

10. BURCH, H. B., C. A. STORWICK, R. L. BICKNELL, H. C. KUNG, L. G. ALEJO, W. A. EVERHARDT, O. H. LOWRY, C. G. KING and O. A. BESSEY, *J. biol. Chemistry* 212, 897 (1955). — 11. HERKEN, H., and V. NEUHOFF, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 331, 85 (1963). — 12. NEUHOFF, V., *Habilitationschrift, Freie Universität Berlin* (1964). — 13. KLINGENBERG, M., *Struktur und funktionelle Biochemie der Mitochondrien, II. Die funktionelle Biochemie der Mitochondrien*. In: *Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle* S. 69, Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg (1963). — 14. HERKEN, H., *Reduction of renal sodium and potassium transport following intracellular biosynthesis of abnormally structured nucleotides*. *Gastvorlesungen in den Pharmakologischen Instituten des Medical Center, Syracuse und der Harvard Medical School, Boston*, (1965). — 15. HERKEN, H., *Drug-induced pathobiotic effects*. In: *Proc. 3rd. Pharmacological Meeting* Vol. 4, p. 3, Pergamon Press Limited, Oxford, (1968). — 16. NIKLOWITZ, W. and I. J. BAK, *Zschr. Zellforsch.* 66, 529 (1965). — 17. WARBURG, O. and W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* 287, 291 (1936). — 18. COPER, H. and D. NEUBERT, *J. Neurochem.* 10, 513 (1963). — 19. COPER, H. and D. NEUBERT, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 89, 23 (1964). — 20. NEUBERT, D. and H. COPER, *Biochem. Z.* 341, 485 (1965). — 21. HERKEN, H. and R. TIMMLER, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path.* 250, 293 (1965). — 22. BRUNNEMANN, A. and H. COPER, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path.* 246, 493 (1964). — 23. KUSCHINSKY, K. U., *Enterale Resorption, Verteilung und Ausscheidung von Formaldehyd bei Ratten und Mäusen*, Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1965). — 24. GAITONDE, M. K. and D. RICHTER, *J. Neurochem.* 13, 1309 (1966). — 25a. BEHER, W. T., W. M. HOLLIDAY and O. H. GAEBLER, *J. biol. Chemistry* 198, 573 (1952). — 25b. BEHER, W. T. and W. L. ANTHONY, *J. biol. Chemistry* 203, 895 (1953). — 25c. GAEBLER, O. H. and W. T. BEHER, *J. biol. Chemistry* 215, 527 (1955). — 25d. BEHER, W. T., G. D. BAKER and M. MADOFF, *J. biol. Chemistry* 234, 2388 (1959). — 26. HARRIS, TH. and V. NEUHOFF, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path.* 253, 221 (1966). — 27. NEUHOFF, V. and F. KÖHLER, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path.* 254, 301 (1966). — 28. HICKS, S. P., *Amer. J. Path.* 31, 189 (1955). — 29. COGGLESHALL, R. E. and P. D. McLEAN, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98, 687 (1958). — 30. COGGLESHALL, R. E. and P. D. McLEAN, *Transact. Amer. Neurol. Ass.* 84, 169 (1959). — 31. McLEAN, P. D., in: *Selective Vulnerability of the Brain in Hypoxaemia*, p. 177 Blackwell Scientific Publication Oxford (1963). — 32. LIERSE, W., *Zschr. Zellforsch.* 67, 86 (1965). — 33. PETERS, G., *Personal Communication* (1966). — 34. DENK, H., M. HAIDER, W. KOVAC and G. STUDYNKA, *Acta Neuropath.* 10, 34 (1968). — 35. NEUBERT, D. and E. OBERDISSE, *Unpublished Experiments* (1967). — 36. WIDNELL, C. C. and J. R. TATA, *Biochem. J.* 92, 313 (1964). — 37. BLACKSTAD, T. W., *J. Comp. Neurol.*, Philadelphia 105, 417 (1956). — 38. ANDERSEN, P., *Acta physiol. Scand.* 47, 65 (1959).

