

for the conversion of the labelled 17α -hydroxypregnenolone to other steroids was obtained as follows:

Cortisol was eluted and chromatographed in system Bush C. An aliquot was acetylated with acetic anhydride in pyridine and chromatographed in Bush B₃ and cyclohexane:dioxane/methanol:water (4:4/2:1)⁶. An aliquot of the cortisol from Bush C was oxidized with sodium bismuthate and chromatographed in Bush B₁. After elution, it was oxidized with chromic acid for 10 min and rechromatographed in system Bush B₁, in which the Rf was equal to that of androst-4-en-3,11,17-trione. The radioactive peak migrated with the carrier steroid throughout. In one study with the human adrenal slice, the cortisol was acetylated with C¹⁴-acetic anhydride and the ratio of H³ to C¹⁴ determined after chromatography in Bush B₃, cyclohexane:dioxane/methanol:water, and after elution with 2% acetone in chloroform from a silica gel column. The specific activities of the eluted cortisol acetate were 93, 90, and 88 in the two paper systems and from the peak tubes of the column respectively.

17α -hydroxyprogesterone was chromatographed in ligroin/propylene glycol and Bush B₃. It could not be acetylated with acetic anhydride in pyridine. Acetylation in about 60% yield was accomplished by adding *p*-toluenesulfonic acid to the acetylation reagents. The resulting compound was chromatographed in Bush A where it migrated at the same rate as 17α -acetoxyprogesterone. The radioactive peak coincided with the carrier steroid throughout.

11-deoxycortisol was chromatographed in Bush B₃, an aliquot acetylated and rechromatographed in Bush A and the dioxane system. The acetylated product was reduced with sodium borohydride, oxidized with sodium bismuthate and chromatographed in Bush A. An aliquot of the material from Bush B₃ was oxidized with bismuthate. These two bismuthate oxidation products had an Rf in Bush A identical to androstenedione. The radioactive peak migrated with the carrier compound in all systems.

Dehydroepiandrosterone was successively chromatographed in ligroin/propylene glycol and Bush A. After acetylation, the product was chromatographed in heptane/phenyl Cellosolve. The mobilities of the radioactive peak and the carrier compound coincided. In the human and guinea pig adrenal slices, the DHA contained less than 5% of the combined radioactivity of the three 17α -hydroxysteroids discussed above. Tritium-labelled DHA could not be identified in the rat adrenal slice incubation.

Corticosterone and **progesterone** were not tritium-labelled after incubation with 17α -hydroxypregnenolone.

The human adrenal slices converted 9% of the labelled 17α -hydroxypregnenolone to cortisol and 6% of the pregnenolone to cortisol. Thus 17α -hydroxypregnenolone

was at least as good a precursor of cortisol as was pregnenolone. In several separate but not paired incubations with guinea pig adrenal slices, pregnenolone and 17α -hydroxypregnenolone were equally active as cortisol precursors.

Discussion. The existence of a biosynthetic pathway to 17α -hydroxyprogesterone via 17α -hydroxypregnenolone has been tacitly assumed¹, but evidence has not been presented to support this. It is clear from the present study that 17α -hydroxypregnenolone is a good substrate for the adrenal 3β -ol dehydrogenase system and that in the adrenal slice this constitutes a major metabolic transformation of the compound. The preliminary comparison of the relative activities of pregnenolone and 17α -hydroxypregnenolone suggests that 17α -hydroxylation of pregnenolone may be as rapid as the conversion of pregnenolone to progesterone. These results do not support the view that 17α -hydroxypregnenolone is the important precursor of DHA *within the adrenal gland*, since the conversion of 17α -hydroxypregnenolone to DHA was relatively small. This, of course, does not exclude the conversion of 17α -hydroxypregnenolone to DHA by desmolases outside the adrenal gland as has been suggested earlier³. Indeed, the finding that 17α -hydroxypregnenolone was a precursor of urinary pregnanetriol in two elderly adrenalectomized women⁷ suggests that an extra-adrenal 3β -ol dehydrogenase system may be present.

