten enthalten, wie eine entsprechende Untersuchung der Säuren zeigte^[68].

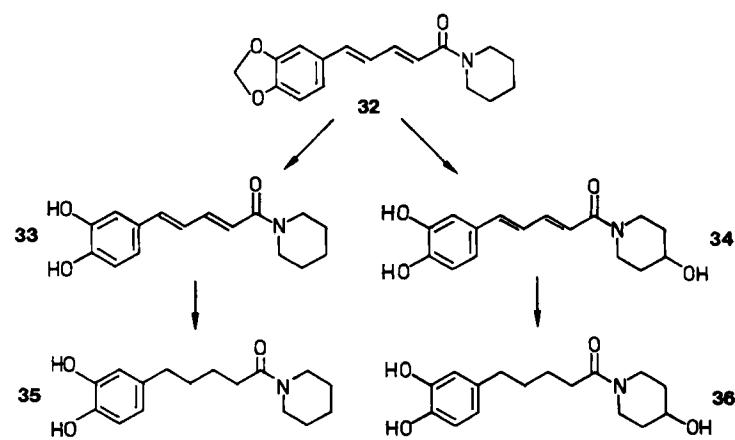
8. Steroidprofile

Im Gegensatz zu Säuren, die vielfach exogener Herkunft sind, sind Steroide in biologischen Flüssigkeiten endogenen Ursprungs, so daß man sich nicht mit der Frage auseinandersetzen muß, ob ein Teil von ihnen aus der Nahrung oder aus Genußmitteln stammt. Allerdings erfordert die Gewinnung der Steroidfraktion größeren Aufwand als die der Säurefraktion, denn die Steroide liegen überwiegend in Konjugatform vor.

In der Regel verzichtet man bei Routineuntersuchungen auf eine mögliche Trennung^[69] von freien Steroiden und solchen, die als Sulfat- und Glucuronidkonjugate ausgeschieden werden. Die Konjugate werden meist enzymatisch hydrolysiert und dann mit einem organischen Solvens, z. B. Essigsäureethylester oder Ether, extrahiert.

Allerdings werden dabei, selbst wenn Säuren durch Zusatz von Hydrogencarbonat entfernt werden, aus der Nahrung stammende Neutralstoffe in die Steroidfraktion eingeschleppt. So treten bei Verzehr von „Lakritze“ enthaltenden Süßwaren zahlreiche Peaks auf, die von Flavanonen stammen. Auch Oxindol ist ein häufiger Störstoff^[70]. Fast immer enthalten Harnsteroidprofile die Abbauprodukte des Pfefferbestandteils Piperin **32**, das mit der Nahrung in den Körper gelangt. Interessanterweise fehlen diese Metaboliten **35** und **36** bei etwa jeder zehnten Person, die dann die Vorstufen **33** und **34** ausscheidet^[24] (Schema 12).

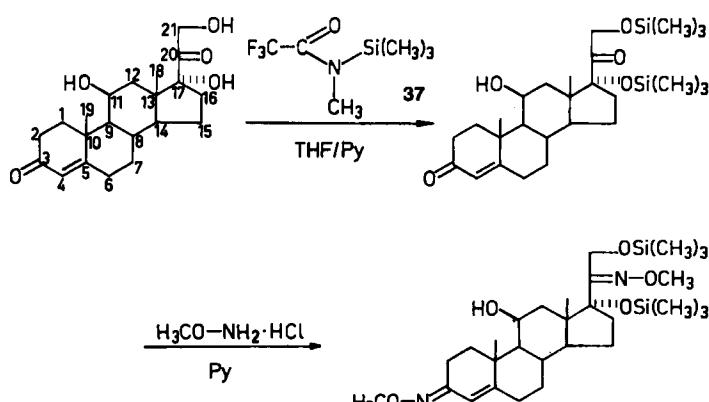
Vollständig und schonend lassen sich Steroide und Konjugate durch Extraktion mit XAD-Harzen isolieren^[71]. Die Steroide können dann mit Methanol eluiert und weiter



Schema 12. Piperin **32** und die im Harn ausgeschiedenen Metaboliten **33**, **34**, **35** und **36**.

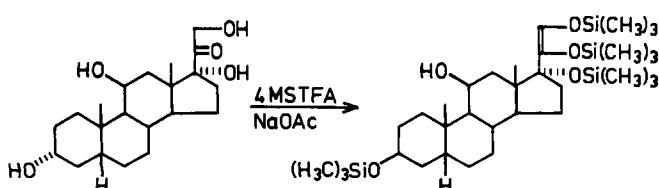
aufgearbeitet werden. Auch lipophiles Sephadex wird für diesen Zweck verwendet^[72]. Nachteilig ist bei diesen Adsorptionsverfahren die langwierige Waschprozedur. Diese Nachteile werden durch Verwendung von Sep-Pak-C-18-Kartuschen, auf die die biologische Flüssigkeit aufgebracht wird und die alle Steroide adsorbieren, großteils vermieden^[73]. Diese Methode läßt sich auch zur Gewinnung der Steroide aus Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten anwenden^[74].

Einige wenige polare Steroide sind zwar underivatisiert gaschromatographisch trennbar, wie erstmals Horning et al. zeigten^[75], doch werden bereits einfache Hydroxysteroide zersetzt. Fortschritte brachte die Herstellung von Trimethylsilyl-Derivaten^[76]. Dieser Schutz reicht aber noch nicht aus, um zu verhindern, daß Steroide mit Hydroxygruppen in Stellung 17 und 21 zu 17-Oxosteroiden zersetzt werden^[77]. Solche Steroide, z. B. Cortisol, sind erst faßbar, seitdem man trimethylsilylierte Methoxim-Derivate (MO-TMS-Derivate) herstellt^[78] (Schema 13).



Schema 13. Trimethylsilylierung und Methoximbildung von Cortisol; THF: Tetrahydrofuran.

Moderne Trimethylsilylierungsreagentien wie *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) 37 oder Trimethylsilylimidazol (TMSI) 38 ermöglichen heute die Überführung in Trimethylsilylenolether^[79], die den MO-TMS-Derivaten gleichwertige gaschromatographische Eigenschaften zeigen (Schema 14).



Schema 14. Trimethylsilylenolether-Bildung von 5β-Tetrahydrocortisol.

Wir verwenden fast ausschließlich derartige Derivate. Weitere wichtige Fortschritte in der Steroidanalytik brachte die Einführung von Kapillarsäulen, die seit etwa 1970 verwendet werden^[80].

Harnsteroidprofile gesunder Erwachsener sind durch einen charakteristischen Doppelpeak im Bereich der Androgener, Androsteron und Etiocholanolon entsprechend, gekennzeichnet^[78a, 81] und durch einen ebenso intensiven

Peak von Tetrahydrocortison im Bereich der Corticoidmetaboliten^[3a, 81, 82] (Abb. 3).

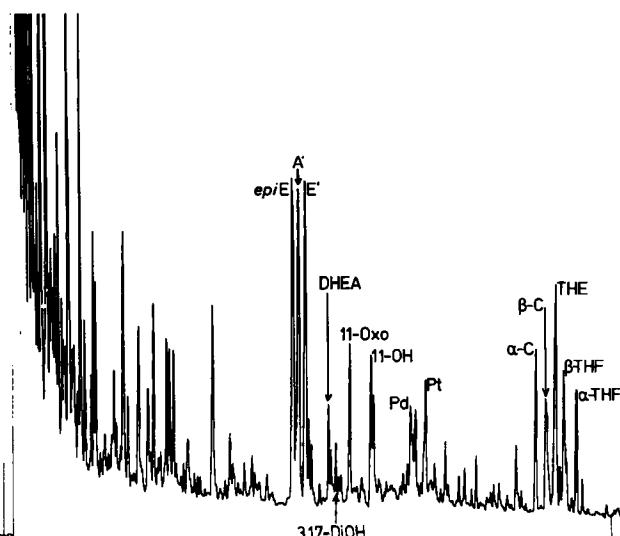
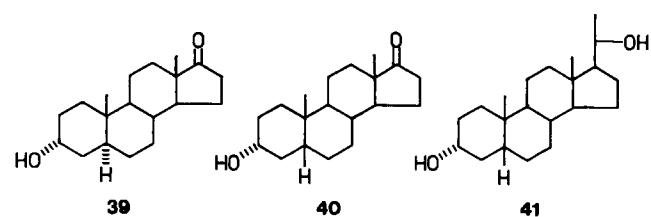


Abb. 3. Harnsteroidprofil eines gesunden Mannes (24 Jahre); *epi*-Etiocholanol (epi/E) als interner Standard, Androsteron (A'), Etiocholanol (E'), Dehydroepiandrosteron (DHEA), 3,17-Dihydroxyandrost-5-en (3,17-DIOH), 11-Oxotetrahydrocortisol (11-Oxo), 11-Hydroxytetrahydrocortisol (11-OH), Pregnandiol (Pd), Pregnatriol (Pt), α -Cortolone (α -C), β -Cortolone (β -C), Tetrahydrocortisol (THE), β -Tetrahydrocortisol (β -THF), *allo*-Tetrahydrocortisol (α -THF). Aufnahmebedingungen: Gaschromatograph Siemens L402 mit WCOT-Glaskapillare (30 m \times 0.3 mm, OV 101); Wasserstoff-Flußrate: 2 mL/min; Injektortemperatur: 270°C; Ofentemperatur: 150–280°C (2°C/min); Flammenionisationsdetektor (FID). Die Steroide werden als Trimethylsilylenolether getrennt.

Macht die Intensität des Tetrahydrocortisonpeaks in Profilen Gesunder nur einen Bruchteil der Intensität der Peaks von Androsteron und Etiocholanolon aus, so ist der Verdacht begründet, daß bei der Aufarbeitung Fehler gemacht wurden. Dies trifft vielfach auf ältere Arbeiten zu.