Prof. Dr. H. Herken
1000 Berlin 33
Thielallee 69/73

Steroide und Haut

I. Mitteilung: Zur Bestimmung verschiedener C₁₉- und C₁₈-Steroide in Hauteluat

Von L. TREIBER und G. W. OERTEL

*Aus der Abteilung für Experimentelle Endokrinologie der Universitäts-Frauenklinik Mainz
(Direktor: Prof. Dr. V. Friedberg)*

(Eingegangen am 16. Januar 1968)

Zur Routine-Analyse verschiedener C₁₉- und C₁₈-Steroide in der Haut vom Menschen eluiert man 100 cm² der Hautoberfläche mit geeigneten Lösungsmitteln, unterwirft den Extrakt nach Entfettung einer Solvolyse und trennt neutrale und phenolische Steroide ab. In der neutralen Fraktion werden Dehydroepiandrosteron, Androsteron und Ätiocholanolon sowie Testosteron mit der 2,4-Dinitrophenylhydrazinmethode, in der phenolischen Fraktion die Östrogene durch Gaschromatographie ihrer Acetate quantitativ bestimmt. An Stelle der üblichen Konzentrationsangaben gibt das Konzentrationsverhältnis einzelner Verbindungen zueinander brauchbare Hinweise auf das Steroid-Muster der Haut.

Steroids and the skin. Communication No. 1

For the routine analysis of the different C₁₉- and C₁₈-steroids in human skin, 100 cm² of skin surface are eluted with suitable solvents, fats are removed from the extract, the steroids are redissolved, and the neutral and phenolic steroids are separated. In the neutral fraction, dehydroepiandrosterone, androsterone, aetiocholanolone and testosterone are quantitatively determined with 2,4-dinitrophenylhydrazine, and the oestrogens of the phenolic fraction by gas chromatography of their acetates. In addition of the usual concentration data, the relative concentrations of the individual compounds are a useful indication of the skin steroid pattern.

Das Vorkommen von C₁₉-Steroiden in der menschlichen Haut ist seit geraumer Zeit bekannt (1—3). Desweiteren konnte im Hautgewebe ein Stoffwechsel derartiger Steroide nachgewiesen werden (4—6), wobei offenbar das im Kreislauf befindliche Dehydroepiandrosteron-sulfatid (7) als Vorstufe der durch die Haut ausgeschiedenen C₁₉- und C₁₈-Steroide gelten dürfte (8). Aufgrund dieser experimentellen Befunde erschien es angezeigt, eine Bestimmung verschiedener C₁₉- und

C₁₈-Steroide in der Haut vorzunehmen, die gegebenenfalls auch zur Diagnose Steroid-abhängiger oder -beeinflusster Hautkrankheiten beitragen könnte.

Methodik

Gewinnung von Hauteluat

Zur Gewinnung der in der Haut auftretenden freien Steroide, Steroidsulfatide, -sulfate (und -glucuronide) wird eine 10 × 10 cm große Hautfläche oberhalb des Knies mit 10 ml Äther-Äthanol-Wasser (1:4:1 v/v) und anschließend mit 10 ml Äthylacetat eluiert.

Dabei trinkt man jeweils 3 mit Gaze umwickelte Stäbchen mit dem Lösungsmittel und reibt die Hautoberfläche gründlich ab. Die Gaze wird sodann dreimal mit je 100 ml Chloroform-Methanol (1:1 v/v) extrahiert, der Gesamtextrakt mit 1 ml Eisessig versetzt und im Rotationsverdampfer zur vollständigen Trockne gebracht.

Entfettung

Man nimmt den Rückstand in 20 ml 70proz. Methanol auf, überführt in ein Zentrifugenglas und kühlt nach Zusatz von 1 g grobem Kieselgel (zur Chromatographie, 0,2—0,5 mm; Merck AG Darmstadt) und Schütteln die Suspension 3 Std auf -20° . Es folgt Zentrifugieren für 5 Min. bei 4000 U./Min., Dekantieren und Eindampfen des Überstands bis auf 6—8 ml. Nach Zugabe von 50proz. (w/v) Ammoniumsulfatlösung extrahiert man dreimal mit je 2 Vol. Äthylacetat und dampft den Gesamtextrakt unter Stickstoff bei 37° zur Trockne ein.

Solvolyse der Konjugate

Der Rückstand wird in 25 ml 1proz. Perchlorsäure in Äther aufgenommen und über Nacht bei 37° inkubiert (9).

