

komplexen  $(H_2B)Cu^{2+}(PYR)$  vor. Die Signale der Lösungen von Komplexen mit den übrigen Liganden, 2-Picolin, 2,6-Lutidin und 2,4,6-Collidin (Figur 3c), werden dagegen durch Zugabe von  $H_2B$  stark verändert (Figur 3d), was darauf hinweist, dass in der innersten Koordinationssphäre des  $Cu^{2+}$  wesentliche Veränderungen eintreten. Die Liganden PYR werden hier teilweise durch  $H_2B$  aus den Komplexen verdrängt. Ein Vergleich mit Figur 3a zeigt, dass sicher nicht ausschliesslich  $Cu^{2+}$ -*o*-Phenylen-diaminkomplexe gebildet werden. Das Signal Figur 3d dürfte demnach den Mischkomplexen  $(H_2B)Cu^{2+}(\text{Collidin})_p$  ( $p = 1,2$ ) entsprechen. Die Oxydationsgeschwindigkeit  $d[PHEN]/dt$  nimmt also bei Erhöhung der Konzentration an Mischkomplexen  $(H_2B)Cu^{2+}(PYR)$  zu. Je grösser das Vermögen, solche Mischkomplexe zu bilden, umso grösser ist die katalytische Wirkung der Komplexe  $Cu^{2+}(PYR)$ . Dieser aus den ESR-Messungen folgende Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Komplexbildung des Substrats  $H_2B$  mit dem «aktiven Zentrum» des katalytisch wirksamen Komplexes steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen kinetischer Untersuchungen<sup>18</sup>.

**Summary.**  $Cu^{2+}$ -complexes with different monodentate ligands PYR, e.g. pyridine, 2,4,6-collidine and imi-

dazole, catalyse the oxidation of *o*-phenylenediamine ( $H_2B$ ) to 3,5-dihydro-2-amino-3-iminophenazine (PHEN) by  $O_2$ . Investigation of the electron paramagnetic resonance during reaction gives interesting details on the function of  $Cu^{2+}$  as a catalyser. The formation of mixed complexes  $(H_2B)Cu^{2+}(PYR)$  and its influence on the reaction rate  $d[PHEN]/dt$  is demonstrated. In the rate-determining reaction,  $Cu^{2+}$  is reduced to  $Cu^+$ , which is reoxidized by  $O_2$ . During reaction the ratio  $[Cu^{2+}]/[Cu^+]$  is determined by means of e.p.r. measurements.

K. WÜTHRICH, H. LOELIGER  
und S. FALLAB

*Institut für anorganische Chemie, Universität Basel und  
Physiklabor der Ciba AG, Basel (Schweiz),  
27. August 1964.*

<sup>18</sup> Herr Prof. Dr. P. HUBER hat uns in entgegenkommender Weise die ESR-Apparatur zur Verfügung gestellt. Hierfür sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

## Die Isolierung von Cortisol-21-sulfat aus dem Urin von Cushingpatienten vor und nach totaler Adrenalektomie

In einer früheren Untersuchung an einem Nebennierengesunden Mann konnte gezeigt werden, dass Cortisol-21-sulfat in geringen Mengen im Blut und im Urin nachzuweisen war<sup>1</sup>. Das Verschwinden dieses Steroidkonjugates aus dem Urin während einer intravenösen Infusion von freiem Cortisol war überraschend und warf erneut die Frage nach den Bildungsorten von Cortisol-21-sulfat auf. Der Nachweis von Cortisol-21-sulfat im Urin total adrenalektomierter Cushingpatienten unter oraler Substitution mit freiem Cortisol, der im folgenden kurz dargestellt werden soll, lässt den Schluss zu, dass dieses Steroidderivat auch extraadrenal entsteht.

**Material, Methodik und Resultate.** Es standen drei Patienten zur Verfügung. Pat. No. 1: 32jähriger Mann. Totale Adrenalektomie 1962 wegen Cushingsyndrom. Pat. Nr. 2: 22jährige Frau. Ausgeprägtes Cushingsyndrom. Untersuchung vor und vier Wochen nach totaler Adrenalektomie im November 1963. Pat. Nr. 3: 30jährige Frau. Ausgeprägtes Cushingsyndrom. Untersuchung vor der Adrenalektomie. Es wurde jeweils ein kompletter 24-Stundenurin aufgearbeitet. Die Substitution der adrenalektomierten Patienten Nr. 1 und 2 bestand am Versuchstag in 200 mg Cortisol oral.

