

stimulated by anaerobiosis^{4,5} which is not the case in phage.

The optimum H_2O_2 concentration for the induction of phage is $M/500$, whereas that for the induction of colicin is by 4 times lower. This optimum is more clearly expressed in the phage than in colicin.

Up to now we can compare these results with the data of NORTHROP⁶, LWOFF and JACOB¹, LWOFF⁷, and FAGUET⁸. They agree very well. Our results moreover show clearly that the effective dose for the induction of colicinogeny is considerably lower than that for the induction of lysogeny—a conclusion similar to that drawn by HAMON⁹ and ourselves³ for UV induction.

In comparing the induction of the strain L II-18 by hydroperoxide with that by UV-rays³, we find on the whole that the effect of the induction by H_2O_2 is less. Whereas, when using UV-rays of a wave-length 2537 Å, the titer of the phage with this strain was increased by 161 times, and that of colicin by 20 times against the control, hydroperoxide increased the production of phage 35 times at most and of colicin only 7 times. This means at any rate that the inducing effect of UV-light cannot be identified with that of H_2O_2 .

We therefore seem not only to have the right to postulate, together with THIMANN¹⁰, that in the mutagenic effect several different kinds of reaction may participate, but we may expect the same also from induction.

Zusammenfassung. Die Arbeit gibt die Resultate der Induktion der Lysogenie und der Colicinogenie im selben Stamme *E. coli* (L II-18) mit Wasserstoffperoxid an. Der Phagentiter wurde 35mal, der Colicintiter 7mal erhöht. Die optimale Konzentration des H_2O_2 für Phagenbildung war $M/500$, die für Colicinbildung $M/2000$. Im Vergleich mit der Induktion desselben Stammes mit UV-Licht ist die Wirkung des H_2O_2 verhältnismässig schwach.

J. ŠMARDA,

with technical cooperation of V. ČERMÁK

Department for Biology, Medical Faculty, J. E. Purkyně University, Brno (Czechoslovakia), February 2, 1962.

⁴ J. ŠMARDA, J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol. 4, 151 (1960).

⁵ H. MATSUSHITA, M. S. FOX, and W. F. GOEBEL, J. exp. Med. 112, 1055 (1960).

⁶ J. H. NORTHROP, J. gen. Physiol. 42, 109 (1958).

⁷ A. LWOFF, Bact. Rev. 17, 269 (1953).

⁸ M. FAGUET, Ann. Inst. Pasteur 99, 297 (1960).

⁹ Y. HAMON, C. R. Acad. Sci. Paris 249, 478 (1959).

¹⁰ K. V. THIMANN, *The Life of Bacteria* (The Macmillan Company, New York 1955).

Isolement et identification du 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione (Dihydrocortisol) dans l'urine humaine

Les urines de 24 h d'un patient atteint d'une tumeur féminisante de la surrénale ont été hydrolysées par le suc digestif d'*Helix pomatia*. Après extraction par l'éther sulfurique, l'extrait est lavé une fois par 0,05 v de CO_3Na_2 9% p/v et par une fois 0,05 v d'eau. L'extrait dissous dans le dichlorométhane est adsorbé sur une colonne de florisil et élué par: (a) 80 ml de dichlorométhane contenant 2,5% de méthanol, (b) 150 ml de dichlorométhane contenant 12,5% de méthanol, (c) 80 ml de méthanol. La fraction (b) qui contient 90% des corticostéroïdes est chromatographiée dans le système chloroforme/formamide. On trouve une tache réduisant le bleu de tétrazolium entre le cortisol et la cortisone; cette zone est éluee et le résidu sec est rechromatographié dans le même système pendant 6 h; on ne trouve qu'une seule tache réduisant le bleu de tétrazolium. La zone correspondante est éluee et après chromatographie sur gel de silice des corticostéroïdes correspondants, on les chromatographie dans les systèmes: benzène/méthanol-eau (2/1-1); isooctane/butanol tertiaire-eau (10/5-9); toluène-acétate d'éthyle/méthanol-eau (9-1/5-5) toluène/propanediol et benzène/formamide; on ne détecte dans tous ces systèmes qu'une seule tache réduisant le bleu de tétrazolium et ayant le même Rf que le 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione (dihydrocortisol) de synthèse.