Eigentlich müßte man erwarten, daß ein Steroidprofil eine eindeutige Geschlechtszuordnung ermöglicht. In der Regel findet man zwar geschlechtsspezifische Unterschiede^[83]: In Harnsteroidprofilen überragt bei erwachsenen Männern im allgemeinen der Peak von Androsteron 39 den von Etiocholanolon 40 (Schema 15) beträchtlich, während bei Frauen der Etiocholanolonpeak etwa doppelt so hohe Intensität zeigt wie der Androsteronpeak. Manche gesunde Männer zeigen jedoch ein Harnsteroidprofil, das dem von Frauen gleicht, und auch Frauen müssen nicht unbedingt mehr Etiocholanolon als Androsteron ausscheiden^[84].

In der zweiten Hälfte des Cyclus von Frauen kommt es zu einem starken Anstieg der Exkretion von Pregnandiol 41 (Schema 15), die sich im Steroidprofil niederschlägt (Abb. 4).



Schema 15. Androsteron 39, sein Isomer Etiocholanolon 40 und Pregnandiol 41.

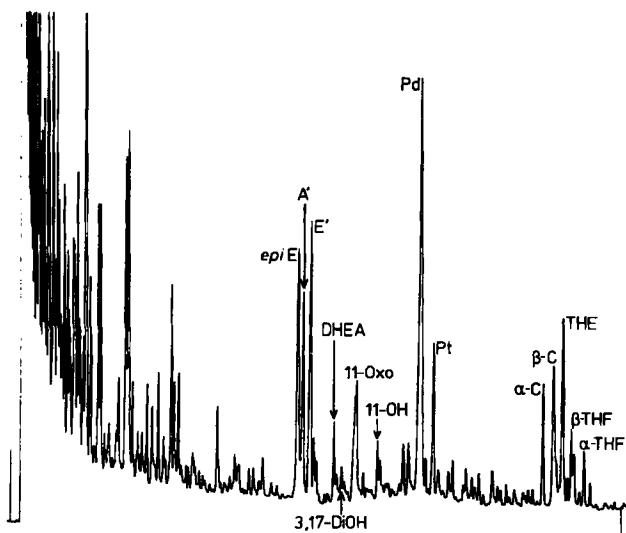


Abb. 4. Harnsteroidprofil einer gesunden Frau (27 Jahre, zweite Cyclushälfte), Aufnahmebedingungen und Abkürzungen wie in Abbildung 3.

Der in der Schwangerschaft veränderte Hormonhaushalt läßt sich insbesondere an einem erheblichen Anstieg der Pregnandiol-Ausscheidung erkennen^[85]. Der Steroidstoffwechsel des Foeten unterscheidet sich von dem der Mutter. Der Foetus gibt seine Steroide zurück an die Mutter, so daß die Menge der für Foeten typischen 16-Hydroxysteroide als Maßgröße für den normalen Verlauf einer Schwangerschaft herangezogen wird^[86]. Mit Hilfe der GC/MS wird die Ausscheidung von 6-hydroxylierten Pregnan-Derivaten untersucht, die vor allem im letzten Drittel der Schwangerschaft Bedeutung hat^[87].

Die allmähliche Bildung des Steroidhaushaltes in den ersten Lebensmonaten spiegelt sich in den Steroidprofilen wider: Die fötale Zone der Nebennierenrinde, die sich allmählich zurückbildet, produziert andere Steroide als für Erwachsene typisch. Die Steroidprofile von Neugeborenen und Säuglingen sind daher durch die Gegenwart von Steroiden gekennzeichnet, die eine 3β-Hydroxy-5-en-Struktur^[88] aufweisen und häufig auch zusätzliche Hydroxygruppen in den Positionen 16, 18 und 21 tragen, sowie durch Corticoidmetaboliten mit Hydroxygruppen in Stellung 1 oder 6. An der Trennung, der Strukturuntersuchung und Aufklärung dieser Steroide hatte die GC/MS großen Anteil^[89].

Erwartungsgemäß findet man in Harnproben von Kindern vor der Pubertät nur geringe Ausscheidung an Androgenen. Auch der Alterungsprozeß läßt sich an den Profilen ablesen: Der Gehalt an Androgenen fällt gegenüber dem an Corticoiden stark zurück^[85].

Die Ausscheidungsmenge der Steroide bei Erwachsenen zeigt eine circadiane Rhythmus^[90]: Die mittlere Exkretionsmenge ist im Wachzustand etwa zehnmal höher als im Schlaf. Die Unterschiede in den Steroidmengen können durch Verwendung von „24-Stunden-Urin“ ausgeglichen werden. Die Schwankungen der Steroidausscheidungsmengen eines Individuums von Tag zu Tag können bis zu 50% betragen^[84] (Abb. 5).

Während die absoluten Steroidmengen erheblich variieren, unterliegen die relativen Steroidmengen nur geringen Schwankungen. In gesunden Menschen bleibt ein ein-

mal vorgegebenes Verhältnis von Androsteron zu Etiocholanolon über Jahre nahezu konstant^[84].

Bei chronischen Krankheiten allerdings kann sich der Steroidspiegel allmählich ändern (siehe unten). Jeder Körper arbeitet also ähnlich einer chemischen Fabrik; wird die Produktion erhöht, so fallen auch die Nebenprodukte in entsprechend größeren Mengen an.

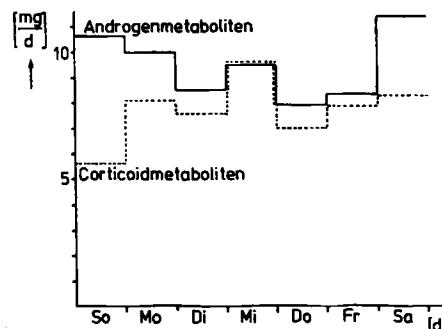
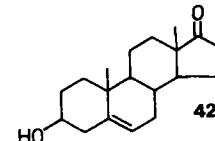


Abb. 5. Mittlere tägliche Androgen- und Corticoidausscheidungsmengen eines gesunden Mannes (25 Jahre) während einer Woche.

Das Steroid Dehydroepiandrosteron **42** (DHEA) (Schema 16) nimmt gegenüber allen anderen eine Ausnahmestellung ein: Die Ausscheidungsmenge an DHEA beträgt bei den meisten Menschen nur etwa 1/10 der der Hauptandrogene Androsteron **39** und Etiocholanolon **40**, steigt aber bis auf das Zehn- und Zwanzigfache im Zustand psychischer Beanspruchung^[91].



Schema 16. Dehydroepiandrosteron **42** (DHEA).

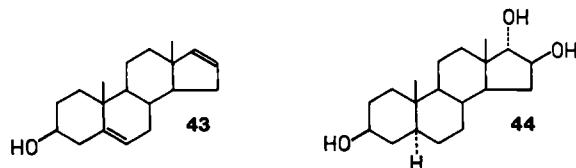
Etwa jeder zehnte Mensch scheidet diese hohen Mengen an DHEA stetig aus^[84]. Frauen, die unter Hirsutismus leiden, sind häufig DHEA-Hochausscheider^[92]. Mit psychischem und emotionalem Stress ist auch eine erhöhte Ausscheidung der Corticoide verbunden.

Steroide werden nicht nur im Harn, sondern auch im Kot ausgeschieden, allerdings unterliegen sie im Darm dem Angriff von Mikroorganismen^[93]. Um zu erkennen, was mit Steroiden im Darm geschieht, wurde die Steroidausscheidung im Kot von konventionellen und keimfreien Ratten eingehend studiert^[94]. Dies führte zu dem Schluß, daß Steroide in den Darm abgegeben und wieder resorbiert werden. 21-Hydroxysteroids z. B. werden durch die interne Bakterienflora von Ratten dehydroxyliert^[95].

Im Gegensatz zu Menschen wurden bei Ratten erhebliche geschlechtsspezifische Unterschiede in der Tendenz zur Hydroxylierung des D-Ringes bestimmter Androstane-Derivate beobachtet, z. B. von 5,16-Androstadien-3β-ol **43**: Im Harn männlicher Ratten dominiert 5α-Androstan-3β,16β,17α-triol **44** (Schema 17), während im Harn weiblicher Ratten kein analoger Metabolit auftaucht^[96].

Ausgehend von der Beobachtung, daß männliche und weibliche Ratten stark unterschiedliche Steroidprofile auf-

weisen, konnten Eriksson und andere zeigen, daß Leberenzyme, die für die Corticoidmetabolisierung verantwortlich sind, von Androgenen und Östrogenen reguliert werden^[97]. Die Metabolisierung eines Steroids in der Leber läßt sich studieren, wenn man dieses der Einwirkung von den aus Ratten gewonnenen Lebermikrosomen aussetzt und dann Extrakte mit GC/MS untersucht^[98].



Schema 17. 5,16-Androstadien-3 β -ol 43 und sein im Harn männlicher Ratten dominierender Metabolit 5 α -Androstan-3 β ,16 β ,17 α -triol 44.

Da Zusammenhänge zwischen dem Gallensäurestoffwechsel und Erkrankungen des Magen-Darmtraktes bestehen, wurde die GC/MS schon sehr frühzeitig zur Untersuchung von Gallensäuren und Vorstufen eingesetzt, insbesondere von der Arbeitsgruppe Sjövall^[99], wobei mit der Methode bisher unbekannte Gallensäuren entdeckt wurden. Aber auch andere Steroide wurden in der Galle und im Serum entdeckt und bestimmt^[100].

Erwartungsgemäß wirken sich Störungen in der Funktion steroidbildender Drüsen extrem stark auf die Steroideausscheidung aus: z. B. bedingt ein Mangel an 11 β -Hydroxylase eine verminderte Cortisolproduktion und damit eine starke Erniedrigung der Ausscheidung an Tetrahydrocortisol. So führt eine Funktionsstörung der Nebennierenrinde zu einem drastischen Abfall vor allem der Corticoidproduktion.

Die eingeschränkte Fähigkeit, Steroidsulfate zu spalten, ist mit einer pathologisch verlängerten Schwangerschaft verknüpft. Eine Analyse der Sulfatfraktion des Harns einer Schwangeren ermöglicht es, diesen Defekt von anderen möglichen Ursachen einer mangelhaften Östrogenausscheidung bei Schwangeren zu unterscheiden, weil bei Sulfatasemangel drastisch erhöhte Mengen an Steroidsulfaten ausgeschieden werden^[101].

