

Séparation par chromatographie
sur papier des 21 sulfates de corticostéroïdes

Différentes études ont été faites sur la séparation chromatographique des sulfates et des glucosid uronates de stéroïdes¹⁻⁵, mais il n'existe encore aucune étude systématique sur la séparation des 21-sulfates de corticostéroïdes.

La synthèse des ester-sulfates de corticostéroïdes a été effectuée par action du complexe SO₃-Pyridine en milieu pyridinique⁶. Nous avons isolé les sulfates de désoxycorticostérone (DOC), corticostérone (B), 11-dehydrocorticostérone (A), cortisol (F), cortisone (E) et 17 α -hydroxy-11 désoxycorticostérone (S), sous forme de sels de pyridinium⁷ et le sulfate de désoxycorticostérone sous forme de sel sodique⁸.

Les ester-sulfates ont été cristallisés dans le méthanol-éther.

Nous avons ensuite procédé à l'étude de la séparation chromatographique sur papier et nous avons mis au point les deux systèmes suivants:

(I) Ac. But. 60-Tol. 30-But. 10/HONH₄ 4N. 50-Met. 50⁹;
(II) Ac. But. 50-Tol. 40 But. 10/Ac. Acet. 10% 50-Met. 50.

Parallèlement, nous avons réalisé une étude comparative avec les systèmes:

(III) Al. Isoamylique – Hexane/HONH₄ conc. 10; (IV) Ac. But. – But/Ac. Form. – Eau¹.

Révélation des sulfates de corticostéroïdes. Le stéroïde libéré et l'ion sulfate libéré après hydrolyse ont été ensuite révélés par des réactions caractéristiques.

Nous avons constaté que les 21 sulfates de corticostéroïdes ne réduisent pas le bleu de tétrazolum; après hydrolyse cette réaction devient positive et l'ion sulfate libéré donne la réaction au rhodizonate de Sodium^{11,3}.

Pour hydrolyser les sulfates de corticostéroïdes directement sur le papier, nous avons modifié d'une part la technique de COHEN et ONESON¹² en opérant de la façon suivante: le chromatogramme est plongé dans un mélange d'acide trichloracétique à 5% P/v dans le dioxane et chauffé pendant 15 min à 90°C; d'autre part, nous avons appliqué la technique d'hydrolyse au dioxane-acide chlorhydrique³.

Nous avons également utilisé pour révéler les taches des estersulfates une méthode au bleu de méthylène mise au point dans le laboratoire par CRÉPY¹³.

Nous avons appliqué aux stéroïdes libres et aux sulfates les méthodes de révélation du groupe Δ_4 3C = 0:absorption à 254 m μ et fluorescence en lumière de Wood après chauffage en milieu sodique, ainsi que la réaction de fluorescence par action de l'acide phosphorique à 15%, également en lumière de Wood, nous avons constaté que

toutes ces réactions étaient positives avec les sulfates de corticostéroïdes ainsi qu'avec les stéroïdes libres correspondants.

Résultats. Le Tableau suivant montre les R_f de ces six sulfates par rapport au sulfate de désoxycorticostérone dans les différents systèmes, ainsi que celui du sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA) et la vitesse horaire de migration à 24°C $\pm$ 1°.

Conclusions

- 1° Les systèmes décrits permettent de réaliser la séparation de 21-sulfates de corticostéroïdes par chromatographie sur papier.
- 2° L'hydrolyse de ces corticostéroïdes conjugués est obtenue avec les procédés étudiés.
- 3° Les 21-sulfates de corticostéroïdes ne donnent pas la réaction au bleu de tétrazolum, cette réaction devient positive après hydrolyse directe sur le chromatogramme.
- 4° Les méthodes générales de révélation sur papier des sulfates de stéroïdes sont applicables aux 21-sulfates de corticostéroïdes.
- 5° Nous avons constaté que la migration des ester-sulfates de désoxycorticostérone et de pyridinium et de l'ester-sulfate de cortisone et de pyridinium est respectivement la même que celle des ester-sulfates de désoxycorticostérone et de sodium et de l'ester-sulfate de cortisone et de sodium.

