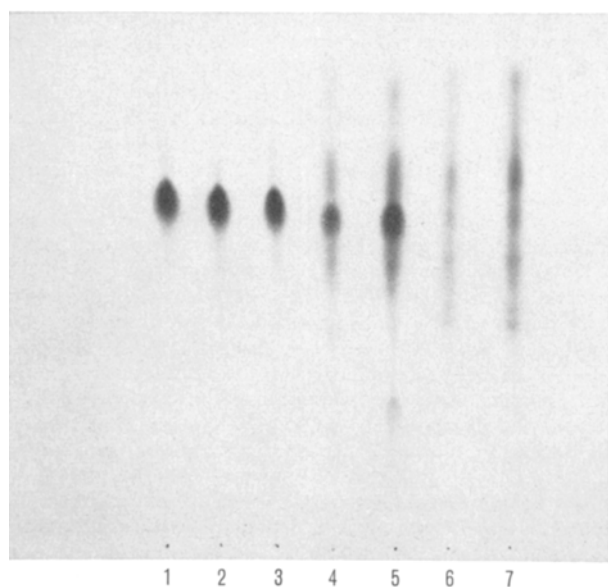




(4)/(5) Dünnschichtchromatographische Auftrennung des mittels NH_2OH abgebauten Cu^{2+} -Polymyxin-B-Komplexes: $1,5 \mu\text{M}$ CuCl_2 bzw. Polymyxin B $\cdot 5\text{HCl}$ wurden in 1 ml Wasser gelöst, mit NaOH pH 8,5 eingestellt und mit einem 18fachen NH_2OH -Überschuss versetzt, nach 8 h wurde durch Zufügen von EDTA die Reaktion abgebrochen (aufgetragen bei (4) 4 und bei (5) 8 μl). Zum Vergleich mit aufgetragen: (1) Polymyxin B allein; (2) Cu^{2+} -Polymyxin + EDTA; (3) Polymyxin B mit NH_2OH ; ((1), (2) und (3) standen ebenfalls je 8 h bei pH 8,5; aufgetragen je 4 μl). (6)/(7) mit H_2O_2 abgebauter Cu^{2+} -Polymyxin-Komplex³ (aufgetragen bei (6) 4 und bei (7) 8 μl); Steighöhe des Fließmittels – *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser = 50:20:6:24 – 16 cm vom Auftragepunkt. Platten: Kieselgel S-HR der Firma Macherey, Nagel & Co., Düren.

Zum Vergleich ist in der Figur auch eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der mit H_2O_2 erhaltenen Spaltprodukte dargestellt. Zum Teil weisen die Spaltprodukte in beiden Fällen ähnliche oder gleiche R_f -Werte auf, was darauf hindeutet, dass wenigstens teilweise dieselben Peptid-Bruchstücke gebildet werden. Auch mit NH_2OH erfolgt ein Abbau nur beim Vorliegen des Peptides als Metallkomplex. Die Degradation wurde wiederum bei pH 8,5 durchgeführt – die Komplexbildung ist dann vollständig⁸ –, allerdings war ein 18facher Überschuss an NH_2OH – bezogen auf den Cu^{2+} -Polymyxin-Komplex – notwendig, während mit H_2O_2 ein 6facher genügte³, auch die Reaktionszeit musste von 2 auf 8 h erhöht werden, damit ein gut nachweisbarer Abbau eintrat. Dies zeigt, dass NH_2OH im Cu^{2+} -Polymyxin-Komplex weniger reaktiv ist als H_2O_2 ⁹.

Summary. NH_2OH as well as H_2O_2 (previous results^{3,4}) decompose the Cu^{2+} complex of polymyxin B as can be shown with thin layer chromatography; the spots of the peptide fragments of both reactions were compared.

C. FLIERL, H. SIGEL
und H. ERLNMEYER

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel (Schweiz), 28. September 1966.

⁸ H. BRINTZINGER, *Helv. chim. Acta* 44, 744 (1961).

⁹ C. FLIERL dankt der Firma Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, für die Gewährung einer Unterstützung. Für die Überlassung von Polymyxin B sind wir den Herren Dr. K. Vögler, Dr. R. O. Studer und W. Lergier (Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel) dankbar.