3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasemangel zeigt sich in einer extrem hohen Ausscheidung an 3 β -Hydroxy-4-en-Steroïden^[102].

Eine angeborene Unterfunktion der Nebennierenrinde äußert sich bei Säuglingen durch stark reduzierte Ausscheidung an 3-Hydroxy-5-en-Steroïden^[103], das Vorliegen eines Tumors der Nebennierenrinde in einer starken Erhöhung der Ausscheidung aller Steroide, insbesondere aber von Dehydroepiandrosteron, 16 β -Hydroxydehydroepiandrosteron und Androstetriol. Ein Mangel an 21-Hydroxylase wiederum ist an der stark verminderten Ausscheidung an Corticoiden und einer erhöhten Exkretion der 17 β -Hydroxysteroidmetaboliten wie Pregnatriol und Pregnatriolon erkennbar^[104].

Der Mangel an Enzymen, die 18-Hydroxysterioide zu Aldehyden oxidieren (Aldosteronsyntheseweg), führt zur erhöhten Ausscheidung dieser Steroide^[105]. Dagegen äußert sich ein 17-Hydroxylasemangel in der niedrigen Ausscheidung von Androgen- und Cortisolmetaboliten; stattdessen findet man hohe Corticosteraunausscheidung^[106].

Zur Erkennung von Stoffwechselstörungen der Steroide wurden Atlanten erstellt, die typische Ausscheidungsmuster enthalten und so eine Identifizierung der Störungen ermöglichen^[107].

Unerwartet findet man auch Störungen des Steroidhaushaltes bei chronischen Krankheiten. So ließ sich zeigen, daß im Blutultrafiltrat die Hauptsterioide 11-oxidierte Androstanerivate (Abb. 6) sind, während die Produktion der üblichen Androgene sich sehr vermindert hat und das Verhältnis von Androsteron zu Etiocholanolon sich mehr und mehr zugunsten von Etiocholanolon verschiebt^[108]. Die Vermehrung der 11-oxidierten Steroide verläuft hierbei etwa parallel zur Entwicklung einer Hypertonie^[109].

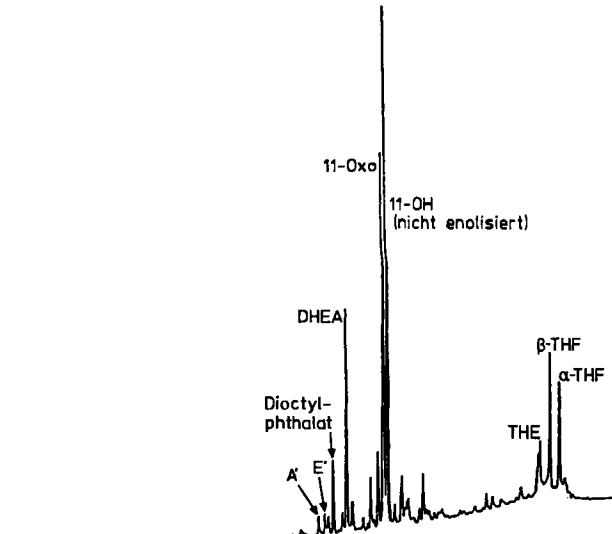


Abb. 6. Steroidprofil aus Ultrafiltrat eines Urämikers (Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3).

Bemerkenswert ist die durch Urämie bedingte Änderung des Blutsteroidbilds: Während, abgesehen von Cholesterin, das Hauptsteroid im Blut Dehydroepiandrosteron ist, findet man meist neben diesem Steroid das Androst-5-en-3 β ,17 β -diol als Hauptsteroid^[108].

Das Steroidbild ist auch bei Diabetikern^[110] und Leberkranken^[111] (Abb. 7) verändert. Hierbei kommt es zur Ausscheidung großer Mengen an Vorstufen der Gallensäuren in Form von Steroidalkoholen, die sich von Cholesterin ableiten. Sie sind sonst nur in Spuren vorhanden.

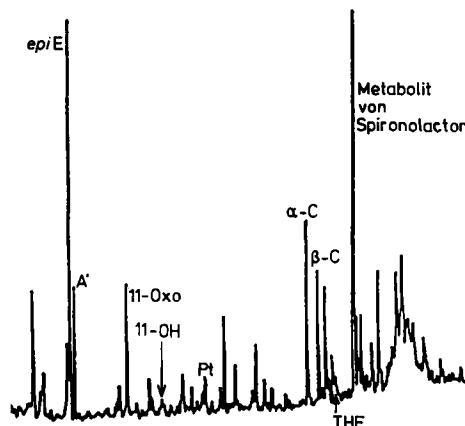
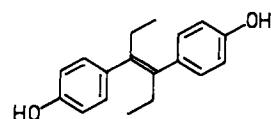


Abb. 7. Harnsteroidprofil bei Leberkrankheit (Wilson's Syndrom) (Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3).

Eine Änderung des Steroidhaushaltes scheint auch für einige Hautkrankheiten typisch zu sein. So wurde gefunden, daß Psoriatiker Blutsteroidprofile zeigen, die ähnlich denen sind, die Urämiker aufweisen^[112]. Bei einer Reihe von Hautkrankheiten wie Psoriasis und Neurodermitis werden niedrigere Corticoid-Ausscheidungsmengen im Harn beobachtet^[113], die möglicherweise mit der großflächigen Hautreizung, die mit solchen Krankheiten einhergeht, in Zusammenhang stehen.

Die äußerliche Anwendung von Corticoidsalben sollte den körpereigenen Steroidstoffwechsel nicht beeinflussen. Jedoch wurde gefunden, daß Fluorcorticoide offenbar geschädigte Haut durchdringen können^[114] und so dem Körper einen erhöhten Corticoidspiegel vortäuschen, der zu einer Verminderung der körpereigenen Steroidproduktion führt, so daß dann die Harnsteroidprofile eine verminderte Steroidausscheidung anzeigen.

Eine wichtige Rolle spielt die GC/MS-Kombination bei dem Nachweis, daß bei der Viehmast künstliche Östrogene wie Diethylstilbostrol (Schema 18) verwendet werden^[115], wobei Spuren der Substanzen im Tierkörper durch „selective ion monitoring“^[116] oder „selected metastable peak monitoring“^[117] nachweisbar sind.

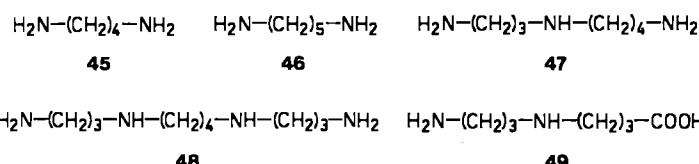


Schema 18. Das bei der Rindermast im Harn nachgewiesene künstliche Diethylstilbostrol.

9. Basenprofile

Da biologische Flüssigkeiten im allgemeinen nur sehr kleine Mengen an Basen enthalten, sind Basenprofile ein Abbild des Genußmittelkonsums. In Basenprofilen des Harns von Rauchern findet man als Hauptpeak Nicotin, in dem von Kaffeetrinkern Coffein.

Polyamine, wie Putrescin **45**, Cadaverin **46**, Spermidin **47**, Spermin **48**, Isoputreanin **49** (Schema 19) spielen vor allem in acetylierter Form eine große Rolle bei der Zellproliferation und beim Zellwachstum^[118].



Schema 19. Putrescin **45**, Cadaverin **46**, Spermidin **47**, Spermin **48** und Isoputreanin **49**.

So ist in jungem Gewebe relativ viel Spermidin **47** enthalten, in altem relativ wenig. Dies hat zur Folge, daß Polyamine in erhöhtem Maß bei Tumorerkrankungen ausgeschüttet werden. An diese Beobachtung knüpfte sich die Hoffnung, durch eine Polyaminbestimmung im Harn Krebs frühzeitig erkennen zu können. Es zeigte sich jedoch, daß man hohe Polyaminmengen auch bei anderen Krankheiten findet^[118]. Außerdem trägt selbst bei hoher Produktion von Aminen im Tumorgewebe die gegenüber

dem Körpergewicht geringe Menge an Tumorgewebe zu wenig zu der Gesamtausschüttung bei.

Wegen ihrer hohen Wasserlöslichkeit sind Polyamine und ihre Acetylivate nicht ohne weiteres aus biologischen Flüssigkeiten extrahierbar. Eine Methode zu ihrer Gewinnung beruht auf der Extraktion des alkalierten Harns mit Butanol, einer Reextraktion nach Ansäuern und der Adsorption der Amine an einem Dowex-50W-X8-Ionenaustrauscher, von dem die Amine mit HCl eluiert werden^[119]. Bei einem anderen Aufarbeitungsverfahren werden zuerst vorhandene Acetylreste mit Säure abgespalten, dann wird nach Einengen und Puffern das Hydrolysat auf eine Sep-Pak-Säule gegeben, und schließlich werden die Amine mit saurem Methanol erhalten^[120]. Zur Derivatisierung für die folgende gaschromatographische Trennung wird die Polyaminfraktion mit Heptafluorbuttersäureanhydrid acyliert.

Auf diese Weise wurden an gepackten^[119] und an Kapillarsäulen^[120] Profile erhalten, die neben den bekannten Polyaminen und Purinbasen das Vorhandensein zahlreicher anderer Amine zeigen, von denen bisher ein Abbauprodukt von Spermidin^[119] **47** sowie Isoputreanin^[120] **49** (Schema 19) identifiziert wurden. Viele Polyamine sind noch nicht identifiziert^[121].

Da Isoputreanin **49** von Gesunden in viel geringeren Mengen ausgeschieden wird als von erfolgreich behandelten Patienten, die an Lymphomatose litten, wurde vermutet, daß analytisch der Therapieerfolg bei solchen Krankheiten studiert werden könnte^[120].

Neurophysiologische Vorgänge sind eng mit der Freisetzung von Catecholaminen verknüpft. Ihre Bestimmung ist bedeutsam, weil man die Ausschüttung von Catecholaminen in Zusammenhang bringt mit Nervenkrankheiten wie Schizophrenie, Parkinsonsche Krankheit, Epilepsie, Migräne und depressiven Erscheinungen. Ihre Konzentration im Blut schwankt zeitlich sehr stark. Oft wird daher ihre Bestimmung im Harn vorgezogen, weil man so Durchschnittswerte der Ausschüttung über längere Zeiträume erhält.