It is of interest that 17α -hydroxypregnenolone was a suitable substrate for the 3β -ol-dehydrogenase system of the rat adrenal. Thus, when a 17α -hydroxylated substrate was present, the rat adrenal was able to synthesize cortisol⁸.

Zusammenfassung. Nebennierenschnitte von Ratten, Meerschweinchen und Menschen synthetisierten 17α -Hydroxyprogesteron, 11-Deoxycortisol und Cortisol aus 17α -Hydroxypregnenolon. Diese Verbindung, als Ausgangsprodukt für die Cortisolsynthese, ist ebenso wirksam wie pregnenolon. Die Umwandlung von 17α -Hydroxypregnenolon in Dehydroepiandrosteron verläuft weniger vollkommen als zu 17α -Hydroxycorticoiden.

M. B. LIPSETT⁹ and B. HÖKFELT

Department of Endocrinology, Karolinska Hospital, Stockholm (Sweden), June 6, 1961.

⁶ B. KLIMAN and R. E. PETERSON, J. biol. Chem. **235**, 1639 (1960).

⁷ K. FOTHERBY and D. N. LOVE, J. Endocrin. **21**, 129 (1960).

⁸ Acknowledgement: We wish to thank Dr. R. NEHER, Basle, for his helpful comments.

⁹ Present address: National Cancer Institute Bethesda (Md.).

Identification du glucosiduronate de 5β -pregnane $3\alpha,21$ -diol 20-one (THDOC) après administration de cortexone

Nous avons administré à un homme normal 50 mg de cortexone par voie orale en 3 prises et les urines de 24 h ont été recueillies. Les stéroïdes libres et conjugués sont extraits à pH 7 par le mélange éther/éthanol 3/1 v/v¹. Les corticostéroïdes libres sont extraits par le dichlorométhane et les corticostéroïdes conjugués sont fractionnés sur alumine en ester-sulfates et glucosiduronates².

La fraction glucosiduronate a été chromatographiée sur celite purifiée en utilisant les solvants: toluène-acétate de butyle-butanol (40:50:10) comme phase mobile et le

mélange acide acétique-eau-méthanol (5:45:50)³ comme phase stationnaire. Les glucosiduronates sont détectés par la réaction de Tollens, rassemblés et chromatographiés sur papier dans ce même système. Les taches de glucosiduronates ont été révélées par le réactif acide acétique-sulfurique 9/1 (v + v)⁴.

¹ R. W. H. EDWARDS, A. E. KELLIE et A. P. WADE, Mem. Endocrin. London **2**, 53 (1953).

² O. CREPY, M. F. JAYLE et F. MESLIN, Acta endocrinol. **24**, 233 (1957).

³ J. R. PASQUALINI, R. ZELNIK et M. F. JAYLE, Exper. **16**, 317 (1960).

⁴ G. CAVINA, Rend. Inst. sup. Sanita (Roma) **20**, 923 (1957).

Tab. I. Rf du stéroïde obtenu a partir de l'extrait urinaire

Stéroides	Toluène/propanediol R _{THDOC}	Isooctane/méthanol-eau (5/3-2) R _{THDOC}
Stéroïde (extrait urinaire)	1	1
5 α -pregnane 3 β ,21-diol 20-one	0,85	0,88
5 β -pregnane 3 α ,21-diol 20-one (THDOC)	1	1
5 β -pregnane 3 β ,21-diol 20-one	1,25	1,66

Tab. II. Rf de l'acétate du corticostéroïde étudié par chromatographie sur papier non imprégné de phase stationnaire

Acétate de stéroïde	Ligroïne R _{diac.THDOC}	Solvants Isooctane R _{diac.t(THDOC)}
Acétate de stéroïde (extrait urinaire)	1	1
3,21-diacétate de 5 α -pregnane 3 β ,21-diol 20-one	0,60	0,52
3,21-diacétate de 5 β -pregnane 3 α ,21-diol 20-one	1	1

Le chromatogramme est fractionné en 5 parties et la fraction de glucosiduronate contenant les corticostéroïdes peu polaires est éluée par l'éthanol à 50%. La migration du glucosiduronate étudié est par rapport à celle du glucosiduronate de tétrahydrocortisone⁵ (G · THE) de: R_{G.THE} = 2,70.

