aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen muß dem Hämolyat TPN zur Analyse hinzugefügt werden.

ROBINSON (21) beschrieb kürzlich zur Erfassung von galaktosämischen Zuständen ein spezifischeres Verfahren. Dieses besteht aus einer Kombination von Papierchromatographie und Flüssigkeits-Szintillationszählung. Betr. der Einzelheiten über das Prinzip dieser Technik sei auf die Originalarbeit verwiesen.

Die von WEINBERG angegebene Methode ist sehr einfach und schnell durchzuführen, ist zuverlässig und benötigt keine teuren Reagenzien. Ein Nachteil der Isotopentechnik ist die kostspielige Apparatur zur Messung der Radioaktivität. Da diese aber weithin verfügbar ist, dürfte die von WEINBERG angegebene Technik die Methode der Wahl sein, insbesondere wenn es auf eine erste und rasche Diagnosenstellung ankommt, um die Therapie einzuleiten. Will man aber sicherstellen, daß wirklich die Blockierung der Galaktose-Glukose-Umwandlung auf einer verminderten Aktivität des Uridyl-

transferase-Systems beruht, greift man besser auf die KALCKAR-Technik in der von „Sigma“ angegebenen Modifikation zurück. Der Nachteil der KALCKAR-Methode ist ihre relative Kompliziertheit, so daß sie nur von in Enzymbestimmungen erfahrenen Laboratorien durchgeführt werden sollte. Sie ist unter keinen Umständen ein Verfahren, das man nur gelegentlich anwenden dürfte, wie die von WEINBERG angegebene Isotopen-Technik.

Anmerkung bei der Korrektur

Während der Drucklegung kam eine 1964 beschriebene Methode [E. BEUTLER, M. BALLUDA und G. N. DONNELL: J. Lab. Clin. Med. 64, 694 (1964)] zur Erfassung von Galaktosämikern und deren Heterozygoten zur Kenntnis des Autors. Diese Technik wurde von HsIA überprüft und beruht auf Umwandlung der Galaktose-1-P zu Glukose-6-P durch Galaktose-1-P Uridyltransferase und Phosphoglukomutase im Bluthämolyat. Glukose-6-P wird anschließend durch die im Blut vorhandene Dehydrogenase oxydiert, wobei zugefügtes NADP zu NADPH reduziert wird. NADPH gibt den Wasserstoff an Methylenblau ab, das zur farblosen Form umgewandelt wird. Die Zeit, die für die Reduktion des Farbstoffes benötigt wird, ist ein Maß der Galaktose-1-P Uridyltransferase Aktivität. Die Autoren fanden für die von ihnen angegebenen Bedingungen die folgenden Werte für nichtanämische Personen: Normalpersonen: 28 ± 3 Min.; Heterozygoten: 48 ± 10 Min.; Galaktosämiker: > 3 Stdn.

Literatur

1. LELOIR, L. F., The metabolism of hexosephosphates, in phosphorus metabolism, S. 67. The John Hopkins Press, Baltimore (1951). — 2. LELOIR, L. F., Arch. Biochem. Biophysics 33, 186 (1951). — 3. KALCKAR, H. M., B. BRAGANCA und A. MUNCH-PETERSEN, Nature (London) 172, 1038 (1953). — 4. SEGAL, S., A. BLAIR und Y. TOPPER, Science (Washington) 136, 150 (1962). — 5. SEGAL, S., A. BLAIR und H. ROTH, Amer. J. Med. 38, 62 (1965). — 6. HANSEN, R. G., R. K. BRETHAUER, J. MAYES und J. H. NORDIN, Soc. exp. Biol. Med. 115, 560 (1964). — 7. DONNELL, G. N., W. R. BERGEN und R. S. CLELAND, Pediatr. Clin. N. America 7, 315 (1960). — 8. AVIGAD, G., D. AMARAL, C. ASENSIO und B. L. HORECKER, J. biol. Chemistry 237, 2736 (1962). — 9. FRINGS, C. S. und H. L. PARDUE, Analytic. Chem. 36, 2477 (1964). — 10. RAYMOND, A. L. und J. G. BLANCO, J. biol. Chemistry 79, 649 (1928). — 11. MERANZE, D. R., W. B. LIKOFF und G. SCHNEEBERG, Amer.