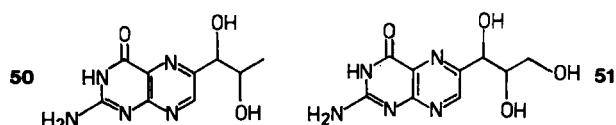
Wegen des dipolaren Charakters vieler Phenylethylamine, die sowohl basische Aminogruppen als auch phenolische Hydroxygruppen mit saurem Charakter enthalten, ist ihre Erfassung schwierig. Vielfach greift man daher auf die Bestimmung von Abbauprodukten wie Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und 4-Hydroxy-3-methoxyphenylethylenglycol zurück^[122].

Zur Bestimmung der Catecholamine wurden zahlreiche Methoden ausgearbeitet^[123], die auf einer Erfassung der biogenen Amine^[124] teilweise mittels GC/MS, teilweise mittels HPLC unter elektrochemischer Detektion der Komponenten beruhen^[125].

Aus Arzneimitteln werden häufig basische Metaboliten gebildet. Da körpereigene Amine Basenprofile kaum stören und aus einem Arzneimittel meist nur wenige basische Metaboliten entstehen, ist die GC/MS-Kombination – selbst mit gepackten Säulen – hervorragend für Routinemessungen im Zuge pharmakokinetischer Untersuchungen geeignet.

In jüngster Zeit ist die Untersuchung von Pterinen im Zusammenhang mit dem Wachstum von Tumoren wichtig geworden. Beim Auffinden und der Bestimmung von Biopterin **50** und Neopterin **51** (Schema 20) in Form trime-

thylsilylierter Derivate ist die MS von entscheidender Bedeutung^[126].



Schema 20. Biopterin 50 und Neopterin 51.

10. Aminosäureprofile

Aminosäuren und niedermolekulare Peptide gewinnt man aus biologischen Flüssigkeiten durch Ansäuern und Adsorption an einem Kationenaustauscher. Beim Spülen mit Wasser wird die Aminosäure- und Peptidsfraktion vom Ionenaustauscher festgehalten, danach wird sie mit NH₃ eluiert. Sie kann an Octadecasilyl-reversed-phase-Säulen^[127] oder Chelex 100^[128] in eine Fraktion der Aminosäuren und eine der Peptide getrennt werden.

Zur gaschromatographischen Aminosäurebestimmung wird die Aminosäurefraktion verestert und acyliert^[129], wobei man nach einem Vorschlag von Gehrke et al. meist Butylester herstellt, die in einem weiteren Schritt trifluoracetyliert werden^[130]. Schwierigkeiten bereitet bei diesem Verfahren allerdings die Erfassung von Arginin, schwefelhaltigen Aminosäuren und von Tryptophan^[131]. Durch Herstellung von *N*-Heptafluorbutyryl-*n*-butylester-Derivaten lassen sich diese Schwierigkeiten umgehen.

Die trifluoracetylierten Aminosäurebutylester lassen sich gut mit der MS charakterisieren^[130a, 132]. An gepackten Säulen wurden von Aminosäurehydrolysaten verschiedener biologischer Herkunft Profile erhalten^[133]. Sie zeigen neben den Peaks der 20 bekannten Aminosäuren noch weitere unbekannter basischer Stoffe^[134]. Beispielsweise findet man immer wieder in kleiner Menge acylierte^[135] und methylierte^[136] Aminosäuren. Da die meisten dieser Untersuchungen auf alten Arbeiten basieren und erst in jüngerer Zeit auf diesem Gebiet die Kapillargaschromatographie eingesetzt wird (Abb. 8)^[137], ist noch wenig über die unbekannten Stoffe bekannt.

Profile von Aminosäuren sind im Gegensatz zu denen der Säuren sehr konstant. Man beobachtet zwar individuelle, aber kaum zeitliche Unterschiede. Die Ausscheidungsmenge der Hauptaminosäuren schwankt nur innerhalb einer Größenordnung; die Menge dürfte allerdings mehr von der Nahrung abhängen als die von Säuren. So führt die Zufuhr proteinreicher Kost zu einer Steigerung insbesondere der Ausscheidung verzweigter Aminosäuren; ähnlich wirkt sich Stress bei Erwachsenen aus^[138]. Bei Konsum von Fleisch und vor allem von Geflügel findet man 1-Methylhistidin im Harn^[139], bei Kindern, die mit viel Milch ernährt werden, Homocitrullin^[140]. Von Kleinkindern werden erheblich größere Mengen an Glycin, Histidin, Glutamin, Alanin und Lysin ausgeschieden als von Erwachsenen^[141].

Die Aminosäureausscheidung ist bei angeborenen Krankheiten, die den Aminosäurestoffwechsel betreffen^[142], gegenüber der Gesunder erheblich verändert^[138, 141].

Die Niere hat die wichtige Aufgabe, essentielle Aminosäuren in einem weitaus größeren Maß aus Primärharn

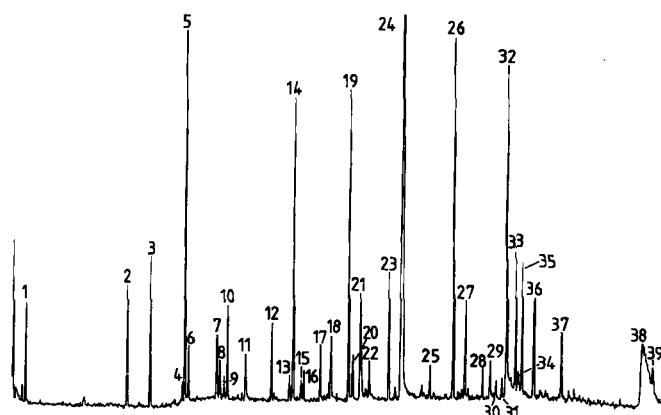


Abb. 8. Harnaminosäureprofil eines gesunden Mannes (29 Jahre). Die Aminosäuren wurden als *N*-Heptafluorbutyryl-*n*-butylester-Derivate getrennt. Alanin (3), Valin (4), Glycin (5), Threonin (6), Serin (7), β -Aminoisobuttersäure (8), Leucin (9), Isoleucin (10), Cycloleucin, Standard 1 (12), Prolin (13), Cystein (15), Hydroxyprolin (18), Methionin (22), Asparaginsäure (und Asparagin) (23), Kreatinin und Phenylalanin (24), Glutaminsäure (und Glutamin) (26), Tyrosin (27), Ornithin (30), 4-Aminomethylencyclohexancarbonäure, Standard 2 (33), Arginin (34), Lysin (35), 1-Methylhistidin (36), 3-Methylhistidin (37), Histidin (38). Unbekannt sind (1), (2), (11), (14), (16), (17), (19), (20), (21), (25), (28), (29), (31), (32) und (39). Aufnahmedaten: Gaschromatograph Carlo Erba Fractovap 4160 mit WCOT-Quarzkapillare (50 m × 22 mm, mit chemisch gebundener Phase OV 1701); Wasserstoff-Flußrate: 1.3 mL/min; Injektortemperatur: 270°C; Ofentemperatur: 130–260°C (3 min isotherm, dann mit 3°C/min); Flammenionisationsdetektor (FID).

rückzuresorbieren als andere Stoffe. Die Filter, die zur Ultrafiltration des Blutes an Urämie erkrankter Patienten verwendet werden, haben diese Fähigkeit jedoch nicht. Demzufolge wird Urämieläden ein viel höherer Prozentsatz an essentiellen Aminosäuren entzogen als Gesunde im Harn ausscheiden. Untersuchungen der Aminosäureprofile zeigen z. B. einen zehnfach höheren Verlust an Methionin, bei Prolin beträgt er gar das 100fache^[137b].

11. Peptide

Dipeptide können wie Aminosäuren als trifluoracetylierte Butylester gaschromatographisch getrennt werden. In kleiner Menge sind solche Dipeptide im Harn gesunder enthalten^[143]. An Hautkrankheiten Leidende scheiden im Harn relativ große Mengen an prolinhaltigen Dipeptiden aus^[144].

Als die Strukturbestimmung von Oligopeptiden wegen ihrer geringen Flüchtigkeit und hohen Masse massenspektrometrisch noch nicht gelang, hat man Oligopeptide enzymatisch mit Dipeptidylamino-Peptidasen gespalten, anschließend das Gemisch der Dipeptide nach Derivatisierung gaschromatographisch getrennt und die einzelnen Dipeptide massenspektrometrisch charakterisiert^[145]. Die Hauptschwierigkeit bei allen diesen Untersuchungen bereitete die große Zahl von Dipeptiden (um 400), die entstehen können und deren Verhalten im Gaschromatographen und Massenspektrometer man für eine Identifizierung kennen sollte. Viele Dipeptidgemische lassen sich überdies an gepackten Säulen kaum trennen^[145d]. Trotzdem wurde das Verfahren schließlich mit Erfolg zur Untersuchung des *N*-Terminus von Spinat-Plastocyanin eingesetzt^[146].

Die Sequenzbestimmungen von Peptiden mit GC/MS ist nach einem überwiegend von der Arbeitsgruppe Bie-

mann entwickelten Verfahren durchführbar: Die Peptide werden mit spezifisch auf bestimmte Peptidbindungen einwirkenden Peptidasen oder durch unspezifische chemische Hydrolyse in kleine Peptide gespalten. Das Gemisch wird dann verestert, acyliert und mit LiAlH₄ (LiAlD₄) oder B₂H₆ (B₂D₆) reduziert. Die so gebildeten Aminoalkohole werden trimethylsilyliert und gaschromatographisch getrennt. Aus den charakteristischen Massenspektren der erhaltenen derivatisierten Aminoalkohole kann auf die Struktur der Hydrolysatpeptide und davon wieder auf die der ursprünglichen Peptide geschlossen werden^[147].