Direct Metabolism of 7α - ^3H -DHEA-3- ^{14}C -Glucuronoside

Recently, the metabolism of C_{19} -steroid 17β -glucuronoside without cleavage of the glycosidic linkage has been demonstrated^{1,2}. The present communication deals with the direct metabolism of C_{19} -steroid 3β -glucuronoside.

After i.v. administration of 0.32 μg Na - 7α - ^3H - 3β -hydroxyandrost-5-en-17-one (dehydroepiandrosterone) 3β - ^{14}C -glucuronoside with 2,684,000 dpm ^3H and 1,320,000 dpm ^{14}C ($^3\text{H}/^{14}\text{C} = 2.02$), prepared biosynthetically³ and chromatographically pure, the 24 h urine of a 51-year-old female subject was assayed for labelled C_{19} -steroid conjugates. Employing anion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50⁴ and thin layer chromatography on silica gel G in chloroform-methanol-ammonia (20:5:0.2 v/v), 12.55% of injected ^3H -activity was obtained in the form of double-labelled steroid glucuronosides with a $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio of 2.10. By rechromatography of this fraction on silica gel G in chloroform-methanol-ammonia (10:10:0.2 v/v), on paper in hexane-ethyl acetate-acetic acid-water (80:120:60:140 v/v)⁵ and dichloroethane-*t*-butanol-acetic acid-water (15:5:6:14 v/v)⁶, the 3-glucuronosides of dehydroepiandrosterone, androst-4-en-3,17-dione (androstendione), 17β -hydroxy-androst-4-en-3-one (testosterone), 3α -hydroxy- 5α -androst-17-one

(androsterone), 3β -hydroxy- 5α -androst-17-one (epiandrosterone) + 3α -hydroxy- 5β -androst-17-one (etiocolanolone), as well as a fraction of polar glucuronosides could be isolated; all fractions exhibiting a practically unchanged $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio (Table I). Following the enzymic hydrolysis of the various fractions with β -glucuronidase, the liberated steroids were chromatographed on paper in propylene glycol/methylcyclohexane⁷ and propylene glycol/toluene⁸. In addition to the above mentioned C_{19} -steroids, androst-5-en- 3β , 17β -diol (androstendiol), 3β , 16α -dihydroxy-androst-5-en-17-one (16α -hydroxydehydroepi-

¹ P. ROBEL, R. EMILIOZZI, and E. E. BAULIEU, *J. biol. Chem.* 241, 20 (1966).

² P. ROBEL, R. EMILIOZZI, and E. E. BAULIEU, *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* 261, 4886 (1965).

³ U. GOEBELSMANN, E. DICZFALUSY, J. KATZ, and M. LEVITZ, *Steroids* 6, 859 (1965).

⁴ G. W. OERTEL, E. KAISER, and W. ZIMMERMANN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 331, 77 (1963).

⁵ J. J. SCHNEIDER and M. L. LEWBART, *Recent Prog. Horm. Res.* 15, 201 (1959).

⁶ K. DAHM and H. BREUER, *Acta Endocr. Copenh.* 52, 43 (1966).

⁷ K. SAVARD, *J. biol. Chem.* 202, 457 (1953).

⁸ A. ZAFFARONI, *Recent Prog. Horm. Res.* 8, 51 (1953).

androsterone) and androst-5-en-3 β ,16 α ,17 β -triol (androstentriol) were separated from the polar glucuronoside fraction. For further characterization of the individual compounds, all steroids were diluted with the appropriate

Table I. C₁₉-steroid glucuronosides, isolated from 24 h urine

3-glucuronoside of	dpm ³ H	dpm ¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C
Dehydroepiandrosterone	7,850	3,760	2.09
Testosterone	27,100	13,400	2.02
Androsterone	7,700	3,670	2.10
Etiocolanolone	58,180	27,800	2.10
Epiandrosterone			
Androstendione	6,100	3,020	2.02
Androstandione			
Etiocolandione			
Polar steroids	124,100	58,100	2.14

Table II. Specific activity of free steroids after enzymic hydrolysis of 3-glucuronosides and reverse isotope dilution