J. Clin. Path. 12, 261 (1942). — 12. FIESSINGER, N. und A. SCHRUMPF C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 109, 289 (1932). — 13. TYGSTROP, N., K. WINKLER, E. LUND und H. C. ENGELL, Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 6, 43 (1954). — 14. ANDERSON, E. P., H. M. KALCKAR, K. KURAHASHI und K. J. ISSELBACHER, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 50, 469 (1957). — 15. BRETHAUER, R. K., R. G. HANSEN, G. DONNELL und W. R. BERGEN, Proc. nat. Acad. Sci., USA 45, 328 (1959). — 16. NORDIN, J. H., R. K. BRETHAUER und R. C. HANSEN, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 6, 578 (1961). — 17. KIRKMAN, H. N. und E. BYNUM, Ann. human Genetics 23, 118 (1959). — 18. SCHWARZ, V., J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 56, 483 (1960). — 19. WEINBERG, A. N., Metabolism 10, 728 (1961). — 20. LONDON, M., J. MARYMOUNT jr. und J. FULD, Pediatrics 33, 421 (1964). — 21. ROBINSON, A., J. Exper. Med. 119, 359 (1963).

H.-D. Grüner, M. D.
410 West 10th Avenue, Columbus/Ohio, USA

Ionengehalt, Ionentransport und Membran-ATPase der Erythrocyten in Blutkonserven

Von H. GROBECKER und U. PIECHOWSKI

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Düsseldorf (Direktor: Professor Dr. med. K. Greeff)

(Eingegangen am 24. September 1965)

Der aktive Ionentransport gelagerter Erythrocyten ist in heparinisiertem oder defibriniertem Blut nach 11 Tagen, in Konserven mit ACD-Stabilisator erst nach 21 Tagen aufgehoben. — Die Aktivität der Transport-ATPase aus Erythrocytenmembranen bleibt selbst bei 90tägiger Lagerung des Stabilisatorblutes erhalten.

Der aktive Ionentransport gelagerter Erythrocyten läßt sich durch Einschleusen von ATP in das Zellinnere (partielle Hämolyse mit anschließender Restitution) reaktivieren. — Unsere Untersuchungen sprechen somit dafür, daß der aktive Ionentransport gelagerter Erythrocyten nicht durch eine Schädigung des Carriersystems, sondern durch einen Mangel an energiereichen Substraten gestört ist.

Active ion transport in stored erythrocytes is not abolished until after 11 days in heparinised or defibrinated blood, or after 21 days when preserved with ACD stabiliser. The activity of the transport ATP-ase from erythrocyte membranes is still unchanged after 90 days storage of stabilised blood.

The active ion transport in stored erythrocytes can be reactivated by introducing ATP into the cell (partial haemolysis, followed by restitution). Our studies support the conclusion that active ion transport in stored erythrocytes is not lost through damage to the carrier system, but by deficiency of energy-rich substrates.

Während der Lagerung menschlicher Erythrocyten in Blutkonserven nimmt bei niedriger Außentemperatur der hohe intrazelluläre Kaliumgehalt ab und es wird Natrium aus dem Plasma aufgenommen. Zusatz von Glucose zu den Konserven verlangsamt diesen Ionen-

austausch (1). Werden die gelagerten Erythrocyten unter Zusatz von Glucose auf 37° erwärmt, so findet durch aktiven Ionentransport eine Restitution des intrazellulären Ionengehaltes statt: Kalium wird in die Zelle hinein und Natrium gegen den Konzentrationsgradienten

ten aus der Zelle „herausgepumpt“ (2). Aus Untersuchungen von GARDOS (3), WHITTAM (4) und HOFFMAN (5) ist bekannt, daß Adenosintriphosphat (ATP) die unmittelbare Energiequelle für den aktiven Ionentransport an Erythrocyten darstellt und Glucose für die Synthese der energiereichen Phosphate benötigt wird. Die Vorstellung, daß der aktive Ionentransport durch die Zellmembran mit Hilfe eines energieabhängigen „Carriersystems“ erfolgt (6, 7), fand in letzter Zeit eine weitere Grundlage durch Untersuchungen von POST und Mitarbeitern (8) sowie von DUNHAM und GLYNN (9), die in der Erythrocytenmembran eine durch Natrium und Kalium aktivierbare ATPase nachweisen konnten. Herzwirksame Glykoside, die den aktiven Ionentransport an intakten Erythrocyten hemmen, hemmen auch die durch Natrium und Kalium aktivierbare Membran-ATPase (10, 11).

