

Summary. Investigations of the chemical changes in fats subjected to cathode rays (100 Mrad) indicated the formation of shorter fatty acid chains. Besides splitting off the terminal methyl groups, especially the medial C-C-bonds are readily split and saturated and unsaturated C₆-C₁₁-fragments are formed. The double bond is relatively resistant, but the C-C-bond near the double bond is easily fractured.

H. LÜCK und R. KOHN

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München, 2. Dezember 1960.

Isolement dans le plasma veineux périphérique et surrénalien de l'ester-sulfate de 5-androstène 3 β -ol 7,17-dione

La 5-androstène 3 β -ol 7,17-dione (7-oxo-DHEA) a été déjà isolée¹ et identifiée² dans les urines humaines sans que les modalités de sa conjugaison aient été définies. Nous rapportons ici l'isolement de ce stéroïde dans le plasma veineux périphérique et surrénalien d'une malade porteuse d'une tumeur virilisante surrénalienne³, dans la tumeur surrénalienne d'une autre malade, et dans le

en milieu acétique⁶. Une substance ayant le comportement chromatographique et chimique de l'ester-sulfate de 7-oxo-DHEA (S-7-oxo-DHEA) de synthèse tel qu'il est décrit plus loin, a été mis en évidence. Après solvolysé⁷ des mêmes éluats acétono-alcooliques de la colonne de florisol, les stéroïdes libres ont été chromatographiés sur papier dans le système hexane-benzène (1-1)-propanediol; on a mis en évidence un composé réagissant avec le métadinitrobenzène, bleu en lumière de Wood après action du Sb Cl₃, absorbant sur papier à 250 m μ et ayant la polarité de la 7-oxo-DHEA de synthèse. Son acétate rechromatographié dans le système heptane-2-phénoxyéthanol se comportait comme celui de 7-oxo-DHEA.

Au total, la solubilité initiale dans le méthanol à l'exclusion du benzène et du dichlorométhane, les comportements en chromatographie d'adsorption et de partage, la réaction au bleu de méthylène et la solvolysé par l'acétate d'éthyle témoignent de la sulfo-conjugaison du stéroïde. Celui-ci d'après l'absorption UV, les réactions de coloration, sa polarité et celle de son acétate, ne peut être que de la 7-oxo-DHEA. La conjonction de toutes ces données, compte tenu de la grande sélectivité des systèmes de chromatographie employés, constitue une identification qui, pour être incomplète, semble cependant suffisante. Les quantités trop faibles de produit ne nous ont pas

	Cas 1 virilisme tumeur surrénalienne	Cas 2 virilisme tumeur surrénalienne	Cas 3 syndrome de Cushing carcinome surrénalien	Cas 4 virilisme	Cas 5 hirsutisme	Cas 6 hirsutisme + ACTH
<i>Tumeur surrénalienne^a</i>						
S-DHEA	120					
S-7-oxo-DHEA	+ ^o					
<i>Sang exsudé de la surréna^b</i>						
S-DHEA	500					
S-7-oxo-DHEA	+					
<i>Sang veineux surrénalien^b</i>						
S-DHEA	535					
S-7-oxo-DHEA	100					
<i>Sang veineux périphérique^b</i>						
S-DHEA	340					
S-7-oxo-DHEA	60	+ ^o				
<i>S-DHEA et S-7-oxo-DHEA</i>						
^a $\mu\text{g/tumeur}$						
^b $\mu\text{g}/100 \text{ ml plasma}$						
⁺ = détecté, non mesuré ^o = identité probable, mais non vérifiée						

plasma veineux périphérique d'autres sujets. Nous démontrons la sulfoconjugaison de ce stéroïde. C'est le quatrième ester-sulfate de 17-CS isolé dans le sang⁴.

Chez une malade porteuse d'une tumeur cortico-surrénalienne, 40 ml de plasma périphérique et 30 ml de plasma veineux surrénalien ont été étudiés ainsi que 15 ml de sang exsudé de la tumeur pendant les manipulations précédant son broyage. Après lyophilisation ils ont été extraits au Kumagawa par l'hexane, le benzène et le dichlorométhane et, dans cette fraction contenant des graisses et des stéroïdes libres, nous n'avons pas trouvé de 7-oxo-DHEA. Chaque résidu a été extrait ensuite par le méthanol; cette fraction alcoolique a été chromatographiée sur florisol et les éluats acétono-méthanoliques et acétono-éthanoliques (98-2) ont été étudiés par chromatographie sur papier dans les systèmes B 5-10⁴ et B 23-9 (non publié).