Une partie aliquote du composé isolé, est oxydée d'une part par le bismuthate de sodium et d'autre part par l'oxyde chromique. Le produit d'oxydation bismuthique¹ a le même Rf que le 5 β -androstane 3,11,17-trione (II) dans les systèmes hexane-benzène (1-1)/propanediol et ligroïne/propanediol. Le produit d'oxydation chromique² a le même Rf que le 5 β -androstane 3,11,17-trione (III) dans les systèmes hexane-benzène (1-1)/propanediol et

ligroïne/propanediol. Une autre partie aliquote a été acétylée et son acétate présente le même Rf que le 21 monoacétate de 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione (IV) dans les systèmes toluène/propanediol et benzène/formamide. L'acétate du composé isolé a été oxydé par l'oxyde chromique et le produit de l'oxydation a le même

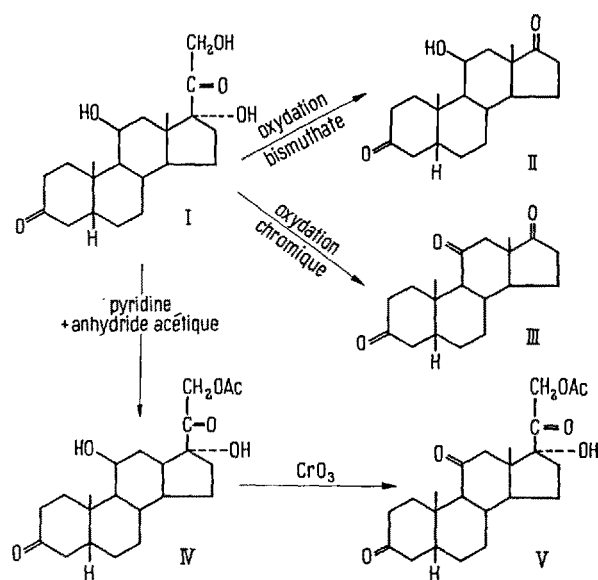


Schéma de l'identification du 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione

¹ J. K. NORBYERSKI et R. D. STUBBS, Biochem. J. 64, 168 (1956).

² A. ZAFFARONI et R. B. BURTON, J. biol. Chem. 193, 749 (1951).

Rf que le 21 monoacétate de 5 β -prégnane 17 α , 21-diol 3, 11, 20-trione (V) dans les systèmes toluène/propanediol et benzène/formamide.

La Figure montre les étapes suivies pour l'identification du stéroïde isolé.

Propriétés physico-chimiques. Le composé isolé des urines donne une réaction positive au bleu de tétrazolium et au réactif de Porter et Silber, ne présente pas d'absorption à 254 m μ , et il n'est pas fluorescent en milieu sodique à la lumière de Wood et, après oxydation bismuthique ou chromique, il se transforme en un 17-cétostéroïde.

Évaluation quantitative. En utilisant la micro-réaction au bleu de tétrazolium, nous avons évalué à 150 $\mu\text{g}^{100}/_{00}$ la quantité de dihydrocortisol présent dans l'urine.

Discussion. On sait que le cortisol est converti dans l'organisme essentiellement en dérivés tétra et hexahydro-dérivés: 5 β -prégnane 3 α , 11 β , 17 α , 21-tétrol 20-one (tetrahydrocortisol) 5 α -prégnane 3 α , 11 β , 17 α , 21-tétrol 20-one (allo-tétrahydrocortisol); 5 β -prégnane 3 α , 17 α , 21-triol 11, 20-dione (tétrahydrocortisone); 5 β -prégnane 3 α , 11 β , 17 α , 20 α , 21-pental (cortol) et ses isomères en 5 α et en 20 β ; 5 β -prégnane 3 α , 17 α , 20 α , 21-tétrol 11-one (cortolone) et son isomère 20 β ^{3,4}. Parmi les composés mineurs qui ont été isolés citons: le prégnane 4-ène 11 β , 17 α , 20 α , 21-tétrol 3-one (composé epiE de Reichstein)⁵, le prégnane 4-ène 11 β , 17 α , 20 β , 21-tétrol 3-one (composé E de Reichstein)⁶, le prégnane 4-ène 17 α , 20 β , 21-triol 3, 11-dione (composé U de Reichstein)⁷.

SCHNEIDER⁸ a également isolé des urines humaines le 5 β -prégnane 17 α , 21-diol 3, 11, 20-trione (dihydrocortisone); tous ces métabolites sont des dihydrodérivés qui résultent de la réduction soit du carbonyle en C₂₀, soit de la double liaison en C₄₋₅; en revanche, le 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione (dihydrocortisol) n'a pas été identifié dans l'urine humaine à notre connaissance.