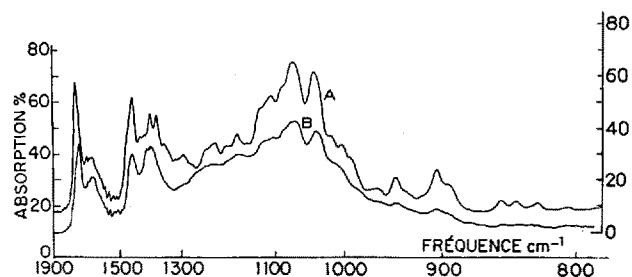
La migration électrophorétique dans une solution carbonate d'ammonium à pH 8,7 du glucosiduronate de l'extrait urinaire s'est avérée identique à la migration du glucosiduronate de THE et égale à 0,8 cm/h.

Identification du corticostéroïde. Le glucosiduronate étudié a été hydrolysé par la β -glucuronidase et chromatographié sur papier ainsi que 3 isomères de la tétrahydrocortexone (THDOC). Les résultats sont indiqués sur Tableau I.

Après acétylation, les acétates de corticostéroïdes sont chromatographiés sur papier sans phase stationnaire selon une méthode que nous avons mise au point⁶ Tableau II.

Le corticostéroïde étudié réduit le bleu de tétrazolium, il ne donne ni les réactions de Porter et Silber, ni les réactions du groupement Δ_4 3 C=O. En solution sulfurique, il a un maximum d'absorption à 320 m μ .

Le spectre infrarouge du corticostéroïde étudié (B) présente les mêmes bandes d'absorption que le 5 β -pregnane 3 α ,21-diol 20-one de synthèse (A) comme il est indiqué dans la Figure.



Spectre infrarouge du 5 β -pregnane 3 α ,21-diol 20-one (THDOC) de synthèse (courbe A) et celui du corticostéroïde étudié (courbe B).

La quantité de tétrahydrocortexone évaluée dans cette fraction est de 2100 μ g/24 h.

Dans la fraction ester-sulfate, nous n'avons détecté ni cortexone, ni aucun de ses métabolites hydrogénés.

Le seul métabolite que nous avons identifié dans la fraction libre est le 5 β -pregnane 3 α ,21-diol 20-one, il a été évalué en 300 μ g/24 h.

Discussion. RICHARDSON et al.⁷ avaient trouvé après administration de 200 mg de cortexone, 1500 μ g de l'hormone non transformée dans les urines de 24 h ainsi que 2700 μ g de THDOC. Dans notre expérience, nous n'avons pas détecté de cortexone, peut-être faut-il en rendre responsable l'administration d'une dose plus faible de cortexone. Nous n'avons pas trouvé de dihydrocortexone qui avait été identifiée par GANDY et al.⁸ dans un cas d'hyperplasie congénitale de la corticosurrénale.

Summary. After administration of cortexone to a normal man, we isolated the 5 β -pregnane 3 α ,21-diol 20-one glucuronide in human urine. We found 90% of this corticosteroid in the glucuronide fraction; the remaining 10% was in the free fraction.

We found neither the cortexone nor its metabolites di- or tetrahydrogenated in the ester-sulphate fraction.

The tetrahydrocortexone-glucuronide was identified by paper chromatography and by electrophoresis.

J. R. PASQUALINI et M. F. JAYLE

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, Paris (France), le 5 mai 1961.

⁵ Nous remercions vivement le Dr. J. J. SCHNEIDER d'avoir eu l'amabilité de nous procurer le glucosiduronate de tétrahydrocortisone de synthèse.

⁶ J. R. PASQUALINI et M. F. JAYLE, J. Chromat. 5, 336 (1961).

⁷ E. M. RICHARDSON, J. C. TOUCHSTONE, F. C. DOHAN, H. BULASCHENKO, I. LANDOLT et W. APPLIN, J. clin. Invest. 34, 285 (1955).

⁸ H. M. GANDY, E. H. KEUTMANN et A. J. IZZO, J. clin. Invest. 39, 364 (1960).