Abtrennung und Reinigung phenolischer Steroide

Das Solvolysat wird zweimal mit je 10 ml 1,0 N Natronlauge und zweimal mit je 5 ml Wasser gewaschen. Aus den vereinigten alkalischen Auszügen lassen sich die phenolischen Steroide in üblicher Weise (10) abtrennen. Ihre Reinigung geschieht durch Chromatographie an einer mit Benzol zubereiteten Säule (0,5 cm \varnothing) aus 1 g Aluminiumoxid (Woelm, neutral, Akt. Stufe 1), wobei nach Waschen mit Benzol und 0,5proz. Äthanol in Benzol Östron und Östradiol mittels 4proz. Äthanol in Benzol, Östriol aber mit 30proz. Äthanol in Benzol eluiert werden. Die betreffenden Fraktionen werden zur Trockne eingedampft, die Rückstände mit 0,1 ml Pyridin und 0,5 ml Essigsäureanhydrid 1 Std. auf 65° erhitzt und die gebildeten Acetate nach Verdünnen mit 5 ml Wasser mit zweimal je 5 ml Petroläther extrahiert. Man wäscht den Extrakt mit 5 ml 5proz. Natriumbicarbonatlösung und zweimal je 2,5 ml Wasser und dampft zur Trockne ein. Zur weiteren Reinigung wird der Rückstand einer zweiten Säulenchromatographie an 1 g Aluminiumoxid (Woelm, neutral, Akt. Stufe 1) unterworfen. Die Zubereitung der Säule wie auch ihr Waschen erfolgt mit Benzol, während die acetylierten Östrogene mit 4proz. Äthanol in Benzol eluiert werden.

Quantitative Bestimmung von Östrogenen (11)

Der jeweilige Rückstand mit acetylierten Östrogenen wird in möglichst wenig Aceton gelöst und ein Aliquot von 1—2 μ l zur gaschromatographischen Bestimmung auf die Säule gegeben. Diese (1200 \times 4 mm) besteht aus 3,8proz. SE-30 auf säuregewaschenem und silanisierendem Diatoport S (80—100 mesh). Die Temperatur der Säule, des Verdampferblocks und des Flammenionisationsdetektors beträgt 225° bzw. 260° und 235° , die Durchfließgeschwindigkeit des Trägergases 40 ml Helium/Min. Die Retentionszeit der Acetate liegt für Östron bei 6,2 Min., für Östradiol bei 9,7 und für Östriol bei 19,2 Min. Zwecks quantitativer Auswertung werden zusätzlich zu je 3 Einzelmessungen entsprechende Aliquote der Proben mit jeweils 20 ng der zugehörigen Standardverbindungen verdünnt und der Gaschromatographie unterworfen. Aus der Differenz der Gipfelhöhen läßt sich der Gehalt der Einzelproben an Östrogenen errechnen.

Quantitative Bestimmung neutraler Steroide (9, 12)

Das von phenolischen Steroiden befreite Solvolysat wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 0,1 ml 0,2proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat aufgenommen und nach Eindampfen unter Stickstoff mit 1,0 ml 0,01proz. Trichloressigsäure in absol. Benzol 30 Min. auf 37° erwärmt. Man dampft erneut zur Trockne ein und unterzieht den Rückstand einer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G in Chloroform-Dioxan (94:6 v/v) zusammen mit entsprechenden Standardverbindungen (2,4-Dinitrophenylhydrazone von DHEA¹), Androsteron, Ätiocholanolon,

Testosteron und Epitestosteron). Um die Derivate des Androsteron und Epitestosterons sowie des Ätiocholanolons und Testosterons voneinander zu trennen, empfiehlt sich eine zweite Dünnschichtchromatographie der betreffenden Eluate auf Kieselgel G in Tetrachlorkohlenstoff-Dioxan (4:1 v/v). Die einzelnen 2,4-Dinitrophenylhydrazone eluiert man nach Abkratzen der Zonen stets mit zweimal je 10 ml Chloroform. Unpolare Steroide bzw. Sterine lassen sich durch Reaktion der bei Entfettung anfallenden und mit Petroläther extrahierbaren Lipoide in 1,0 ml 0,2proz. 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthylacetat und 5,0 ml 0,01proz. Trichloressigsäure in absol. Benzol und anschließende Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches auf Kieselgel G in Tetrachlorkohlenstoff-Chloroform (4:1 v/v) erfassen. Die hierbei erhältlichen, wie auch die im Verlauf der ersten Dünnschichtchromatographie neutraler C₁₉-Steroide auftretenden unpolaren Derivate müssen durch eine nochmalige gemeinsame Dünnschichtchromatographie in Tetrachlorkohlenstoff-Chloroform (4:1 v/v) gereinigt werden, bevor eine quantitative Bestimmung möglich ist.