In vorangehenden Untersuchungen fanden wir (12), daß Katzenerythrocyten, die einen niedrigen Kaliumgehalt haben, keine durch Kalium und Natrium stimulierbare Membran-ATPase besitzen, was dafür spricht, daß dieses Enzym für das „Carriersystem“ der Erythrocyten notwendig ist. An Erythrocyten des Menschen, des Meerschweinchens und der Ratte stellten wir fest (13), daß in Parallele zur verschiedenen Empfindlichkeit des aktiven Ionentransportes gegen Strophanthin auch die aus diesen Erythrocyten isolierte Membran-ATPase durch das Glykosid verschieden stark gehemmt wird. Die Aktivierung durch Kalium und Natrium und die Hemmung durch Strophanthin sind daher — auch in den vorliegenden Untersuchungen — ein Kriterium, um die Aktivität der Transport-ATPase zu ermitteln. Nach Untersuchungen von BLOSTEIN und Mitarbeitern (14) nimmt bei Erythrocyten nach längerer Lagerung in ACD-Stabilisator die Fähigkeit des aktiven Rücktransportes von Kalium und Natrium ab. Hierfür könnte sowohl die Verminderung des intrazellulären Gehaltes an ATP (14, 15) als auch eine Schädigung der für den Transport notwendigen Membran-ATPase verantwortlich sein. Wir haben deshalb in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Transportleistung und die Membran-ATPase-Aktivität der in ACD-Stabilisator gelagerten Erythrocyten in gleicher Weise gestört sind. Zum Vergleich wurden Untersuchungen an Erythrocyten durchgeführt, die in heparinisiertem oder defibriniertem Blut gelagert waren.

Methodik

Durch Venenpunktion gewonnenes Blut wurde defibriniert oder durch Zusatz von Heparin (2 mg/ml) bzw. ACD-Stabilisator (1:5 v/v) ungerinnbar gemacht und bei +4° gelagert. Der ACD-Stabilisator hatte folgende Zusammensetzung: Glucose 2%, Natriumcitrat 2,25%, Citronensäure 0,66%. Zur Bestimmung des intrazellulären Ionengehaltes wurden jeweils 1 ml Blut entnommen, zentrifugiert und die Erythrocyten 2mal mit eiskalter, isotonischer Cholinchloridlösung gewaschen. Nach Hämolyse der Zellen mit aqua bidest. wurde der Natrium- und Kaliumgehalt (bezogen auf mÄq// Erythrocyten) flammenphotometrisch bestimmt und der intrazelluläre Na^+/K^+ -Quotient berechnet.

Zur Bestimmung des aktiven Ionentransportes wurden aus Blutkonserven nach verschieden langer Lagerung je 15 ml entnommen

und unter Zusatz von Glucose (2 mg/ml) bis zu 5 Std. bei 37° inkubiert.

Die Präparation der Erythrocytenmembranen erfolgte nach der Methode von POST und Mitarbeitern (8). Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden Enzymsätze bei 37° 1 Std. lang inkubiert. In einem Endvolumen von 1,5 ml enthielten sie 0,1–0,2 ml Enzymlösung, Trispuffer (pH 7,95; 20 mMol), ATP (2 mMol), Mg^{++} (5 mMol), Na^+ (132 mMol), K^+ (10 mMol); die Enzymlösung wurde erst nach 10 min. Vorinkubation zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,1 ml eiskalter, 60-proz. Perchlorsäure im Eisbad beendet, das gefällte Protein abzentrifugiert und im Überstand der anorganische Phosphor nach FISKE und SUBBAROW (16) bestimmt. Außerdem ermittelten wir als Bezugs- wert den Proteingehalt der Ansätze (Biuret). In Kontrollansätzen ohne Enzymzusatz haben wir den spontanen ATP-Zerfall ermittelt und die Werte der Versuche entsprechend korrigiert. In den Enzympräparaten selbst ließ sich kein anorganischer Phosphor nachweisen. Die Einführung von ATP in die Erythrocyten erfolgte durch partielle Hämolyse und anschließende Restitution, wie sie von GARDOS (3) und HOFFMAN und Mitarbeitern (17) angegeben wurden.