Da dieses Verfahren zunächst relativ viel Material erforderte, war es nur in Sonderfällen gegenüber der herkömmlichen Sequenzbestimmung konkurrenzfähig^[148]. Die zahlreichen Schritte zur Herstellung der derivatisierten Aminoalkohole lassen sich einschränken, wenn man das Gemisch des veresterten Partialpeptidhydrolysats methyliert^[149]. Allerdings kann es dabei auch zur C-Methylierung kommen^[150], so daß komplexe Gemische entstehen. Die Methode kann daher nur klassische Abbauverfahren ergänzen^[151].

In den letzten Jahren gewannen „sanfte“ Ionisierungsmethoden, vor allem die „fast atom bombardment“ (FAB)-^[152] und die Felddesorptions-Methode^[153], bei der massenspektrometrischen Untersuchung von Oligo- und Polypeptiden immer mehr an Gewicht. Bei FAB-MS-Untersuchungen wird ein Edelgas ionisiert, und die ionisierten Atome werden beschleunigt. Beim Passieren einer Zone mit unversehrten Gasmolekülen übertragen sie auf diese ihre Ladung, nicht aber ihre kinetische Energie. Der Atomstrahl trifft nun auf eine Lösung des underivatisierten Peptides in Glycerin. Getroffene Peptid- und Solvensmoleküle werden herausgeschleudert und ionisiert. Man erhält so überwiegend protonierte Molekül-Ionen. Die Methode eignet sich daher vor allem zur Molekulargewichtsermittlung auch großer Moleküle; z.B. wurden auch von Insulin^[154] ($M_r \approx 6000$) sowohl Bruchstücke^[155a,b] als auch Molekül-Ionen erhalten.

Bei Modellpeptiden wurde versucht, die Sequenz aus auftretenden Bruchstücken abzuleiten. Im Prinzip wurden dabei aus den vorhandenen Fragmenten diejenigen herausgesucht, deren Bildung mit der vorgegebenen Struktur erkläbar war. Da zusätzliche Ionen (teilweise durch Umsetzen des Peptides mit Matrixmolekülen entstanden) und fehlende Ionen das Fragmentierungsbild verwirren, ist eine vollständige Sequenzableitung unbekannter freier Peptide ohne zusätzliche Informationen kaum möglich.

Die Neigung zur Bruchstückbildung kann jedoch durch Einführung eines elektronenreichen Systems in das Peptid stark erhöht werden, wie der Vergleich der in Abbildung 9 und 10 dargestellten FAB-Massenspektren zeigt. Besonders günstig wirkt sich bei kleinen Peptiden (bis zu zehn Aminosäuren) die Einführung eines bromhaltigen Arens aus, weil durch die Gegenwart der nahezu gleich häufigen Bromisotope ⁷⁹Br und ⁸¹Br in den Spaltstücken eine Markierung gegeben ist, die strukturspezifische Bruchstücke als Doppelpeaks leicht erkennen läßt^[155c] (Schema 21).

Eine Verbesserung der Spektreninterpretation ist auch durch die Ermittlung der Abbauwege mit Hilfe der „linked scan technique“ möglich^[156]. Hierbei werden nach der primären Ionenerzeugung zu untersuchende Ionen bestimmter Masse durch das elektrische Feld des Massenspekto-

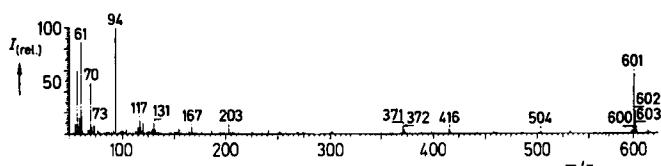


Abb. 9. FAB-Massenspektrum positiver Ionen des Hexapeptides Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro in Glycerinmatrix; m/z 601 (M^+).

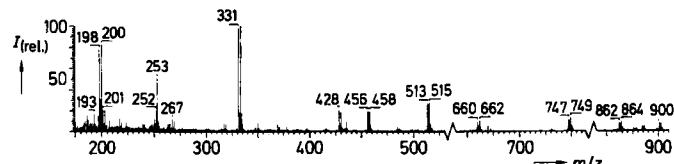
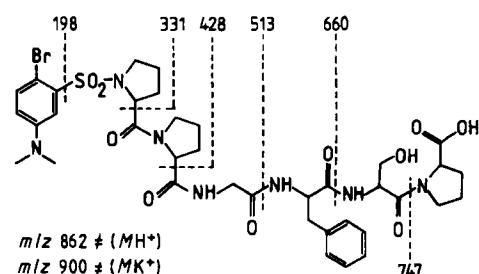


Abb. 10. FAB-Massenspektrum positiver Ionen des mit 2-Brom-5-(N,N-dimethylamino)benzolsulfonsäurechlorid derivatisierten Hexapeptides Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro.



Schema 21. Entstehung der Ionen des in Abbildung 10 dargestellten FAB-Massenspektrums des derivatisierten Hexapeptides Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro; die angegebenen Massen sind auf ⁷⁹Br bezogen.

meters von den übrigen Ionen getrennt und durch Reaktion mit einem zugesetzten Hilfsgas angeregt. Durch Variieren („scannen“) des magnetischen Feldes können nun die Massen von Sekundärbruchstücken der ausgewählten Primäriionen bestimmt und die Fragmentierungsmechanismen untersucht werden, so daß man z. B. von einem Peptid die Bruchstückfolge und damit die Sequenz erkennen kann.

Das Auflösungsvermögen der Geräte und die notwendige Massenbestimmung setzen der FAB-MS-Methode bei großen Peptiden eine Grenze. Zur Untersuchung dieser Peptide scheint sich ein kürzlich von Biemann et al. entwickeltes Verfahren zu eignen, bei dem die Sequenzierung von Nucleinsäuren und Peptiden miteinander verknüpft wird. Ein durch Trypsin teilverdautes Peptidgemisch wird mittels FAB-MS untersucht. Die gut erhältlichen Molekül-Ionen der im Gemisch enthaltenen Peptide müssen jenen Molekulargewichten entsprechen, die man aus einer DNA-Sequenzierung vorhersehen kann. Ergeben sich keine Differenzen, so ist damit die DNA-Sequenzierung bestätigt. Im anderen Falle können so entstandene Fehler gesucht und korrigiert werden. Diesem kombinierten Verfahren dürfte die Zukunft gehören^[157].

12. Schlußbemerkung

Offensichtlich wird der Stoffwechsel einem Individuum von Geburt an aufgeprägt. Zwischen Individuen bestehen aber große Unterschiede, die vielleicht auf unentdeckten,

harmlosen genetischen Defekten beruhen. Solche Defekte können aber dann Bedeutung erlangen, wenn durch eine Krankheit medikamentöse Behandlung nötig wird und die Wirkstoffe dann auch individuell metabolisiert werden, wie dies bereits gezeigt wurde^[158].

Gelänge es, solche Defekte bei Kleinkindern frühzeitig zu erkennen und eine Stoffwechselkarte des Individuums zu erstellen, könnte man vielleicht auf diese Weise eine individuelle medikamentöse Behandlung im Krankheitsfalle und gegebenenfalls vorbeugende Maßnahmen gegen Ernährungsschäden in die Wege leiten.

Die aufwendige Kombination GC/MS ist hierzu wahrscheinlich gar nicht nötig, denn hätte man einmal die für bestimmte verborgene Defekte typischen Schlüsselverbindungen entdeckt, könnte man zu ihrer Bestimmung Radioimmunoassays ausarbeiten. Dies ist allerdings Zukunftsmusik.

Die Frage, ob solche Untersuchungen wenigstens teilweise realisiert werden können, hängt im wesentlichen davon ab, ob Organiker der Erforschung biologischen Materials und von Stoffwechselvorgängen in Zukunft mehr Bedeutung einräumen als in der Vergangenheit. Dazu sind die jungen Chemiker aufgerufen.

Die hier erwähnten Ergebnisse eigener Untersuchungen beruhen auf dem Einsatz, dem Geschick und auch den geistigen Beiträgen meiner Mitarbeiter. Ihnen möchte ich an dieser Stelle für ihre Ausdauer im Ertragen von Rückschlägen und ihren Mut, den vorgezeichneten Weg zu gehen, herzlich danken. Es sind dies S. Bauer, H.-J. Egger, M. Ende, A. Grupe, A. Heindl, C. Hözel, H. Ludwig-Köhn, M. Neupert, P. Pfeifer, J. Pförtner, O. Rau, J. Reiner, D. Renner, K. Schneider, M. Spitteler, Jr. und B. Zielińska. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Firma Schering danke ich für Sachbeihilfen.

Eingegangen am 23. Juli 1984,
ergänzt am 22. Februar 1985 [A 537]

- [1] a) R. G. Ademan, *J. Gas Chromatogr.* 2 (1964) 173; b) R. Kaiser: *Chromatographie in der Gasphase*, Bd. III, Hochschultaschenbücher, Mannheim 1965, S. 116.
- [2] D. E. Games, *Biomed. Mass Spectrom.* 8 (1981) 454.
- [3] a) E. C. Horning, M. G. Horning, *J. Chromatogr. Sci.* 9 (1971) 129; b) *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 17 (1971) 802.
- [4] R. Roper, T. S. Ma, *Microchem. J.* 1 (1957) 245; b) H. Schlenk, J. L. Gellermann, *Anal. Chem.* 32 (1960) 1412.
- [5] a) Z. Horii, M. Makita, Y. Tamura, *Chem. Ind.* 34 (1965) 1494; b) O. A. Mamer, B. F. Gibbs, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 19 (1973) 1006.
- [6] D. N. Buchanan, F. Bonasso, J. G. Thoene, *J. Chromatogr.* 278 (1983) 133.
- [7] L. Sweetman, W. L. Nyhan, D. A. Trauner, A. Merritt, M. Sengh, *J. Pediatr.* 96 (1980) 1020.
- [8] a) J. S. Whitehead, Y. S. Kim, R. Prizont, *Clin. Chim. Acta* 72 (1976) 315; b) B. McArthur, A. P. Sarnaik, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 28 (1982) 1983.
- [9] A. Zlatkis, F. Andrawes, *J. Chromatogr.* 112 (1975) 533.
- [10] J. R. Politzer, B. J. Dowty, J. L. Laseter, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 22 (1976) 1175.
- [11] A. B. Roy, *Biochem. J.* 62 (1956) 41.
- [12] R. A. Chalmers, *Methodol. Dev. Biochem.* 5 (1976) 135.
- [13] D. Issachar, J. F. Holland, C. C. Sweeley, *Anal. Chem.* 54 (1982) 29.
- [14] H. Thoma, J. Reiner, G. Spitteler, *J. Chromatogr.* 309 (1984) 17.
- [15] A. Heindl, Dissertation, Universität Bayreuth 1985.
- [16] U. V. Auwers, E. Cauer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 470 (1929) 284.
- [17] S. Bauer, M. Neupert, G. Spitteler, *J. Chromatogr.* 309 (1984) 243.
- [18] a) U. Langenbeck, H. U. Möhrung, B. Hinney, M. Spitteler, *Biomed. Mass Spectrom.* 4 (1977) 197; b) F. Rocchiccioli, J. P. Leroux, P. Carterier, *ibid.* 8 (1981) 160.
- [19] H. Nau, K. Biemann, *Anal. Chem.* 40 (1968) 1217.