En montrant que le corticostéroïde que nous avons isolé a dans six systèmes différents les mêmes Rf que le

dihydrocortisol, que son acétate a le même Rf que l'acétate de dihydrocortisol dans deux systèmes différents, et qu'après oxydation bismuthique ou chromique il se transforme respectivement en 5 β -androstane 11 β -ol 3, 17-dione et 5 β -androstane 3, 11, 17-trione, nous avons apporté la preuve que ce corticostéroïde est le 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione.

Summary. 5 β -pregnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione (dihydrocortisol) has been isolated and identified in the urine of patients with feminizing adrenal cortical cancer. This steroid showed the same Rf as synthetic dihydrocortisol in six different chromatographic systems. After acetylation, its Rf was the same as that of 21 monoacetate of dihydrocortisol. After bismuthic or chromic oxydation, it had the same chromatographic Rf as 5 β -androstane 11 β -ol 3, 17-dione and 5 β -androstane 3, 11, 17-trione respectively. After chromic oxydation of its acetate, the Rf was the same as that of 21 monoacetate of cortisone.

J. R. PASQUALINI and M. F. JAYLE

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine, Paris (France), le 5 février 1962.

³ D. K. FUKUSHIMA, N. S. LEEDS, H. L. BRADLOW, T. H. KRITCHER-SKY, M. B. STOKEM et T. F. GALLAGHER, *J. biol. Chem.* **212**, 449 (1955).

⁴ D. K. FUKUSHIMA, H. L. BRADLOW, L. HELLMAN, B. ZUMOFF et T. F. GALLAGHER, *J. biol. Chem.* **235**, 2246 (1960).

⁵ R. E. PETERSON, C. E. PIERCE et B. KLIMAN, *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 614 (1957).

⁶ R. E. PETERSON, J. B. WYNGAARDEN, S. L. GUERRA, B. B. BRODIE et J. J. BUNIN, *J. clin. Invest.* **34**, 1779 (1955).

⁷ M. E. LOMBARDO et P. B. HUDSON, *J. biol. Chem.* **229**, 181 (1957).

⁸ J. J. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* **194**, 337 (1952).

Metabolism of the Normal Cardiovascular Wall. 1. Utilization of Glucose by Arteries and Veins

In order to establish the metabolic pattern of the normal vascular wall, a series of studies are being undertaken to determine the role, fate and relative significance of the principal substances involved in the metabolic process.

This communication presents the results of the first group of experiments concerning the metabolism of glucose and the *qualitative* as well as *quantitative* determinations of its intermediate metabolites in normal arteries and veins of the dog.

Materials and Method. Uniformly ¹⁴C-labeled glucose was obtained from the Radiochemical Centre, Amersham (England). The radioactive material was diluted with inert substrate to give a specific activity of 8 $\mu\text{C}/\text{mg}$. Adult, male, mongrel dogs, weighing about 15 kg were anaesthetised intraperitoneally with nembutal. The *popliteal* and one of the *colic* arteries and their accompanying veins were dissected out. Before removal of the vessels, the adventitia was carefully stripped off, after which they were split longitudinally into strips weighing about 50 mg and placed into 0.6 ml of ice-chilled Krebs-Ringer phosphate medium at pH 7.4 in Warburg flasks. The glucose concentration was 0.3% and each flask contained 14 μC of

the radioactive substance. A small roll of filter paper soaked with 0.5 ml of 30% NaOH was placed in the centre well of each, and the flasks were then attached to the manometers for an incubation period of 120 min at 37°C, in oxygen.

Similar experiments were conducted under anaerobic conditions, but in these the glucose was placed in the side-arm of the Warburg flask and added to the medium only after equilibration with nitrogen. The gas was passed over heated copper wire to remove all traces of oxygen.

Radioactive CO₂ production was estimated after the method of VILLEE and HASTINGS¹. The techniques used in the preparation of the aqueous alcohol extracts for mono- and bidimensional radio paperchromatography were those described by BELOFF-CHAIN et al.²; and the quantitative determinations were greatly facilitated with the automatic scanning device designed by FRANK³. The solvents used for the bidimensional chromatograms are given in the Figure. Monodimensional chromatograms,

¹ G. A. VILLEE and A. B. HASTINGS, *J. biol. Chem.* **179**, 673 (1949).

² A. BELOFF-CHAIN, R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI, F. POCCHIARI, and C. ROSSI, *Proc. Roy. Soc. B* **143**, 481 (1955).

³ M. FRANK, *Selected Papers from the Istituto Superiore di Sanità* **2**, 75 (1959).