Steroid	Specific activity (dpm/ μ g) after chromatography			
	Free		2,4-DNPH-derivative	
	System A	B	C	D
Dehydroepiandrosterone		394	380	383
Androstendione		35.8	33.2	30.4
Testosterone		119	98.6	98.2
Androsterone		156	145	142
Etiocolanolone		36.6	34.5	35.0
Epiandrosterone		429	415	420
Androstendiol	178		175 ^a	
16 α -Hydroxy-dehydroepiandrosterone	156	150	144	148
Androstentriol	20.0		18.5 ^a	

A = paper chromatography in propylene glycol/toluene; B = paper chromatography in propylene glycol/methylcyclohexane; C = thin layer chromatography on silica gel G in chloroform-dioxane (94:6 v/v); D = thin layer chromatography on silica Gel in chloroform.
^a As free compound.

non-labelled standard and purified to constant specific activity, the steroid concentration being quantitated by means of the 2,4-dinitrophenylhydrazine reaction⁹ (ketonic steroids) or the OERTEL-EIK-NES reaction¹⁰ (androstendiol and androstentriol) (Table II). The former procedure not only allowed a repeated chromatography and ensuing quantitation of the coloured derivative but provided the separation of traces of 5 α -androst-3,17-dione and 5 β -androst-3,17-dione (androstandione and etiocolandione) from the androstendione fraction.

From these results, it becomes evident that the direct metabolism of C₁₉-steroid glucuronosides, such as reduction in ring A, is not limited to 17 β -glucuronosides but may occur with 3 β -glucuronoside also. Hence, the conversion of dehydroepiandrosterone 3 β -glucuronoside to the glucuronosides of androsterone or etiocolanolone necessarily involves the intermediate formation of 3,5-dienol glucuronoside(3), as reflected by the isolation of androstendione and testosterone and demonstrated by other authors¹¹. Comparing the direct metabolism of dehydroepiandrosterone glucuronoside with that of dehydroepiandrosterone sulphate or sulphatide respectively¹², it seems noteworthy that the mode of conjugation does not seriously affect the metabolic changes in the steroid moiety, at least with regard to metabolites formed¹³.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass beim Menschen Steroide in Form ihrer 3-Glucuronoside metabolisiert werden können, und zwar in ähnlicher Weise wie dies schon für entsprechende 17-Glycoside nachgewiesen worden ist.

P. KNAPSTEIN, F. WENDELBERGER,
and G. W. OERTEL

Abteilung für Experimentelle Endokrinologie und Chirurgische Klinik, Universität des Saarlandes, 665 Homburg (Saar, Germany), July 19, 1966.

⁹ L. TREIBER and G. W. OERTEL, Z. klin. Chem., in press (1966).

¹⁰ G. W. OERTEL and K. B. EIK-NES, Analyt. Chem. 31, 98 (1959).

¹¹ H. WOTIZ and W. H. FISHMAN, Steroids 1, 211 (1963).

¹² G. W. OERTEL and P. KNAPSTEIN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., in press 1966.

¹³ These investigations were supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

Role of Bacterial Endotoxins in Intestinal Ischemic (SMA) Shock

Recently, a hypothesis has been advanced that impairment of reticulo-endothelial system (RES) function with overwhelming endotoxemia is the cause of experimental irreversible (refractory) shock¹. Evidence in support of this thesis is that RES blockade by different means has been demonstrated to induce a loss of endotoxin tolerance² and to render animals more susceptible to bacterial endotoxins³. In addition, injection of various types of gram-negative bacterial cultures caused an increased

incidence of mortality in hemorrhagic and tourniquet shock⁴. These latter investigators also demonstrated that rabbits recovering from reversible hemorrhagic shock

¹ J. FINE, E. D. FRANK, H. A. RAVIN, S. H. RUTENBERG, and F. B. SCHWEINBURG, New Engl. J. Med. 260, 214 (1959).

² B. W. ZWEIFACH, B. BENACERRAF, and L. THOMAS, J. exp. Med. 106, 403 (1957).

³ R. A. GOOD and L. THOMAS, J. exp. Med. 96, 625 (1952).

⁴ E. W. FRIEDMAN, F. B. SCHWEINBURG, Y. YASCHAR, and J. FINE, Am. J. Physiol. 189, 197 (1957).