Les chromatogrammes ont été traités par le réactif de Zimmermann, le réactif au bleu de méthylène pour les esters-sulfates selon CRÉPY⁵ et le trichlorure d'antimoine

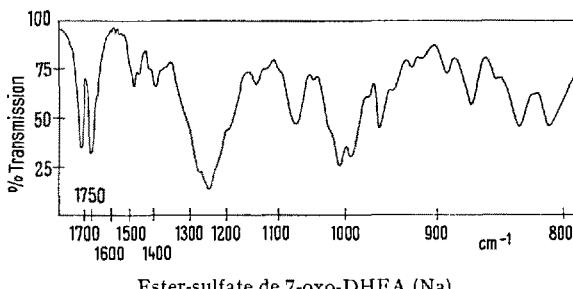
- 1 S. LIEBERMAN, K. DOBRINER, B. R. HILL, L. F. FIESER et C. P. RHOADS, J. biol. Chem. 172, 263 (1948).
- 2 D. K. FUKUSHIMA, A. D. KEMP, R. SCHNEIDER, M. B. STOKEM et T. F. GALLAGHER, J. biol. Chem. 210, 129 (1954).
- 3 E. E. BAULIEU, C. R. Acad. Sci. 215, 1421 (1960).
- 4 E. E. BAULIEU, J. clin. Endocrinol. Metab. 20, 900 (1960).
- 5 O. CRÉPY et O. JUDAS, Rev. Fse. Et. Clin. Biol. 5, 284 (1960).
- 6 R. NEHER et A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 34, 2278 (1951).
- 7 S. BURSTEIN et S. LIEBERMAN, J. biol. Chem. 233, 331 (1959).
- 8 J. R. BILLETER et K. MIESCHER, Helv. chim. Acta 31, 629 (1948).
- 9 H. B. KAGAN et J. JACQUES, Bull. Soc. Chim. Fr. 1960, 1551.
- 10 K. DOBRINER, E. R. KATZENELLENBOGEN et R. N. JONES, Infrared Adsorption Spectra of Steroids. An Atlas (Interscience Inc., New York 1953).
- 11 R. EMILIOZZI, Bull. Soc. Chim. Fr. 1960, 911.
- 12 S. WEINMANN, Pastille de bromure de potassium. Appareil PEC 13.
- 13 S. BERGSTRÖM et O. WINTERSTEINER, J. biol. Chem. 141, 597 (1941); 143, 503 (1942); 145, 509 (1942).
- 14 T. F. GALLAGHER, J. clin. Endocrinol. Metab. 18, 937 (1958).
- 15 D. K. FUKUSHIMA, T. F. GALLAGHER, W. GREENBERG et O. H. PEARSON, J. clin. Endocrinol. Metab. 20, 1234 (1960).

permis de le purifier suffisamment pour obtenir un spectre IR interprétable avec sécurité.

Le Tableau rapporte les résultats obtenus chez six patientes. Dans un cas de tumeur maligne surrénalienne, nous avons identifié avec certitude le sulfate de 7-oxo-DHEA dans la tumeur. Il était aussi vraisemblablement présent dans les deux autres tumeurs (identification par une chromatographie). Les trois autres malades sont atteintes de virilisme. Chez des femmes normales, avec des prises d'essai de plasma du même ordre de grandeur, nous n'avons pas détecté de S-7-oxo-DHEA.

Composés de référence. La 7-oxo-DHEA a été obtenu à partir de son acétate ($F = 183-185^\circ$)⁸ par saponification par la potasse dans le t-butanol. Cet acétate provenait de l'oxydation de l'acétate de DHEA par le chromate de potassium en milieu anhydride acétique-acide acétique⁹. Le spectre IR de la 7-oxo-DHEA était conforme à celui de DOBRINER et al.¹⁰.

Le S-7-oxo-DHEA a été préparé par la technique de l'un de nous¹¹. Son spectre IR est publié ci-contre (Fig.)¹².



Ester-sulfate de 7-oxo-DHEA (Na)

7-oxo-DHEA: $F = 232-235^\circ$
 théorique C% 75,47 H% 8,66 pour $C_{19}H_{26}O_3$
 trouvé C% 75,93 H% 8,80
 S-7-oxo-DHEA (sel de sodium): $F = 162-165^\circ$
 théorique C% 51,57 H% 6,55 pour $C_{19}H_{25}O_6SNa,2H_2O$
 trouvé C% 52,10 H% 6,40

Commentaires. L'isolement du S-7-oxo-DHEA pose le problème de son origine. En premier lieu, la 7-oxo-DHEA ne semble pas un artefact d'oxydation¹³; en effet, il n'y a pas de parallélisme quantitatif entre la DHEA et la 7-oxo-DHEA aussi bien dans les résultats rapportés ici que dans nos mesures urinaires; de plus, l'amphénone et le SU-4885 font varier à l'inverse les deux stéroïdes dans les urines^{14,15}.