¹ M. L. LEWBART et J. J. SCHNEIDER, *Natur* 176, 1175 (1955).
² I. E. BUSCH, *Biochem. J.* 67, 23 (1957).
³ J. J. SCHNEIDER et M. J. LEWBART, *J. biol. Chem.* 222, 787 (1956).
⁴ G. CAVINA et L. TENTORI, *Clin. chim. Acta* 3, 160 (1958).
⁵ J. J. SCHNEIDER et M. J. LEWBART, *Rec. Proc. Horm. Res.* 15, 201 (1959).
⁶ A. E. SOBEL et P. E. SPOERRI, *J. Amer. chem. Soc.* 63, 1259 (1941).
⁷ Les caractéristiques chimiques et physiques de ces sulfates feront l'objet d'une note ultérieure.
⁸ Nous remercions vivement le D^r L. H. SARETT (Merck & Co. Inc., Rahway, New Jersey) d'avoir eu l'amabilité de nous procurer du sulfate de cortisone et de sodium.
⁹ Ac. But.: Acétate de Butyle; Tol.: Toluène; But.: Butanol; Ac. Acet.: Acide Acétique; Met.: Méthanol; Ac. For.: Acide Formique.
¹⁰ Système de référence ⁴, Modification O. CRÉPY, Communication personnelle.
¹¹ D. P. BURMA, *Analyt. chim. Acta* 9, 513 (1953).
¹² S. L. COHEN et I. B. ONESON, *J. biol. Chem.* 204, 245 (1953).
¹³ O. CRÉPY et O. JUDAS, *Rev. franç. Et. clin. biol.*, mars 1960.

Conjugués	Systèmes chromatographiques				
	I <i>R_t</i> _{SO₄DOC} <i>R_t</i> _{SO₄B}		II <i>R_t</i> _{SO₄DOC}	III <i>R_t</i> _{SO₄DOC}	IV <i>R_t</i> _{SO₄DOC}
Sulfate de DOC et de Py	1	2,50	1	1	1
Sulfate de DOC et de Na	1	2,50	1	1	1
	1,20 cm/h		0,51 cm/h	1,3 cm/h	0,69 cm/h
Sulfate de A et de Py	0,36	0,92	0,54	0,61	0,33
Sulfate de B et de Py	0,40	1	0,58	0,70	0,37
Sulfate de S et de Py	0,30	0,78	0,50	0,78	0,43
Sulfate de E et de Py	0,16	0,42	0,25	0,46	0,18
Sulfate de E et de Na	0,16	0,42	0,25	0,46	0,18
Sulfate de F et de Py	0,25	0,55	0,35	0,58	0,25
Sulfate de DHEA et de Na	1,15	2,87	1,13	1	1

6° Il est à signaler que l'ester-sulfate de cortisone est plus polaire que l'ester-sulfate de cortisol dans tous les systèmes essayés. Il en est de même pour le sulfate de 11 déhydrocorticostérone qui est plus polaire que le sulfate de corticostérone, donc la polarité de ces sulfates est inversée par rapport à celle du stéroïde libre.

J. R. PASQUALINI, R. ZELNIK et M. F. JAYLE

Laboratoire de chimie biologique, Faculté de Médecine, Paris (France), le 1^{er} avril 1960.

Summary

The 21-sulfates of the six following corticosteroids: desoxycorticosterone (DOC), corticosterone (B), 11-dehydrocorticosterone (A), cortisol (F), cortisone (E), and 17 α hydroxy-11-desoxycorticosterone (S), were prepared. Their separation by four different paper chromatographic systems was investigated. A method for detection of the spots is described.

On the Thermogenic System of Hibernants¹

It is generally assumed that heat production in the hibernant during arousal comes from respiration and from muscular activity². It has been shown that the ATP stores of the hibernator become depleted during arousal³. This is interpreted as a kind of ATPase action of the tissues either of the myosin type or of another.

Studies in this laboratory have been directed in part to assess the role, if any, of ATPase and acylphosphatase in thermogenesis in the awakening hibernator. The purpose of this report is to publish results leading to a theory of thermogenesis in the hibernant.

The tissue preparations from mature hamsters were solubilized in 9.0 volumes of 0.5% triton X-100-0.5 mM EDTA and the supernate used after centrifugation 30 min at 25000 $\times$ g. Acylphosphatase was measured by the method of GRISOLIA *et al.*⁴ and ATPase by the method of LOWRY *et al.*⁵. The tissue preparations of normal and hibernating hamsters studied were, from the brain: brain stem, cerebellum, cerebral cortex, hippocampal region, and thalamic-hypothalamic region; and from the carcass: heart, liver, and gracilis muscle. Each set of data represents the values obtained from 12 to 14 animals.

For the purposes of this discussion it is sufficient to summarize the data in Tables I and II. More detailed reports will appear. It is seen that acylphosphatase is much less sensitive to lowering temperature than is the ATPase. In spite of an apparently greater relative increase of ATPase in the hibernator than of acylphosphatase, the latter enzyme is much more active at the hibernating temperature used in these studies (0–2°C).