Ergebnisse

Einfluß der Lagerung auf Ionengehalt und Ionentransport

Durch Venenpunktion gewonnenes Blut gesunder, freiwilliger Spender wurde defibriniert oder mit Heparin bzw. ACD-Stabilisator versetzt, der Na^+ - und K^+ -Gehalt der Erythrocyten sofort bestimmt und das Blut 3 und 6 Tage bei +4° im Kühlschrank unter sterilen Bedingungen gelagert. Der Na^+/K^+ -Quotient der Erythrocyten betrug vor der Lagerung 0,08–0,11 und war in den drei verschiedenen Konserven etwa gleich groß. Nach 3tägiger Lagerung stieg der Quotient durch Austausch der Ionen in Richtung der Konzentrationsgradienten an. Dieser passive Ionenaustausch erfolgte im heparinisierten und defibrinierten Blut wesent-

Abb. 1

Änderung des intrazellulären Na^+/K^+ -Quotienten menschlicher Erythrocyten nach 3- bzw. 6tägiger Lagerung bei +4° und anschließender 5stdg. Inkubation bei 37°

ACD = Erythrocyten aus Konserven mit ACD-Stabilisator;

Hep. = Erythrocyten aus heparinisiertem Blut;

Def. = Erythrocyten aus defibriniertem Blut;

Die schwarzen Säulen bedeuten die Quotienten nach 3stdg. Inkubation bei 37° (aktiver Transport). Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte von je 4 Versuchen mit verschiedenen Konserven

Abb. 2
Intrazellulärer Na^+/K^+ -
Quotient menschlicher
Erythrocyten nach 6-, 11-
bzw. 21tägiger Lagerung
bei $+4^\circ$ und anschließender
5stdg. Inkubation
bei 37°

○ Defibriniertes Blut
● heparinisiertes Blut
△ ACD-Stabilisator-Blut

Tab. 1

Die Aktivität der durch $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ aktivierbaren und durch Strophanthin hemmbaren Transport-ATPase der Erythrocytenmembran bleibt auch nach längerer Lagerung im ACD-Stabilisator erhalten
Inkubationsmedium: ATP 2 mMol, Mg^{++} 5 mMol, Na^+ 132 mMol, K^+ 10 mMol, Tris 20 mMol pH 7,9 (1 Std. 37°)

Dauer der Lagerung	ATPase-Aktivität in $\mu\text{Mol P/mg Protein/Std.}$ in Anwesenheit von		
	Mg^{++}	$\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+ + \text{K}^+$	$\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Strophanthin } 10^{-5} \text{ Mol}$
0	0,28	0,53	0,27
8	0,29	0,52	0,23
21	0,24	0,49	0,20
95	0,25	0,50	0,24

lich schneller als im Stabilisatorblut. Noch deutlicher wurde dieser Unterschied nach 6tägiger Lagerung: in heparinisiertem bzw. defibriniertem Blut war der Quotient auf das 3–4fache, in Stabilisatorblut dagegen nur auf das Doppelte angestiegen (Abb. 1).

BLOSTEIN u. Mitarbeiter (14) fanden in ähnlichen Versuchen, daß der verzögerte passive Kationenaustausch nach Zusatz von ACD-Stabilisator durch die höhere H^+ -Ionenkonzentration bedingt ist. Andererseits hemmt auch Glucose, die unmittelbar vom Stoffwechsel der Erythrocyten zum Aufbau von ATP verwendet wird, diesen passiven Ionenaustausch (1).