- [20] a) S. P. Markey, W. G. Urban, S. P. Levine: *Mass Spectra of Biological Interest*, National Technical Information Service, Springfield, VA 1975; b) *Eight Peak Index of Mass Spectra*, Mass Spectrometry Data Centre, Aldermaston, 1974; c) E. Stenhammar, S. Abrahamsson in F. N. McLafferty: *Register of Mass Spectral Data*, Wiley, New York 1974.
- [21] H. Nau, K. Biemann, *Anal. Chem.* 46 (1974) 426.
- [22] K. Jacob, W. Vogt, M. Knedel, G. Schwertfeger, *J. Chromatogr.* 146 (1976) 221.
- [23] a) M. Spitteler, G. Spitteler, G.-A. Hoyer, *Chem. Ber.* 113 (1980) 699; b) A. Grupe, G. Spitteler, *J. Chromatogr.* 226 (1981) 301.
- [24] C. Hözel, G. Spitteler, *Liebigs Ann. Chem.* 1984, 1319.
- [25] S. Lindstedt, K. Norberg, G. Steen, E. Wahl, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 22 (1976) 1330.
- [26] H. R. Buser, H. Auer, P. Guerin, S. Rauscher, *Anal. Chem.* 55 (1983) 818.
- [27] M. Ende, G. Spitteler, *Mass Spectrom. Rev.* 1 (1982) 29.
- [28] S. Bergström, F. Dressler, R. Ryhage, B. Samuelsson, J. Sjövall, *Ark. Kemi* 19 (1962) 563.
- [29] S. Lindstedt, G. Steen, *Clin. Chim. Acta* 53 (1974) 143.
- [30] S. Lindstedt, G. Steen, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 21 (1975) 1964.
- [31] T. Niwa, K. Maeda, T. Ohki, A. Saito, I. Tsuchiada, *J. Chromatogr.* 225 (1981) 1.
- [32] T. H. Bindel, P. V. Fennessey, B. S. Miles, S. I. Goodman, *Clin. Chim. Acta* 66 (1976) 209.
- [33] J. Pförtner, G. Spitteler, *Angew. Chem.* 91 (1979) 328; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18 (1979) 305.
- [34] O. Rau, W. Kern, G. Spitteler, *Liebigs Ann. Chem.* 1984, 1504.
- [35] O. Rau, G. Spitteler, R. Bröcker, *Liebigs Ann. Chem.* 1984, 1513.
- [36] D. M. Sand, H. Schlenk, H. Thoma, G. Spitteler, *Biochim. Biophys. Acta* 751 (1983) 455.
- [37] J. Schmidt, G. Spitteler, unveröffentlicht.
- [38] F. J. Schäfers, K. Herrmann, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 175 (1982) 117.
- [39] a) R. A. Chalmers, M. J. R. Healy, A. M. Lawson, J. T. Hart, R. W. E. Watts, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 22 (1976) 1292; b) D. S. Yong, *ibid.* 16 (1970) 681; c) L. Björkman, C. McLean, G. Steen, *ibid.* 22 (1976) 49.
- [40] J. Nordmann, R. Nordmann, *Adv. Clin. Chem.* 4 (1961) 53.
- [41] a) S. K. Wadman, D. Ketting, P. A. Voute, *Clin. Chim. Acta* 72 (1976) 49; b) F. A. J. Muskiet, D. C. Fremouw-Ottevangers, B. G. Wolthers, A. de Vries, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 23 (1977) 863; c) I. E. Pettersen, E. Jellum, *Clin. Chim. Acta* 41 (1972) 199.
- [42] A. M. Lawson, R. A. Chalmers, R. W. E. Watts, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 22 (1976) 1283.
- [43] E. Jellum, P. Helland, E. Eldjarn, V. Markwardt, I. Marhöfer, *J. Chromatogr.* 112 (1979) 573.
- [44] P. Dietel, Diplomarbeit, Universität Bayreuth 1985.
- [45] A. E. Garrod, *Lancet* 2 (1908) 73, 142, 214.
- [46] J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein, M. S. Brown: *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, 5. Aufl., McGraw-Hill, New York 1983, S. 10.
- [47] W. Lehnert, *Monatsschr. Kinderheilk.* 127 (1979) 665.
- [48] K. Tanaka, A. West-Dull, D. G. Hine, T. B. Lynn, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 26 (1980) 1847.
- [49] W. Lehnert, H. Niederhoff, *Eur. J. Pediatr.* 136 (1981) 281.
- [50] E. Klenk, W. Kahlke, *Z. Physiol. Chem.* 333 (1963) 133.
- [51] K. Tanaka, M. A. Budd, M. L. Efron, K. J. Isselbacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56 (1966) 236.
- [52] a) T. Ando, W. L. Nyhan, C. Bachmann, K. Rasmussen, R. Scott, E. K. Smith, *J. Pediatr.* 82 (1973) 243; b) R. J. W. Truscott, D. Malegan, E. McCairns, D. Burke, L. Hick, K. Tanaka, L. Sweetman, W. L. Nyhan, J. Hammond, C. Bumack, D. M. Danks, *Clin. Chim. Acta* 110 (1981) 187; c) W. Lehnert, *ibid.* 134 (1983) 207.
- [53] a) E. Jellum, T. Kluge, H. C. Börresen, O. Stokke, L. Eldjarn, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 26 (1970) 327; b) O. Stokke, L. Eldjarn, K. R. Norum, J. Steen-Johnsen, S. Halvorsen, *ibid.* 20 (1967) 313; c) O. Stokke, L. Eldjarn, E. Jellum, H. Pande, P. E. Waaler, *Pediatrics* 49 (1972) 726.
- [54] V. G. Oberholzer, B. Levin, E. A. Burgess, W. F. Young, *Arch. Dis. Child.* 42 (1967) 492.
- [55] A. Niederwieser, A. Matasovic, B. Steinmann, K. Baerlocher, B. Kempken, *Pediatr. Res.* 10 (1976) 215.
- [56] F. A. Hommes, J. R. G. Kuipers, J. D. Elema, J. F. Jansen, J. H. P. Jonxis, *Pediatr. Res.* 2 (1968) 519.
- [57] S. I. Goodman, S. P. Markey, P. G. Moe, B. S. Miles, C. C. Teng, *Biochem. Med.* 12 (1975) 12.
- [58] a) H. Przyrembel, W. Wendel, K. Becker, H. J. Bremer, L. Bruunvis, D. Ketting, S. K. Wadman, *Clin. Chim. Acta* 66 (1976) 227; b) L. Sweetman, W. L. Nyhan, D. A. Tranner, T. A. Merritt, M. Singh, *J. Pediatr.* 96 (1980) 1020.
- [59] a) J. Rasmussen, T. Ando, W. L. Nyhan, D. Hull, D. Cottom, G. Donnell, W. Waddington, A. W. Kilroy, *Clin. Sci.* 42 (1972) 665; b) M. Duran, D. Gompertz, L. Bruunvis, D. Ketting, S. K. Wadman, *Clin. Chim. Acta* 82 (1978) 93; c) I. Matsumoto, T. Shinka, T. Kuhara, T. Oura, H.