Die quantitative Bestimmung einzelner 2,4-Dinitrophenylhydrazone wird durch Photometrie der reinen Fraktionen und entsprechender Standardverbindungen bei geeigneten Wellenlängen (12) durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Da es sich bei der hier beschriebenen Methode zur Bestimmung von Hautsteroiden um ein bereits bewährtes Analysenverfahren (8, 9, 12) handelt, wo statt der Plasma- oder Harnextrakte lediglich Hauteluate zur Aufarbeitung kommen, gleichen die Zuverlässigkeitskriterien erwartungsgemäß weitgehend früheren, diesbezüglichen Angaben. So lag die Wiederauffindungsrate von 1,45 μ g 7α -³H-DHEA und 3,93 μ g Na- 7α -³H-DHEA-sulfat, die jeweils zu 10 Hauteluatzen hinzugefügt worden waren, zwischen 77 und 82% bzw. 73 und 79%. Gleichsinnige Experimente mit 0,25 μ g Östron, Östradiol oder Östriol erbrachten eine Wiederauffindungsrate von 71 bis 76%. Außer der Richtigkeit wurden auch Genauigkeit und Empfindlichkeit der Methode überprüft. Bei Mehrfachanalysen (n = 8—10) ergab sich eine Abweichung der Einzelwerte vom Mittel von $\pm 7,2\%$ für DHEA und von $\pm 7,1\%$ bzw. $\pm 8,3\%$ für Östron bzw. Östriol. Belief sich die Empfindlichkeit der Bestimmung von C₁₉-Steroiden auf 0,2 bis 0,25 μ g (8, 9, 12), so konnten 5 ng Östron oder Östradiol bzw. 10 ng Östriol mit ausreichender Genauigkeit erfaßt werden. Aus Tabelle 1

Tab. 1
C₁₉- und C₁₈-Steroide in Hauteluatzen von Normalpersonen

Steroid	μ g/100 cm ² (bzw. Relation)	
	Männer (11)	Frauen (10)
Dehydroepiandrosteron	3,7—9,4	3,2—6,9
Androsteron	4,4—15,8	3,9—13,6
Ätiocholanolon	1,9—6,3	1,6—4,2
Testosteron	0,14—1,21	0,11—0,31
Östron	Östrogene 0,27—2,12	0,49—2,63
Östradiol		
Östriol		
Relation		
DHEA/Androsteron + Ätiocholanolon	0,17—0,77 (0,39)*	0,33—0,52 (0,40)*
DHEA/Testosteron	3,2—7,8 (5,5)*	9,1—18,3 (14,2)*
DHEA/Östrogene	3,2—5,1 (4,6)*	1,3—2,2 (1,9)*
Testosteron/Östrogene	0,3—1,4 (0,76)*	0,12—0,19 (0,14)*

* Mittelwert

¹) Abkürzung DHEA = Dehydroepiandrosteron.

Tab. 2
C₁₉- und C₁₈-Steroide in Hauteluaten von fünf aknekranken Männern

Steroid	µg/100 cm ² (bzw. Relation)
Dehydroepiandrosteron	0,27—1,33
Androsteron	0,97—1,70
Ätiocholanolon	1,10—4,56
Testosteron	<0,10—0,21
Östron	} Östrogene 0,65—2,84
Östradiol	
Östriol	
Relation	
DHEA/Androsteron + Ätiocholanolon	0,10—0,76 (0,25)*
DHEA/Testosteron	3,1—8,8 (4,9)*
DHEA/Östrogene	0,12—0,71 (0,35)*
Testosteron/Östrogene	0,04—0,18 (0,08)*

* Mittelwert

sind die gefundenen Konzentrationsbereiche für C₁₉- und C₁₈-Steroide in Hauteluaten normaler Männer und Frauen zu entnehmen. Tabelle 2 enthält die entsprechenden Ergebnisse bei Analyse der C₁₉- und C₁₈-Steroide in der Haut unter Akne leidender Männer. Angesichts

der wohl kaum zu reproduzierenden Gewinnung des Ausgangsmaterials wurde verständlicherweise auf die Angabe der Einzelwerte verzichtet und nur die Relation einzelner Fraktionen zum Vergleich aufgeführt. Hier dürften insbesondere die relativ niedrigen Hautspiegel des DHEA und die überraschend hohen Konzentrationen von Östrogenen in Hauteluaten Aknekranker von Interesse sein. Gleichzeitig aber sprechen solche Befunde u. U. für die Bedeutung derartiger Tests bei Hauterkrankungen. Die Identifizierung der zahlreichen unpolaren Verbindungen, die sich wohl größtenteils aus Sterinen bzw. deren Metaboliten zusammensetzen, ist noch nicht abgeschlossen. Dennoch konnten sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede im Exkretionsmuster dieser Verbindungen bei Normalpersonen und Aknekranken festgestellt werden (13).