On the basis of data published on the respiration and heat production of hibernators⁷, and on an assumed – 12 Kcal mole⁻¹ as the ΔH of hydrolysis of acylphosphates and – 8 Kcal mole⁻¹ as ΔH for ATP⁸, Table III was constructed.

It is seen from this that ATPase is not sufficient even to maintain the homeothermic state of the hibernator at an environmental temperature near 0°C. Much less is it capable of initiating the temperature rise which occurs early in arousal. Acylphosphatase, on the other hand, is more than adequate for this service. The fact that it may be much more active than necessary near 0°C is not an impediment to this concept of its function. It is not difficult to conceive cases where the enzyme would operate *in vivo* at lower than maximum activity, as is the normal

case with most enzymes. The enzyme measured in these studies represents the total amount of active enzyme. It seems to be distributed between the cellular particles and the nonsedimentable portion in nonsolubilized preparations.

The most probable substrate for acylphosphatase *in vivo* is 1,3-diphosphoglyceric acid which may arise from the cleavage and oxidation of fructose-1,6-diphosphate, from ATP and 3-phosphoglycerate, and from phosphocreatine and 3-phosphoglycerate⁹, all of which pathways seem to operate in the hibernating hamster.

The relatively higher activity of acylphosphatase in the brain, according to the concept enunciated here, would be consistent with the fact that the head parts of the hibernator warm sooner and faster than the hind parts². It is suggested that acylphosphatase plays its role in two stages: first it releases energy stored as phosphocreatine and ATP which process would be sufficient to warm the animal to the point where glycolysis and respiration become important in thermogenesis, and then it would act as an energy discharging system after glycolysis resumed¹⁰.

L. C. MOKRASCH

Neurochemistry Laboratory, University of Kansas Medical Center, Kansas City, April 5, 1960.

Table I. Acylphosphatase

Tissue	0°C Normal Activity ^a	Activity ratio 38°C/0°C		Activity ratio Hibernator /Normal	
		Hiber- nator	Normal	38°C	0°C
5 Brain Zones	4.16	5.4	5.9	1.03	1.13
3 Carcass Zones	2.51	9.2	9.2	1.04	1.02

^a Average, $\mu M \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ tissue. Temperatures are those at which the assay was performed

Table II. Adenosinetriphosphatase

Tissue	0°C Normal Activity ^a	Activity ratio 38°C/0°C		Activity ratio Hibernator /Normal	
		Normal	Hiber- nator	38°C	0°C
5 Brain Zones	0.048	110	90	0.94	1.17
3 Carcass Zones	0.050	150	89	1.30	1.76

^a Average, $\mu M \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ tissue. Temperatures are those at which the assay was performed.

Table III. Summary of Normal and Potential Thermogenesis in the Hamster

Hibernating (5°C): 0.09 to 0.14 Kcal h ⁻¹ kg ⁻¹
Calculated for 1 st h of arousal: 5 to 7 Kcal h ⁻¹ kg ⁻¹
ATPase (0°C): 0.02 to 0.04 Kcal h ⁻¹ kg ⁻¹
Acylphosphatase (0°C): 3 to 4 Kcal h ⁻¹ kg ⁻¹
Acylphosphatase (10°C): 5 to 6.5 Kcal h ⁻¹ kg ⁻¹

¹ This investigation was supported by P. H. S. grant B-2133 from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness.

² C. P. LYMAN and P. O. CHATFIELD, *J. exp. Zool.* **114**, 491 (1950).

³ M. L. ZIMNY and R. GREGORY, *Amer. J. Physiol.* **195**, 233 (1958).

⁴ S. GRISOLIA, J. CARAVACA and B. K. JOYCE, *Biochem. biophys. Acta* **29**, 432 (1958).

⁵ O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS, M.-L. WU, W. S. HIXON, and E. J. CRAWFORD, *J. biol. Chem.* **207**, 19 (1954).

⁶ C. KAYSER, *C. R. Soc. Biol.*, Paris **153**, 167 (1959).

⁷ C. P. LYMAN, *J. exp. Zool.* **169**, 55 (1948).

⁸ E. A. ROBBINS and P. D. BOYER, *J. biol. Chem.* **224**, 121 (1957).

⁹ O. CORI, A. TRAVERSO-CORI, M. LAGARRIQUE, and F. MARCUS, *Biochem. J.* **70**, 633 (1958).

¹⁰ I. HARARY, *Biochem. biophys. Acta* **29**, 647 (1958).