- Yamamoto, Y. Hase, H. Aoki, G. Isshiki, K. Tada in A. Frigerio: *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*, Vol. I, Plenum Press, New York 1978, S. 203; d) L. Sweetman, W. Weyer, W. L. Nyhan, C. de Cespedes, A. R. Loria, Y. Estrada, *Biomed. Mass Spectrom.* 5 (1978) 198; e) W. Lehnert, A. Junker, H. Wehniger, H. G. Zöberlein, R. Baumgartner, H.-H. Ropers, *Monaisschr. Kinderheilk.* 128 (1980) 720.
- [60] A. Niederwieser, S. K. Wadman, D. M. Dauks, *Clin. Chim. Acta* 90 (1978) 195.
- [61] a) U. Langenbeck, M. Wendel, A. Mench-Hoinowski, D. Kuschel, K. Becker, H. Przyrembel, H. J. Bremer, *Clin. Chim. Acta* 88 (1978) 283; b) C. Jacobs, E. Salem, J. E. K. Halversen, E. Jellum, *J. Chromatogr.* 143 (1977) 31; c) L. Sweetman, S. P. Bates, D. Hull, W. L. N. Nyhan, *Pediatr. Res.* 11 (1977) 1144; d) B. H. Robinson, W. G. Sherwood, M. Lamptey, J. A. Lowden, *ibid.* 10 (1976) 371; e) M. Duran, R. B. H. Schutgens, A. Ketel, H. Heymans, M. W. J. Berntssen, D. Ketting, S. K. Wadman, *J. Pediatr.* 95 (1979) 1004; f) S. J. Wysocki, S. P. Wilkinson, R. Hähnel, C. Y. B. Wong, P. K. Panegyres, *Clin. Chim. Acta* 70 (1976) 399.
- [62] R. A. Chalmers, A. M. Lawson: *Organic Acids in Man*, Chapman and Hall, London 1982, S. 211.
- [63] T. Kuhara, Y. Inoue, T. Shinka, I. Matsumoto, M. Matsuo, *Biomed. Mass Spectrom.* 10 (1983) 629.
- [64] M. Spiteller, G. Spiteller, *J. Chromatogr.* 164 (1979) 319.
- [65] H. M. Liebich, G. Huesgen, A. Pickert, U. Stierle, J. Wöll, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 6 (1983) 507.
- [66] a) R. Bonnichsen, R. Hjähn, Y. Marde, M. Möller, R. Ryhage, *Z. Rechtsmed.* 73 (1973) 225; b) M. Ende, G. Spiteller, G. Remberg, R. Heipertz, *Arzneim. Forsch.* 29 (1979) I655.
- [67] A. Gruppe, G. Spiteller, *J. Chromatogr.* 230 (1982) 335.
- [68] M. E. Ward, I. R. Politzer, J. L. Laseter, S. Q. Alam, *Biomed. Mass Spectrom.* 3 (1976) 77.
- [69] a) B. Alme, A. Bremmelgaard, J. Sjövall, P. Thomassen, *J. Lipid Res.* 18 (1977) 339; b) M. Tetsuo, M. Axelsson, J. Sjövall, *J. Steroid Biochem.* 13 (1980) 847; c) A. Dyfverman, J. Sjövall, *Anal. Biochem.* 134 (1983) 303; d) M. Axelsson, C. E. Graham, J. Sjövall, *Endocrinologia (Bucharest)* 114 (2) (1984) 337.
- [70] D. Gupta, G. Breitmaier, W. Voelter, G. Jung, E. Breitmaier, W. König, *Nature London New Biol.* 235 (1972).
- [71] H. L. Bradlow, *Steroids* 11 (1968) 265.
- [72] J. Sjövall, M. Axelsson, *J. Steroid Biochem.* 11 (1979) 129.
- [73] a) Z. Tomsova, I. Gregorova, *Cas. Lek. Cesk.* 122 (5) (1983) 147; b) J. W. Honour, J. Kent, C. H. L. Shackleton, *Clin. Chim. Acta* 129 (1983) 229.
- [74] a) E. Vanluchene, D. Vandekerckhove, J. Jonckheere, A. DeLeenheer, *J. Chromatogr.* 279 (1983) 573; b) L. C. Ramirez, C. Millot, B. F. Mau-mé, *ibid.* 229 (1982) 267.
- [75] W. J. A. Vandenhove, C. C. Sweeley, E. C. Horning, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3 (1960) 33.
- [76] a) T. Luukkainen, W. J. A. Vandenhove, E. O. A. Hahti, E. C. Horning, *Biochem. Biophys. Acta* 52 (1961) 599; b) H. Miyazaki, M. Ishibashi, M. Itoh, T. Nambara, *Biomed. Mass Spectrom.* 4 (1977) 23.
- [77] M. Spiteller-Friedman, G. Spiteller, *J. Org. Mass Spectrom.* 2 (1969) 901.
- [78] a) W. L. Gardiner, E. C. Horning, *Biochem. Biophys. Acta* 115 (1966) 524; b) J. P. Thenot, E. C. Horning, *Anal. Lett.* 5 (1972) 21.
- [79] a) M. Donike, J. Zimmermann, *J. Chromatogr.* 202 (1980) 483; b) C. A. Bruynes, T. K. Jurriens, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 3966; c) E. M. Chambaz, G. Defaye, C. Madani, *Anal. Chem.* 45 (1973) 1090.
- [80] J. A. Völlmin, H. C. Curtius, Z. *Klin. Chem. Klin. Biochem.* 9 (1971) 43.
- [81] J. J. Vrbanac, W. E. Braselton, Jr., J. F. Holland, C. C. Sweeley, *J. Chromatogr.* 239 (1982) 265.
- [82] C. H. L. Shackleton, J. A. Gustafsson, F. L. Mitchell, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 74 (1973) 157.
- [83] C. D. Pfaffenberger, E. C. Horning, *Anal. Biochem.* 80 (1977) 329.
- [84] P. Pfeifer, G. Spiteller, *J. Chromatogr.* 223 (1981) 21.
- [85] C. D. Pfaffenberger, E. C. Horning, *J. Chromatogr.* 112 (1975) 581.
- [86] O. Jänne, *J. Steroid Biochem.* 2 (1971) 33.
- [87] R. J. Begue, M. Moriniere, P. Padieu, *J. Steroid Biochem.* 9 (1978) 779.
- [88] C. H. L. Shackleton, F. L. Mitchell, *Steroids* 10 (1967) 359.
- [89] a) M. G. Horning, E. C. Chambaz, C. J. Brooks, A. M. Moss, E. A. Boucher, E. C. Horning, R. M. Hill, *Anal. Biochem.* 31 (1969) 512; b) C. H. L. Shackleton, N. F. Taylor, *J. Steroid Biochem.* 6 (1975) 1393; c) C. H. L. Shackleton, J. W. Honour, *Clin. Chim. Acta* 69 (1976) 267; d) C. H. L. Shackleton, J. W. Honour, N. F. Taylor, *J. Steroid Biochem.* 11 (1979) 523.
- [90] F. C. Bartter, C. S. Delea, F. Halberg, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 98 (1962) 969.
- [91] a) R. Ulrich, A. Yuwiler, E. Geller, *Neuroendocrinology* 21 (1) (1976) 49; b) H. Ludwig, M. Spiteller, H.-J. Egger, G. Spiteller, *Jsr. J. Chem.* 16 (1977) 7.
- [92] H. J. Egger, J. Reiner, G. Spiteller, *J. Chromatogr.* 145 (1978) 359.
- [93] A. M. Cerone-McLernon, J. Winter, E. H. Mosbach, V. D. Bokkenheuser, *Biochim. Biophys. Acta* 666 (1981) 341.
- [94] a) B. E. Gustafsson, J. A. Gustafsson, J. Sjövall, *Eur. J. Biochem.* 4 (1968) 568; b) H. Eriksson, J. A. Gustafsson, J. Sjövall, *ibid.* 6 (1968) 219; c) J. A. Gustafsson, *Ark. Kemi* 29 (1968) 535.
- [95] J. A. Gustafsson, J. Sjövall, *Eur. J. Biochem.* 6 (1968) 236.
- [96] T. Cronholm, H. Eriksson, J. A. Gustafsson, *Steroids* 19 (1972) 455.
- [97] H. Eriksson, *Eur. J. Biochem.* 46 (1974) 603.
- [98] a) T. Watabe, M. Kanai, M. Isobe, N. Ozawa, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 2900; b) J. A. Gustafsson, *Biochem. Biophys. Acta* 296 (1973) 179.
- [99] a) R. F. Hanson, G. Williams, *Biochem. J.* 121 (1971) 863; b) P. Eneroth, K. Hellström, J. Sjövall, *Acta Chem. Scand.* 22 (1968) 1729; c) S. M. Grundy, E. H. Ahrens, Jr., T. A. J. Miettinen, *J. Lipid Res.* 6 (1965) 397; d) G. A. DeWeerd, R. Beke, H. Verdievel, F. Barbier, *Biomed. Mass Spectrom.* 7 (1980) 515.
- [100] T. Laatikainen, *Steroids* 15 (1970) 139.
- [101] N. F. Taylor, C. H. L. Shackleton, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49 (1979) 78.
- [102] O. Jänne, J. Perheentupa, R. Viiko, *J. Clin. Endocrinol.* 31 (1970) 162.
- [103] C. H. L. Shackleton, P. G. F. Swift, D. C. L. Savage, J. W. Honour, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49 (1979) 247.
- [104] a) J. A. Luyten, G. A. F. M. Rutten, *J. Chromatogr.* 91 (1974) 393; b) J. Viinikka, O. Jänne, J. Perheentupa, R. Viiko, *Clin. Chim. Acta* 48 (1973) 359.
- [105] C. H. L. Shackleton, J. W. Honour, *J. Steroid Biochem.* 8 (1977) 199.
- [106] J. W. Honour, J. Tourniaire, E. G. Bigliere, C. H. L. Shackleton, *J. Steroid Biochem.* 9 (1978) 495.
- [107] C. H. L. Shackleton, N. F. Taylor, J. W. Honour: *An atlas of gas chromatographic profiles of neutral urinary steroids in health and disease*, Packard-Becker, Delft 1980.
- [108] H. Ludwig, G. Spiteller, D. Matthaei, F. Scheler, *J. Chromatogr.* 146 (1978) 381.
- [109] A. C. Dey, I. R. Sencall, *Biochem. Med.* 12 (1975) 213.
- [110] M. Alasdario, D. Wiesler, G. Rhodes, M. Novotny, *Clin. Chim. Acta* 126 (1982) 243.
- [111] a) G. Karlaganis, B. Alme, V. Karlaganis, J. Sjövall, *J. Steroid Biochem.* 14 (1981) 341; b) H. Ludwig-Köhne, H. V. Henning, A. Sziedat, D. Matthaei, G. Spiteller, *Eur. J. Clin. Invest.* 13 (1983) 91; c) H. Ludwig-Köhne, A. Sziedat, D. Matthaei, H. V. Henning, *Clin. Chim. Acta* 121 (1982) 189.
- [112] a) H. Ludwig-Köhne, F. Messing, G. Spiteller, *J. Chromatogr.* 162 (1979) 573; b) H. Holzmann, P. Benes, B. Morsches, *Hautarzt* 31 (1980) 71.
- [113] C. Hölzle, Dissertation, Universität Bayreuth 1984.
- [114] a) P. Altmeier, N. Buhles, C. Hölzle, G. Spiteller, L. Stöhr, H. Holzmann, unveröffentlicht; b) C. Pflugshaupt, *Zentralbl. Haut Geschlechtskr.* 148 (1983) 1229.
- [115] a) H. J. Stan, B. Abraham, *J. Chromatogr.* 195 (1980) 231; b) L. G. M. T. Tuinstra, W. A. Traag, H. J. Keukens, R. J. VanMazijk, *ibid.* 279 (1983) 533.
- [116] R. Knuppen, O. Haupt, W. Schramm, H. O. Hoppen, *J. Steroid Biochem.* 11 (1979) 153.
- [117] a) S. J. Gaskell, D. S. Millington, *Biomed. Mass Spectrom.* 5 (1978) 557; b) S. J. Gaskell, R. W. Finney, M. E. Harper, *ibid.* 6 (1979) 113.
- [118] a) J. Jänne, H. Pöösä, A. Raina, *Biochem. Biophys. Acta* 473 (1978) 241; b) D. H. Russel, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 23 (1977) 22.
- [119] T. Ohki, A. Saito, N. Yamanaoka, K. Ohta, S. Sakakibara, T. G. Niwa, K. Maeda, *J. Chromatogr.* 228 (1982) 51.
- [120] F. A. J. Muskiet, C. M. Stratingh, D. C. Fremouw-Ottevangers, R. Hague, *J. Chromatogr.* 230 (1982) 142.
- [121] R. Aigner-Held, G. D. Daves, Jr., *Physiol. Chem. Phys.* 12 (1980) 389.
- [122] a) S. K. Wadman, D. Ketting, P. A. Voute, *Clin. Chim. Acta* 72 (1976) 49; b) F. A. J. Muskiet, D. C. Fremouw-Ottevangers, B. G. Wothers, J. A. de Vries, *Clin. Chem. Winston Salem N. C.* 23 (1971) 863; c) E. B. M. DeJong, B. P. M. Horsten, H. M. J. Goldschmidt, *J. Chromatogr.* 279 (1983) 563.
- [123] D. F. Le Gatt, G. B. Baker, R. T. Coutts, *J. Chromatogr.* 225 (1981) 301.
- [124] J. D. Ehrhardt, J. Schwartz, *Clin. Chim. Acta* 88 (1978) 71.
- [125] a) S. A. Pleece, P. H. Refern, C. M. Riley, E. Tomlinson, *Analyst (London)* 107 (1982) 755; b) R. B. Taylor, R. Reid, K. E. Kendle, C. Geddes, P. F. Crurle, *J. Chromatogr.* 277 (1982) 101; c) K. Koike, T. Aono, F. Chatani, T. Takemura, K. Kurachi, *Life Sci.* 30 (1982) 2221; d) L. Semedjan-Rouquier, L. Bossi, B. Scatton, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 663.
- [126] T. Kuster, A. Niederwieser, *J. Chromatogr.* 278 (1983) 245.
- [127] a) H. P. J. Bennett, A. M. Hudson, C. McMartin, G. E. Purdon, *Biochem. J.* 168 (1977) 9; b) P. Böhnen, F. Castillo, N. Ling, P. Guillemin, *Int. J. Pept. Protein Res.* 16 (1980) 306.
- [128] J. A. W. Johnstone, T. J. Poval, J. D. Baty, J. L. Dausset, C. Charpentier, A. Lemmonier, *Clin. Chim. Acta* 52 (1974) 127.
- [129] H. D. Jakubke, H. Jescheit: *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim 1982, S. 72.
- [130] a) K. R. Leimer, R. H. Rice, C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.* 141 (1977) 121; b) F. Kaiser, C. W. Gehrke, R. W. Zumwaldt, K. C. Kuo, *ibid.* 94 (1974) 113.
- [131] C. W. Gehrke, H. Takeda, *J. Chromatogr.* 70 (1973) 63.