Vorliegende Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Die Analyse des Steroidmusters in der Haut aknekranker Männer erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Priv.-Doz. Dr. G. BREHM, Universitäts-Hautklinik Mainz.

Literatur

- CARRIE, C. und H. RUHRMANN, *Hautarzt* 6, 9 (1955).
- DUBOVIE, M. L., *Vestn. venerol. dermat. Moskva* 34, 10 (1960).
- COOK, I. J. und A. I. LORINEZ, *J. Investigat. Dermat. Baltimore* 41, 265 (1963).
- FAREDIN, I., J. L. WEBB und M. JULESZ, *Excerpta Med. Found. Congr. Ser. 111*, 278 (1966).
- RONGONE, E. L., *Steroids* 7, 489 (1966).
- GALLEGOS, A. J. und D. L. BERLINER, *J. Clin. Endocr. Baltimore* 27, 214 (1967).
- OERTEL, G. W., P. KNAPSTEIN und L. TREIBER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 345, 221 (1966).
- OERTEL, G. W. und L. TREIBER, *European J. Biochem.*, im Druck.
- TREIBER, L. und G. W. OERTEL, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 17, 81 (1967).
- ENGEL, L. L. und I. T. NATHANSON, *J. biol. Chemistry* 185, 255 (1950).
- WOTIZ, H. H. und H. F. MARTIN, *Analyt. Biochem.* 3, 97 (1962).
- TREIBER, L., W. RINDT und G. W. OERTEL, *diese Z.* 5, 102 (1967).
- TREIBER, L. und G. W. OERTEL, in Vorbereitung.

Prof. Dr. G. W. Oertel
65 Mainz
Langenbeckstr. 1

Untersuchungen zur Frage einer Beeinflussung der bei Urämie drohenden K⁺-Vergiftung durch Harnstoff

VON D. PANKOW UND K. POHLE

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Halle-Wittenberg (ehemaliger Direktor: Prof. Dr. K. Poble)

(Eingegangen am 1. Februar 1968)

Die in toxischen Dosen stark herzwirksamen Kaliumionen zeigen bei Urämie auffällige Schwankungen ihrer Giftigkeit. Bei der Prüfung am isolierten Froschherz fanden wir die K⁺-Wirkung durch Harnstoff verstärkt und untersuchten daran anschließend, ob Harnstoff die vermutlich auf einer Senkung des Membranpotentials beruhende herz lähmende Wirkung des K⁺ durch Änderung seiner Aktivität oder seiner Permeabilität beeinflusst. Es ergab sich, daß die Harnstoffwirkung als Permeabilitätseffekt zu deuten ist, denn am isolierten Froschherz zeigt K⁺ unter dem Einfluß von Harnstoff das Bestreben, aus dem Herzgewebe vermehrt in die extrazelluläre Flüssigkeit abzuwandern. Der gefundene Zusammenhang zwischen K⁺ und Harnstoff erscheint vom klinischen Standpunkt aus nicht ohne Bedeutung. Unsere Versuche weisen darauf hin, daß die Hämodialyse urämischer Patienten auch bei Harnstoffretention vitale Bedeutung besitzt.

The effect of urea on the threatened potassium toxicosis during uraemia

The toxicity of toxic doses of cardiac-active potassium ions shows marked variations during uremia. In isolated frog heart, the action of K⁺ is increased by urea. Since the action of K⁺ is presumably to lower the membrane potential, experiments were performed to find whether urea acts by altering the activity of the K⁺ or by affecting permeability. The action of urea was found to be a permeability effect, since under the influence of urea the K⁺ shows a greater tendency to migrate into the extracellular fluid. This relationship between K⁺ and urea has clinical significance; the present work shows that the haemodialysis of uremic patients is also vitally important in urea retention.