Unabhängig von der Art der Lagerung als defibriniertes, heparinisierendes oder ACD-Blut fand bei allen 3 bzw. 6 Tage alten Erythrocyten während einer 3stdg. Inkubation bei 37° ein Anstieg des intrazellulären Kaliumgehaltes und eine Abnahme des intrazellulären Natriumgehaltes statt (Abb. 1). Dieser Abfall des Na^+/K^+ -Quotienten erfolgte gegen das Konzentrationsgefälle und war somit ein Maß der aktiven Transportleistung durch die Zellmembran. Bei längerer Lagerung nahm die Fähigkeit des aktiven Rücktransportes jedoch deutlich ab. Nach 11tägiger Lagerung trat bei Erythrocyten aus heparinisiertem und defibriniertem Blut während der Inkubation bei 37° kein Abfall des Na^+/K^+ -Quotienten mehr ein, nach 21tägiger Lagerung war auch bei Erythrocyten aus ACD-Konserven der aktive Ionentransport aufgehoben (Abb. 2).

Um festzustellen, ob bei gelagerten Erythrocyten durch Inkubation mit frischem Plasma der aktive Ionentransport wiederhergestellt werden kann, haben wir Erythrocyten von ACD-Konserven nach 16–21tägiger Lagerung mit 0,9 proz. NaCl-Lösung gewaschen und im frisch entnommenen Blutplasma des gleichen Spenders re-

suspendiert. In 5 Versuchen ließ sich keine Reaktivierung des Ionentransportes nachweisen.

Einfluß der Lagerung auf die Aktivität der Membran-ATPase

Aus Erythrocyten der heparinisierten, defibrinierten oder ACD-Blutkonserven ließ sich eine in gleicher Weise durch Kalium und Natrium aktivierbare und durch Strophanthin hemmbare Membran-ATPase darstellen. Auch nach 10tägiger Lagerung, wenn Erythrocyten in heparinisiertem oder defibriniertem Blut nicht mehr in der Lage waren, Kalium und Natrium zu transportieren, bestand kein Unterschied der Enzymaktivität gegenüber Erythrocyten aus ACD-Konserven. Wir haben deshalb die Aktivität der Membran-ATPase von Erythrocyten aus ACD-Konserven bis zum 95. Tag der Lagerung untersucht. In Tabelle 1 sind als Beispiel die Versuchsergebnisse mit der gleichen Blutkonserve nach 8-, 21- und 95tägiger Lagerung dargestellt: am 21. Tag, als der aktive Ionentransport bereits vollständig aufgehoben war (gleiche Konserve wie in Abb. 2), war die Aktivität der Membran-ATPase verglichen mit derjenigen der frischen Erythrocyten unverändert. Selbst nach 95 Tagen ließ sich keine Änderung der durch Kalium und Natrium aktivierbaren und durch Strophanthin hemmbaren Enzymaktivität nachweisen. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei der Lagerung der Erythrocyten die Aktivität der Transport-ATPase länger erhalten bleibt als ihre Fähigkeit des aktiven Ionentransportes.

Versuche zur Wiederherstellung des aktiven Ionentransportes durch ATP

Nach den vorangegangenen Versuchen war zu vermuten, daß der aktive Ionentransport gelagerter Erythro-

Tab. 2

Wiederherstellung des aktiven Ionentransportes menschlicher Erythrocyten durch intrazelluläre Anreicherung von ATP
 Nach 18 bzw. 28 Tage langer Lagerung der Erythrocyten in ACD-Konserven ist der aktive Transport aufgehoben und wird durch partielle Hämolyse und anschließende Restitution unter Zusatz von Mg^{++} (148 μ Mol) und ATP (322 μ Mol) reaktiviert. Inkubationsmedium: $Na^+ = 147$ mMol, $K^+ = 8$ mMol, k-Strophanthin = 10^{-7} Mol

Erythrocyten aus ACD-Konserven	vor Inkubation	Intrazellulärer Na^+/K^+ -Quotient nach Inkubation (3 Stdn./37°)		Differenz
		mit Strophanthin	ohne Strophanthin	
	nach 18tägiger Lagerung			
unbehandelt	0,35	0,35	0,35	0
partiell hämolysiert	2,32	2,79	2,09	— 0,70
	nach 28tägiger Lagerung			
unbehandelt	0,68	0,68	0,68	0
partiell hämolysiert	2,01	2,46	1,82	— 0,64