Die freien Steroide des Urins wurden durch Extraktion mit  $3 \times 300$  ml Chloroform eliminiert. Anschliessend erfolgte eine Extraktion mit  $2 \times 1$  Vol Äthylacetat:Butanol (3:1, v/v). Nach Einengen des Extraktes im Rotationsverdampfer wurde er im Vakuum unter einem Stickstoffstrom zur Trockne gebracht. Die erste Reinigung des Extraktes wurde mit Hilfe einer präparativen Papierchromatographie durchgeführt (Technik: Verteilen der Extraktmenge auf 10 bis 20 Bögen Schleicher &

Schüll Papier 2043 b in je 1 ml Äthylacetat:Butanol, 3:1. Bogenbreite 19 cm, Länge 42 cm. 15stündige Überlaufchromatographie im System  $S_1^2$ , Cortisol-21-sulfat als Standard parallel laufend).

Nach Lokalisation des Standards mittels UV-Kontaktphoto und Methylenblaureaktion wurde die entsprechende Urinzone mit 20% Methanol eluiert. Nach Vereinigung dieser Eluate erfolgte eine zweite Reinigung durch die gleiche präparative Papierchromatographie wie oben beschrieben. Die Extrakte waren jedoch schon so rein, dass sie nur auf zwei bis drei grosse Bögen verteilt zu werden brauchten. Die in dieser Weise gereinigten Extrakte wurden in jeweils 0,15 ml Äthylacetat:Butanol (3:1, v/v) aufgenommen und erneut in System  $S_1$  auf mehreren, 1,5 cm breiten Streifen chromatographiert (Laufzeit 13 h; Lokalisierung der Flecken mittels UV-Kontaktphoto und Methylenblau). Die  $R_f$ -Werte des Cortisol-21-sulfat-Standards und der unbekannten Substanz aus dem Urin waren identisch (0,33). Nach Elution der Urinzone wurde eine weitere Papierchromatographie im System Butylacetat - Toluol - Butanol /  $4n$   $NH_4 \cdot OH$ -Methanol (60:30:10/50:50, v/v)<sup>3</sup> angeschlossen. Nach einer Laufzeit von 3 h betrugen die  $R_f$ -Werte für den Standard 0,15, für die unbekannte Substanz aus dem Urin 0,20. Beide zeigten eine positive Methylenblaureaktion und ein UV-Kontaktphotogramm. Nach Elution und Eindampfen der Extrakte wurden sie in jeweils 2 ml  $H_2O$  aufgenommen.

<sup>1</sup> J. TAMM und K. D. VOIGT, in PASQUALINI und JAYLE, *Structure and Metabolism of Corticosteroids* (Academic Press, London-New York 1964), p. 103.

<sup>2</sup> J. TAMM, K. D. VOIGT und U. VOLKWEIN, *Steroids* 2, 271 (1963).

<sup>3</sup> J. R. PASQUALINI, R. ZELNIK und M. F. JAYLE, *Exper.* 16, 317 (1960).

Hiervon wurden an 0,1 ml die Absorptionsspektren in konzentrierter Schwefelsäure bestimmt. Die Maxima und Minima des Standards sowie der unbekannten Substanz lagen gleichförmig (Max. 240, 280, 390, 470, Min. 250, 340, 410  $m\mu$ , siehe <sup>2</sup>).

Die verbliebene Extraktmenge wurde mittels Dioxan<sup>4</sup> solvolysiert und im System Bush C rechromatographiert (Laufzeit 2,5 h bei 37°C. Rf-Werte für freies Cortisol und für die unbekannte Substanz 0,45). Nach Elution mit 80%igem Methanol erfolgte eine Chromsäureoxydation und eine Rechromatographie des Chloroformextraktes im System Formamid/Hexan-Benzol, 1:1 (Laufzeit ca. 3 h bei Zimmertemperatur. Lokalisation der Flecken mittels UV-Kontaktphoto und Zimmermannreaktion). Der Rf-Wert der unbekannten Substanz entsprach dem des Adrenosteronstandards (0,4). Nach erneuter Elution mit 80%igem Methanol wurden die Absorptionsspektren in konzentrierter Schwefelsäure gemessen, die mit dem des Adrenosteronstandards übereinstimmten (Max. 285, Min. 245  $m\mu$ ).

