

98. Untersuchungen von Extrakten aus Testes.

(1. Mitteilung).

Zur Kenntnis der Lipide aus Schweinetestes

von L. Ruzicka und V. Prelog.

(31. III. 43.)

Extrakte aus Testes sind besonders zu Beginn der chemischen Forschungen über Sexualhormone viel untersucht worden, doch war diesen Arbeiten zuerst kein Erfolg beschieden. Die experimentellen Schwierigkeiten bei der Isolierung sehr kleiner Hormonmengen aus den stark fett- und cholesterinhaltigen Gonadenextrakten waren so gross, dass es *T. F. Gallagher* und *F. C. Koch*¹⁾, sowie *A. Butenandt* und *F. Hildebrandt*²⁾ nicht gelang, daraus die Wirkstoffe oder andere Steroide in kristallisierter Form zu isolieren. Die ersten chemisch definierten Hormone mit androgenen Eigenschaften wurden vielmehr von *Butenandt* aus Harn gewonnen, worin eine wesentlich geringere Menge Ballaststoffe enthalten ist. Durch Anwendung eines ungewöhnlichen Verfahrens ist es dann *K. David*³⁾ im Laboratorium von *E. Laqueur* im Jahre 1935 gelungen, aus Stiertestes-Extrakten eine stark androgene Verbindung, das Testosteron, zu erhalten⁴⁾. Seitdem lag die Annahme sehr nahe, dass Testosteron allgemein das männliche Testikelhormon der Säugetiere und des Menschen ist⁵⁾. Es ist dagegen hervorzuheben, dass Testosteron bisher nur aus Stierhoden in Substanz isoliert worden ist, und dass genauere chemische Untersuchungen nur noch an Schweinehoden durchgeführt wurden, in denen aber bis jetzt kein Testosteron nachgewiesen werden konnte.

Andere chemisch gut definierte Verbindungen mit androgener Wirksamkeit wurden aus Testesextrakten bisher nicht erhalten. Eine aus wässrigen Stierhodenextrakten von *B. Frattini* und *M. Maino*⁶⁾ isolierte androgene Verbindung, sowie eine von *A. Ogata* und *S. Hirano*⁷⁾ beschriebene Verbindung aus den Lipoiden der Schweinehoden wurden nicht genügend chemisch charakterisiert; ihr Vorkommen wurde von andern Autoren nicht bestätigt.

¹⁾ J. Biol. Chem. **84**, 495 (1929).

²⁾ Vgl. *A. Butenandt* und *K. Tscherning*, Z. physiol. Ch. **229**, 173 (1934).

³⁾ *K. David*, *E. Dingemans*, *J. Freud* und *E. Laqueur*, Z. physiol. Ch. **233**, 281 (1935).

⁴⁾ Vgl. die zusammenfassenden Darstellungen von *M. W. Goldberg* in „Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung“ **1**, 371 (1938), *O. Wintersteiner* und *P. E. Smith*, in Ann. Review Biochem. **7**, 266 (1938), und *F. C. Koch*, Physiological Reviews **17**, 153 (1937).

⁵⁾ Vgl. z. B. *Lehnartz*, Chemische Physiologie, 5. Aufl., S. 217, 219.

⁶⁾ Arch. Ist. Bioch. Ital. **2**, 639 (1930); Z. angew. Ch. **45**, 324 (1932); **68**, 677 (1935).

⁷⁾ J. Pharm. Soc. Japan **54**, 199 (1934).

Sehr interessant ist der verhältnismässig hohe Gehalt der Testes einiger Tiere an oestrogenen („weiblichen“) Verbindungen, wie Oestron und α -Oestradiol, die sich als Phenole verhältnismässig leicht isolieren liessen¹⁾.

Aus den Lipoiden der Schweinetestes wurden weiter von *S. Hirano*²⁾ vier kristallisierte Präparate erhalten, die sich nach gebräuchlichen Testmethoden geprüft, als unwirksam erwiesen haben. Erwähnt sei besonders das Testalolon $C_{21}H_{32}O_3$, ein gesättigtes Steroid mit einer Hydroxyl- und zwei Carbonylgruppen, für welches dieser Autor ohne Beweis die Konstitution des Allo-pregnanol-(3 β)-on-(20)-als-(21) vorgeschlagen hat. Neben Testalolon wurden von *Hirano* das Propandiol-1,3-monopalmitat, ein gesättigter Alkohol $C_{19}H_{40}O_3$ und eine nicht näher charakterisierte Verbindung $C_{23-24}H_{34-38}O_3$ isoliert.

Die künstliche Herstellung des Testosterons³⁾ hat das Interesse für die mühevoll chemische Untersuchung der Testesextrakte vielleicht herabgesetzt; in der letzten Zeit wurden wenigstens keine Arbeiten über dieses Thema mehr veröffentlicht. Eine eingehendere Bearbeitung des Gebietes war jedoch aus mehreren Gründen gerechtfertigt. In erster Linie war es erwünscht, die biologisch wichtigen Fragen des Vorkommens, des Entstehens und der Umwandlung der männlichen Testeshormone im Tierkörper auf eine breitere, experimentelle Grundlage zu stellen. Andererseits erlauben heute die inzwischen ausgebildete verbesserte Isolierungstechnik, besonders die Anwendung der Methode des sog. Durchlauf-Chromatogramms, sowie die Fortschritte der Steroidechemie eine leichtere Isolierung und Aufklärung der Konstitution der in kleinen Mengen vorkommenden Verbindungen, als es bei den früheren Bearbeitungen möglich war.