cyten nicht durch eine Schädigung der hierfür notwendigen Transport-ATPase, sondern durch einen Mangel an energetischem Substrat bedingt ist. BLOSTEIN und Mitarbeiter (14) sowie KLEINE und SCHMITT (15) konnten nachweisen, daß der ATP-Gehalt der Erythrocyten während der Lagerung im ACD-Stabilisator kontinuierlich abnimmt. Wir führten deshalb zunächst einige Versuche durch, in denen wir 20—35 Tage gelagertes Stabilisatorblut unter Zusatz von ATP (Endkonzentration 2,5 mMol) 3—5 Stunden bei 37° inkubierten und anschließend den intrazellulären Na^+/K^+ -Quotienten bestimmten. Auf diese Weise ließ sich jedoch keine Reaktivierung des Ionentransportes bei länger als 20 Tagen gelagerten Erythrocyten erzielen.

In weiteren Untersuchungen haben wir, in Anlehnung an die Methode von GARDOS (3) sowie von HOFFMAN und Mitarbeitern (17), eine partielle Hämolyse durchgeführt mit anschließender Restitution in einem ATP-haltigen Medium. Auf diese Weise gelingt es, ATP in die Erythrocyten einzuschleusen. In Tabelle 2 sind zwei Versuchsbeispiele dargestellt, in denen die Transportleistung der mit ATP angereicherten „Ghosts“ nach 18- bzw. 28tägiger Lagerung der Erythrocyten in einer ACD-Konserve ermittelt wurde. In Kontrollansätzen blieb der Na^+/K^+ -Quotient und damit der aktive Ionentransport unvorbehandelter Erythrocyten während der 3stdg. Inkubation (wie in dem Versuch der Abb. 2) unbeeinflusst. Die mit ATP angereicherten Erythrocyten waren dagegen während der 3stdg. Inkubation in der Lage, ihren Na^+/K^+ -Quotienten zu vermindern, d. h. Kalium aufzunehmen bzw. Natrium abzugeben. Der aktive Ionentransport an diesen Erythrocyten ist besonders deutlich zu erkennen, wenn man die Quotienten dieser Ansätze mit denjenigen vergleicht, in denen der aktive Ionentransport durch Strophanthin gehemmt war (Tab. 2).

Diskussion

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß menschliche Erythrocyten nach längerer Lagerung die Fähigkeit verlieren, ihren intrazellulären K-Gehalt zu regenerieren. In Übereinstimmung mit anderen Autoren fanden wir, daß diese Transportleistung der Erythrocytenmembran länger erhalten bleibt, wenn das Blut unter Zusatz des ACD-Stabilisators gelagert wird. Während an Erythrocyten aus heparinisiertem oder defibriertem Blut schon nach 11tägiger Lagerung kein aktiver Ionentransport mehr stattfindet, erlischt die Transportfähigkeit in Stabilisatorblut erst nach etwa 20 Tagen. Diese Feststellung ist wichtig, da die Lebensfähigkeit infundierter Erythrocyten aus Blutkonserven wahrscheinlich maßgeblich von der Erhaltung des aktiven Ionentransportes abhängt.

Die Ursache des geschädigten Ionentransportes ist nach unseren Versuchsergebnissen nicht eine Schädigung des für den Transport notwendigen Enzyms—der Membran-ATPase—sondern ein intrazellulärer Mangel an ATP. Wir fanden, daß Membranpräparate aus Erythrocyten, die bis zu 95 Tagen in ACD-Konserven gelagert waren, noch ihre volle Enzymaktivität besitzen, und konnten andererseits feststellen, daß nach Einschleusen von ATP in das Zellinnere eine Reaktivierung des aktiven Transportes möglich ist. Interessant ist, daß nach neueren Untersuchungen von SCHRIER und DOAK (18) wahrscheinlich in der Erythrocytenmembran ATP synthetisiert wird, so daß während der Lagerung der Erythrocyten möglicherweise doch eine wesentliche Schädigung der Zellmembranen stattfindet. Die Erhaltung des intrazellulären ATP-Gehaltes wird nach Untersuchungen von WOSEGIEN und Mitarbeitern (19) durch Zusatz von Purinen und Nucleosiden und nach KLEINE und SCHMITT (15) durch Zusatz von anorganischem Phosphat begünstigt.