- [132] W. Vetter in G. R. Waller: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York 1972.
- [133] R. F. Adams, *J. Chromatogr.* 95 (1974) 189.
- [134] R. F. McGregor, G. M. Brittin, M. S. Sharon, *Clin. Chim. Acta* 48 (1973) 65.
- [135] M. D. Armstrong, M. Robinow, *Pediatrics* 39 (1967) 546.
- [136] Y. Kakimoto, S. Akazawa, *J. Biol. Chem.* 21 (1970) 5751.
- [137] a) H. Jaeger, H. U. Kloer, H. Ditschuneit, H. Frank, *Chromatogr. Sci.* 1981, 331; b) M. Neupert, Dissertation, Universität Bayreuth 1984.
- [138] A. Hill, R. Casey, W. A. Zaleski, *Clin. Chim. Acta* 72 (1976) 1.
- [139] C. S. Scriver, T. L. Perry in J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3. Aufl., McGraw-Hill, New York 1972.
- [140] T. Gerritsen, J. G. Vaughn, H. A. Waisman, *Arch. Biochem. Biophys.* 100 (1963) 298.
- [141] L. S. Scriver, L. Rosenberg: *Amino Acid Metabolism and its Disorders*, Saunders, Philadelphia 1973.
- [142] J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein, M. S. Brown: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 5. Aufl., McGraw-Hill, New York 1983.
- [143] C. Hamilton, M. Lou, P. B. Hamilton, *Methods Biochem. Anal.* 25 (1979) 202.
- [144] a) R. W. Johnstone, T. J. Povall, J. D. Baty, J. L. Pousset, C. Charpentier, A. Lemonnier, *Clin. Chim. Acta* 52 (1974) 137; b) K. F. Faull, G. M. Schier, P. Schlesinger, B. Halgren, *ibid.* 70 (1976) 313.
- [145] a) R. W. Johnstone, T. J. Povall, J. H. Pousset, C. H. Charpentier, A. Lemonnier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63 (1974) 881; b) R. M. Caprioli, W. E. Seifert, *ibid.* 64 (1975) 295; c) W. Seifert, Jr., R. E. McKee, C. F. Becker, R. M. Caprioli, *Anal. Biochem.* 88 (1978) 149; d)
- G. M. Schier, P. D. Bolton, H. Halpern, *Biomed. Mass Spectrom.* 3 (1976) 32; e) H. Frank, K. D. Haegele, D. M. Desiderio, *Anal. Chem.* 49 (1977) 287.
- [146] W. E. Seifert, Jr., R. M. Caprioli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17 (1978) 436.
- [147] a) H. Nau, K. Biemann, *Anal. Biochem.* 73 (1976) 139; b) 154; c) W. A. Carr, W. C. Herlihy, K. Biemann, *Biomed. Mass Spectrom.* 8 (1981) 51.
- [148] W. Steiner, A. Niederwieser, *Clin. Chim. Acta* 92 (1979) 431.
- [149] a) H. R. Morris, *Nature London* 286 (1980) 447; b) K. Rose, M. G. Simon, E. Offort, *Biochem. J.* 215 (1983) 261.
- [150] T. J. Yu, B. L. Karger, P. Vourous, *Biomed. Mass Spectrom.* 10 (1983) 633.
- [151] A. Dell, H. R. Morris, *Biomed. Mass Spectrom.* 8 (1981) 128.
- [152] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedwick, A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981, 325.
- [153] M. Przybylski, *Z. Anal. Chem.* 316 (1983) 1.
- [154] B. Sundqvist, A. Hedin, P. Hakanson, I. Kamensky, J. Kjellberg, M. Salephour, G. Säwe, S. Widjaya Sekera, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 53 (1983) 167.
- [155] a) D. H. Williams, C. V. Bradley, S. Santikarn, G. Bojesen, *Biochem. J.* 201 (1982) 105; b) D. H. Williams, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 53 (1983) 37; c) D. Renner, G. Spiteller, unveröffentlicht.
- [156] I. Katakuse, D. M. Desiderio, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 54 (1983) 1.
- [157] B. W. Gibson, K. Biemann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 1956.
- [158] M. Eichelbaum, *Internist* 24 (1983) 117.

Wachstum und Auflösung organischer Kristalle in Gegenwart von Additiven – ein Beitrag zu Stereochemie und Materialwissenschaften

Von Lia Addadi*, Ziva Berkovitch-Yellin*, Isabelle Weissbuch, Jan van Mil, Linda J. W. Shimon, Meir Lahav* und Leslie Leiserowitz*

In memoriam Gerhard M. J. Schmidt

So verschiedene Gebiete wie die Stereochemie und die Materialwissenschaften profitieren von detaillierten Untersuchungen des Einflusses, den maßgeschneiderte Inhibitoren auf Wachstum und Auflösung organischer Kristalle ausüben. Bei organischen Kristallen, die in Gegenwart von wachstumshemmenden Additiven entstanden sind, besteht ein Zusammenhang zwischen der Kristallstruktur und der unter diesen Bedingungen erhaltenen Kristallmorphologie. Die Kenntnis dieser Beziehungen kann zur effektiven Trennung von Konglomeraten aus enantiomeren Verbindungen oder Kristallen, zur Herstellung von organischen Kristallen mit erwünschter Morphologie und zur direkten oder indirekten Bestimmung der absoluten Konfiguration chiraler Moleküle und Kristalle ausgenutzt werden. Weiterhin lässt sich aus diesen Befunden ein neues Modell für die spontane Entstehung der optischen Aktivität in der Natur ableiten. Analog bilden sich bei der Auflösung organischer Kristalle in Gegenwart dieser Additive auf ausgewählten Kristallflächen definierte Ätzfiguren. Der Einfluss von Lösungsmitteln auf das Kristallwachstum konnte bei einigen Modellsystemen durch Atom-Potential-Rechnungen simuliert werden.

1. Einleitung

Die Morphologie von Kristallen hat durch ihre Vielfalt und Schönheit schon im Altertum das Interesse der Naturforscher erweckt. Daß Kristalle aus kleinsten, nicht teilbaren Einheiten aufgebaut sind, wurde bereits von Kepler er-

wogen^[1]; diese Vorstellung hat eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Molekül-Theorie gespielt.

Die Beziehung zwischen der Morphologie eines Kristalls und der Symmetrie der Verbindung, die den Kristall bildet, wurde erstmals 1848 von Pasteur^[2] aufgezeigt. In seinem berühmten Experiment trennte er die beiden enantiomeren Natrium-ammonium-tartrate manuell aufgrund der Asymmetrie der Kristalle. Später hat sich gezeigt, daß die Morphologie eines Kristalls nicht nur von der Struktur der kristallisierenden Verbindung, sondern auch von den experimentellen Parametern bei der Kristallisation ab-

[*] Dr. L. Addadi, Dr. Z. Berkovitch-Yellin, I. Weissbuch, Dr. J. van Mil, L. J. W. Shimon, Prof. Dr. M. Lahav, Prof. Dr. L. Leiserowitz
Department of Structural Chemistry,
The Weizmann Institute of Science
Rehovot 76100 (Israel)