**Diskussion.** Mehrere Autoren<sup>5-7</sup> haben den Nachweis erbracht, dass die menschliche Nebennierenrinde Cortisol mit Sulfat konjugieren kann. Im Nebennierenvenenblut sowie in der V. hepatica des Menschen konnte OERTEL<sup>6</sup> jedoch nur sehr geringe Konzentrationen dieses Steroidkonjugates finden, die eine exakte Identifizierung nicht erlaubten. Wie die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, liess sich Cortisol-21-sulfat im Urin von Cushingpatienten sowohl vor wie nach einer totalen Adrenalectomie mit oraler Cortisolsubstitution identifizieren. Cortisol-21-sulfat kann daher beim Menschen mit Sicherheit auch extra-adrenal gebildet werden. Ob beim Menschen, ähnlich wie bei der Ratte<sup>8</sup>, neben der Leber auch die Nieren zur Konjugierung von Cortisol mit Sulfat imstande sind, muss noch offen bleiben.

**Summary.** Cortisol-21-sulphate has been identified in the urine of three patients with Cushing's syndrome before and after total adrenalectomy (substitution with 200 mg F orally). The identification was based upon the following data: Identical behaviour of the standard cortisol-21-sulphate and the unknowns in two different paper chromatographic systems; positive methylene blue reaction and UV-contact-photogram; identical absorption spectra in concentrated sulphuric acid; correspondence with free cortisol of the steroid moiety liberated by dioxan solvolysis and formation of adrenosterone following treatment with chromic acid. The data support evidence that cortisol-21-sulphate may originate not only from the human adrenal gland but also from extra-adrenal sources, presumably the liver<sup>9</sup>.

J. TAMM, U. VOLKWEIN  
und K. D. VOIGT

*Hormonlabor, II. Medizinische Universitätsklinik,  
Hamburg (Deutschland), 21. Juli 1964.*

- <sup>4</sup> S. E. COHEN und J. B. ONESON, J. biol. Chem. 204, 245 (1953).
- <sup>5</sup> M. C. LEBEAU und E. E. BAULIEU, Endocrinology 73, 832 (1963).
- <sup>6</sup> G. W. OERTEL, in PASQUALINI und JAYLE, *Structure and Metabolism of Corticosteroids* (Academic Press, London-New York 1964), p. 65.
- <sup>7</sup> G. L. COHN und V. DUNNE, 46th Meet. of the Endocrine Society, San Francisco (1964), Abstr. 117.
- <sup>8</sup> J. R. PASQUALINI und M. F. JAYLE, in PASQUALINI und JAYLE, *Structure and Metabolism of Corticosteroids* (Academic Press, London-New York 1964), p. 85.
- <sup>9</sup> **Dankvermerk.** Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt. Cortisol-21-sulfat wurde dankenswerterweise durch Herrn Dr. GARN, Schering-Berlin, zur Verfügung gestellt.

## Myoinositol Excretion in the Newborn Infant<sup>1</sup>

The 'inhibition assay'<sup>2</sup> principle has been used to develop a number of agar-diffusion microbial tests. Biological specimens of interest were compared by placing impregnated paper discs on the surface of an agar culture medium containing a microorganism whose growth is prevented by an appropriate inhibitor. These tests have been applied to human urine for the detection of metabolites associated with various diseases or with human development. In the process of testing the urine of new-born infants in this manner, employing *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by 5-fluorouracil ( $7 \cdot 10^{-6} M$ ), an activity was observed similar to that produced by cytosine. Infant urine prevented the inhibition of the yeast by 5-fluorouracil, whereas it failed to prevent such inhibition of *Bacillus subtilis*. In contrast uracil prevented 5-fluorouracil inhibition of both organisms. Subsequent paper chromatography of a sample of pooled new-born infants' urine clearly demonstrated that the unknown substance was neither uracil nor cytosine. The inhibition assay of urine specimens from fifty individual new-born infants showed that this activity was uniformly present. Similar investigations of individual healthy adults failed to reveal appreciable amounts. However, the activity was found

associated with generalized aminoaciduria due to different causes in a number of children. The above data led us to undertake the isolation and identification of the compound.

Preliminary purification by paper chromatography employing three different solvent systems, followed by ion-exchange chromatography led to a partially purified sample which, unlike purines and pyrimidines, absorbed only slightly in the ultraviolet. A comparison with the tables of Rf values compiled by FINK, CLINE, and FINK<sup>3</sup> indicated that the compound had properties similar to myoinositol. Additional chromatographic comparison of the unknown with an authentic sample confirmed the above observation. In a myoinositol-deficient culture medium, the unknown substance and myoinositol each

<sup>1</sup> This investigation was supported in part by Grant B-1960 and NB-03935 from the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service.

<sup>2</sup> R. GUTHRIE and H. TIECKELMANN, Proc. London Conf. Sci. Study of Mental Deficiency (May and Baker Ltd., Dagenham, England 1962), p. 672.

<sup>3</sup> K. FINK, R. E. CLINE, and R. M. FINK, Anal. Chem. 35, 389 (1963).