Literatur

1. MAIZELS, M., J. Physiology 108, 247 (1949). — 2. HARRIS, J. E., J. biol. Chemistry 141, 579 (1941). — 3. GARDOS, G., Acta physiol. Acad. Sci. hung. 6, 191 (1954). — 4. WHITTAM, R., J. Physiology 140, 479 (1958). — 5. HOFFMAN, J. F., Federat. Proc. 19, 127 (1960). — 6. HEINZ, E., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 245, 10 (1963). — 7. WILBRANDT, R. und TH. ROSEN-

BERG, Pharmacol. Rev. 13, 110 (1961). — 8. POST, R. L., C. R. MERRIT, C. R. KINSOLVING und C. D. ALBRIGHT, J. biol. Chemistry 235, 1796 (1960). — 9. DUNHAM, E. T. und J. M. GLYNN, J. Physiology 156, 274 (1961). — 10. SCHATZMANN, H. J., Helvet. physiol. pharmacol. acta 11, 346 (1953). — 11. GREEFF, K., Klin. Physiol. 1, 340 (1963). — 12. GREEFF, K., H. GROBECKER und U. PIECHOWSKI,

Naturwissenschaften 51, 42 (1964). — 13. GROBECKER, H., U. PIECHOWSKI und K. GREEFF, Med. exp. (Basel) 9, 273 (1963). — 14. BLOSTEIN, R., D. RUBINSTEIN und O. F. DENSTEDT, Canad. J. Biochem. Physiol. 39, 1879 (1961). — 15. KLEINE, N. und H. SCHMITT, Blut 8, 145 (1962). — 16. FISKE, C. H. und Y. SUBBAROW, J. biol.

Chemistry 66, 375 (1925). — 17. HOFFMAN, J. F., D. C. TOSTESON und R. WHITTAM, Nature (London) 185, 186 (1960). — 18. SCHRIER, S. L. und L. S. DOAK, J. Clin. Invest. 42, 756 (1963). — 19. WOSEGIEN, F., K. DOSE und H. FISCHER, Klin. Wschr. 40, 589 (1962).

Dr. H. Grobecker

Pharmakolog. Inst. der Universität

6 Frankfurt/Main-S 10, Ludwig-Rehn-Str. 14

Quantitative Bestimmung von 6β -Hydroxycortisol unter Verwendung der Dünnschichtchromatographie mit Fluoreszenzindikator

Von K. BERTHOLD und HJ. STAUDINGER

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger)

(Eingegangen am 16. November 1965)

Eine neue Methode zur Bestimmung von 6β -Hydroxycortisol im menschlichen Harn wird beschrieben. Die Methode ist spezifisch, genügend genau und richtig und als Routineverfahren geeignet. Die Ausscheidung von 6β -Hydroxycortisol bei 20 gesunden Menschen (von 20—50 Jahren) wird bestimmt. Der Normalwert ist $530 \mu\text{g}/24 \text{ Std.} \pm 140 \mu\text{g}$. Nach Barbitursäuregaben sind die Ausscheidungen im allgemeinen zwar höher, sie liegen aber nicht außerhalb der Normalwertgrenzen.

A new method is described for the determination of 6β -hydroxycortisol in human urine. The method is specific and sufficiently accurate and suitable as a routine procedure. The excretion of 6β -hydroxycortisol was determined for 20 healthy adults (20—50 years). The normal value was $530 \mu\text{g}/24 \text{ hrs.} \pm 140 \mu\text{g}$. After the administration of barbituric acid, the excretion is generally higher, but it does not lie outside the range of normal values.

6β -Hydroxycortisol, das erstmals 1954 von BURNSTEIN, DORFMAN und NADEL (1), zunächst in Meerschweinchen-Harn und später auch in menschlichem Harn nachgewiesen werden konnte, wurde von FRANTZ, KATZ und JAILER, sowie ULSTROM und Mitarbeitern (2—5) in erhöhten Konzentrationen im menschlichen Urin bei normaler Schwangerschaft, bei Schwangerschaftstoxikosen, bei Neugeborenen und bei der Nebennierenrindenüberfunktion gefunden. Aus Rattenharn haben H. HERKEN und E. SEEGER 6β -Hydroxycorticosteron isolieren können (6).