L'isolement de la 7-oxo-DHEA dans le sang d'une tumeur surrénalienne et dans le tissu tumoral lui-même peut indiquer, confirmant l'opinion de GALLAGHER¹⁴, la biosynthèse surrénalienne de la 7-oxo-DHEA. Pourtant, après administration de DHEA par voie orale ou intramusculaire à des adultes et enfants normaux, nous avons isolé de la 7-oxo-DHEA dans les urines, ce qui tend à en faire un produit du métabolisme de la DHEA. En réalité, peut-être la surrénaïale partage-t-elle avec d'autres parenchymes la capacité d'oxyder la DHEA sur le carbone 7.

Signalons que dans aucun des milieux étudiés, nous n'avons trouvé de 7-oxo-DHEA libre ou glucuro-conjuguée; nous l'avons toujours isolée directement à l'état de sulfate ou après une solvolysé par l'acétate d'éthyle⁷.

Summary. The isolation of the ester-sulfate of 5-androstan-3 β -ol 7,17-dione is described. This sulfate has been found in the peripheral venous blood plasma of several virilized women. Moreover, it has been isolated in 3 adrenal tumors and in the adrenal venous plasma of one of them.

E. E. BAULIEU, R. EMILIOZZI et C. CORPECHOT

Laboratoire d'Endocrinologie, Chimie Médicale, Faculté de Médecine, Paris (France), le 12 décembre 1960.

Studies on Cation Transport in Cold-Stored Human Erythrocytes.

I. Effect of Aldosterone on Sodium and Potassium Transfer

An increase of the sodium content of the erythrocytes has recently been demonstrated by one of us¹⁻³ in several diseases with oedema, in essential hypertension and in one case of primary hyperaldosteronism. This increase has been confirmed, in the oedematous states, by RIECKER and BUBNOFF⁴.

Since all these diseases are characterized by an increased secretion of aldosterone, a direct effect of the hormone on cation transport through the membrane of erythrocytes could explain the increased sodium content of the cells in these conditions.

A direct action of desoxycorticosterone (DOC) on cation transport in cold-stored erythrocytes has already been demonstrated by SHERWOOD JONES^{5,6}: the hormone blocked the Na and the water output from human red cells incubated at 37°C after 6 days of cold storage.

Further experiments with aldosterone *in vitro* were carried out more recently. SULSER and WILBRANDT⁷ found that aldosterone (10^{-7} g/cm³) has not measurable effect on sodium and potassium transfer through the membrane of cold-stored human erythrocytes incubated at 37°C. On the contrary, FRIEDMAN and FRIEDMAN⁸ have been able to block with aldosterone (10^{-7} g in 5 cm³) the Na output which takes place in human red cells incubated at 37°C after 2-24 h of cold storage.

The experiments described in this paper were carried out to study if aldosterone modifies the cation transport in human cold-stored erythrocytes incubated at 37°C.

Blood from human subjects was drawn, stored and handled as previously described⁹. After 6 days of cold storage, eight 5 ml aliquots of each sample of blood were incubated in a Dubnoff shaker at 37°C, moving at the rate of 50 oscillations/min to avoid sedimentation of red cells. Aldosterone racemate (10 μ in 0.1 ml of ethanol) was added to 4 of the 8 samples before incubation; only 0.1 ml of ethanol was added to the remaining samples. Sodium and potassium were measured in the plasma with a Beckman DU flame photometer before and after incubation; sodium output and potassium uptake by the cells was calculated by difference, according to the method of KAHN and ACHESON¹⁰. The volume of cells was measured by means of hematocrit determinations before and after incubation, in duplicate.

The Table shows that erythrocytes removed measurable quantities of potassium from the incubation medium and lost measurable quantities of sodium in the same medium during incubation. Aldosterone had no measurable effect ($P > 0.05$) on these changes under the conditions of the experiment.

- 1 G. D'AMICO, Amer. J. Med. Sci. 236, 156 (1958).
- 2 G. D'AMICO and M. BOSISIO, in print.
- 3 G. D'AMICO and M. BOSISIO, in print.
- 4 G. RIECKER, M. V. BUBNOFF, Klin. Wschr. 36, 556 (1958).
- 5 E. SHERWOOD JONES, Nature 176, 269 (1955).
- 6 E. SHERWOOD JONES, Exper. 14, 72 (1958).
- 7 F. SULSER and W. WILBRANDT, Helv. physiol. Acta 15, C37 (1957).
- 8 S. M. FRIEDMAN and C. L. FRIEDMAN, Exper. 14, 452 (1958).
- 9 G. D'AMICO and P. P. FOÀ, Exper. 15, 144 (1959).
- 10 J. B. KAHN JR. and G. H. ACHESON, J. Pharmacol. exp. Therap. 115, 305 (1955).
- 11 D. H. P. STREETEN and A. K. SOLOMON, J. gen. Physiol. 37, 643 (1954).
- 12 K. R. KOCZOREK, J. KARL, G. RIECKER, M. EICKE, and H. P. WOLFF, Dtsch. med. Wschr. 84, 1134 (1959).