Besondere Bedeutung erhielt die Bestimmung von 6β -Hydroxycortisol im Harn, nachdem CONNEY und KLUTCH (7) im Rahmen ihrer Untersuchungen zeigen konnten, daß durch Phenobarbital neben anderen mikrosomalen mischfunktionellen Oxygenasen in der Rattenleber auch die 6β -Steroid-Hydroxylase induziert wird. — Setzt man voraus, daß eine Aktivierung von mikrosomalen Enzymsystemen auch in der menschlichen Leber möglich ist, so könnte die 6β -Hydroxycortisol-Ausscheidung beim Menschen ein geeigneter Parameter für die mikrosomale Leberfunktion sein. Mit der von NISHIKAZE, ABRAHAM und STAUDINGER angegebenen Methode zur dünnschichtchromatographischen Fraktionierung von Corticosteroiden im Harn (8, 9) kann 6β -Hydroxycortisol nicht erfaßt werden. Seine relativ gute Löslichkeit in Wasser machte eine Erweiterung der von FRANTZ und Mitarbeitern (4) zur Isolierung von 6β -Hydroxycortisol angegebenen Verteilungsverfahren und eine Entwicklung anderer Laufmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie, als sie zur Isolierung der weniger polaren Harn corticosteroide notwendig sind (8, 9), erforderlich.

Setzt die Einführung der Dünnschichtchromatographie zur Fraktionierung von Corticosteroiden im Harn den

zeitlichen und methodischen Aufwand erheblich herab, so bietet die Verwendung des Kieselgel-HF₂₅₄ „Merck“, das einen Fluoreszenzindikator enthält, eine weitere methodische Vereinfachung. Die durch die Δ^4 -3-Keto-Gruppe des A-Ringes bedingte Löschung der Fluoreszenz auf der Dünnschichtplatte macht nach der Chromatographie eine unmittelbare Lokalisation des 6β -Hydroxycortisols möglich. Nachfolgend wird die Methode ausführlich dargestellt, da schon geringe methodische Abweichungen die Reproduzierbarkeit der quantitativen Bestimmung in Frage stellen.

Methodik

Extraktion

Der 24-Stdn.-Harn soll, um Verluste an 6β -Hydroxycortisol zu vermeiden, möglichst bald nach dem Sammeln aufgearbeitet werden. Man kann ihn jedoch auch bei -10 bis -15° einfrieren, wobei der 6β -Hydroxycortisolgehalt konstant bleibt.

$1/20$ eines 24-Stdn.-Harns wird mit Essigsäure auf pH 4,5 eingestellt, mit Natriumsulfat (20% der Harnmenge) versetzt und zweimal mit dem doppelten Volumen Äthylacetat jeweils $1/2$ Std. geschüttelt. Die vereinigten Extrakte werden dreimal mit 0,5 N-NaOH in 20-proz. Natriumsulfatlösung ($1/20$ des Extraktionsvolumens) und einmal mit aqua dest. ($1/100$ des Extraktionsvolumens) gewaschen, durch ein Faltenfilter in einen Rundkolben filtriert und bei 37 bis 40° unter Stickstoff eingedampft. Die Lösung des Rückstandes in 5 ml Methylenchlorid / Methanol (4:1) überführt man in ein 10 ml-Schlißröhrchen und dampft sie bei 37 bis 40° unter Stickstoff ein. Der Rückstand wird in 1 ml Methylenchlorid aufgenommen und mit 8 ml methylenchloridgesättigtem Wasser etwa 3 Min. geschüttelt. Nach Zentrifugieren der entstandenen Emulsion trennt man die untere Phase ab, schüttelt den Überstand etwa 3 Min. mit 0,5 ml Methylenchlorid und zentrifugiert erneut. Die wäßrige Phase wird abgehebert und zweimal mit 50 ml wassergesättigtem Äthylacetat etwa 10 Min. extrahiert. Die beiden Phasen werden durch Zentrifugieren entmischt. Die vereinigten Extrakte dampft man im Rundkolben bei 37 bis 40° unter Stickstoff ein, überführt den Rückstand mit etwa 5 ml Methylenchlorid/Methanol (4:1) in ein Schlißröhrchen und verdampft das Lösungsmittel.