Die Fortschritte der Isolierungstechnik und die Erfahrungen über das Verhalten der Steroide bei Isolierungsoperationen haben es uns auch ermöglicht, auf die konsequente Verwendung eines biologischen Testverfahrens bei unseren Versuchen zu verzichten. Die Isolierung der in kleinen Mengen vorkommenden Wirkstoffe mit Hilfe eines biologischen Testverfahrens ist für die moderne biochemische Forschung geradezu charakteristisch. Wenn wir die biologischen Testverfahren absichtlich nicht herangezogen haben, so taten wir dies u. A. auch deswegen, weil gerade auf dem Gebiet der Hodenextrakte die quantitativen Ergebnisse der Testverfahren infolge verschiedener Umstände mit einer beträchtlichen Unsicherheit behaftet sind. In dieser Beziehung ist besonders der Gehalt der Testesextrakte

¹⁾ *D. Beall*, *Biochem. J.* **34**, 1293 (1940), fand in Hengsthoden 0,21 mg/kg α -Oestradiol und 0,36 mg/kg Oestron. Vgl. auch Anm. 2, S. 979.

²⁾ *J. Pharm. Soc. Japan* **56**, 122 (1936), vgl. *Am. Soc.* **60**, 1728 (1938).

³⁾ *L. Ruzicka* und *A. Wettstein*, *Helv.* **18**, 1264 (1935); *A. Butenandt* und *G. Hanisch*, *B.* **68**, 1859 (1935); *Z. physiol. Ch.* **237**, 89 (1935).

an synergistisch wirkenden sog. X-Stoffen¹⁾ und antagonistisch wirkenden Oestrushormonen²⁾ zu nennen. Es ist auch möglich, dass die androgenen Wirkstoffe der Testes grösstenteils in einer „gebundenen“ bzw. „inaktiven“ Form vorliegen, wie es z. B. für die Androgene des Blutes und des Harnes des Menschen von *D. R. McCullagh* und *W. O. Osborn*³⁾ behauptet wird. Ob Testosteron in den Stierhoden „frei“ vorkommt, oder ob es erst während der Isolierungsvorgänge, z. B. durch eine Hydrolyse, gebildet wird, lässt sich wegen der schwierigen Isolierung der kleinen Mengen des Wirkstoffes vorerst nicht entscheiden, besonders wenn man bedenkt, dass das Testosteron von *K. David*⁴⁾ durch Extraktion der angereicherten Hodenextrakte mit 75-proz. Schwefelsäure isoliert wurde. *M. W. Goldberg*⁵⁾ hat in unserem Laboratorium zwar das Testosteron aus Stierhodenextrakten ohne Anwendung von Schwefelsäure oder anderer energisch hydrolysierend wirkender Agentien isoliert, doch schliessen auch seine Versuche die Bildung des freien Testosterons durch milde hydrolytische Prozesse (wie Alkoholyse) während der langwierigen Verarbeitung der Extrakte nicht aus.

Ausserdem muss man sich die berechtigte Frage stellen, ob die gebräuchlichen Testverfahren, der Kapaunenkammtest und der Samenblasentest, wirklich alle männlichen Sexualhormone erfassen. Als männliche Sexualhormone definiert man vom physiologischen Standpunkt alle Stoffe — unabhängig davon, ob dieselben in Form definierter chemischer Verbindungen isoliert worden sind oder nicht —, welche für das Wachstum, die normale Entwicklung und die Funktion des männlichen Geschlechtsapparates, sowie für die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und des Geschlechtstriebes verantwortlich sind. Diese Stoffe werden von verschiedenen Geweben, besonders den Gonaden und der Hypophyse, erzeugt. Ungeachtet dieses „physiologisch“ breit definierten Hormonbegriffs bezeichnet man praktisch als männliche Sexualhormone die aus dem Körper isolierten Verbindungen, welche bei den schon genannten Testverfahren eine relativ eng umschriebene Teilwirkung zeigen. Die pharmakologischen und klinischen Erfahrungen zeigen, dass dem bisher einzig aus Testes isolierten männlichen Sexualhormon, dem Testosteron, zum mindesten ein sehr grosser Anteil an dem Zustandekommen der gesamten männlichen Hormonwirkung im

¹⁾ Vgl. *J. Freud*, *E. Dingemans* und *H. Polak*, *Arch. intern. pharmacodynamie* **57**, 369 (1937).

²⁾ Vgl. *J. Morato-Manaro* und *A. Albrieux*, *Endocrinology* **24**, 518 (1939).

³⁾ *J. Biol. Chem.* **126**, 299 (1938), vgl. auch *D. R. McCullagh*, *Endocrinology* **24**, 326 (1939).

⁴⁾ *K. David*, *E. Dingemans*, *J. Freud* und *E. Laqueur*, *Z. physiol. Ch.* **233**, 281 (1935), *U. S. A. Patent* 2 175 963.

⁵⁾ Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung **1**, 388 (1938).

Sinne der physiologischen Definition zukommt. Andererseits bestehen Hinweise darauf, dass die mannigfaltigen und komplizierten biologischen Aufgaben der männlichen Sexualhormone doch nicht durch eine Verbindung bewältigt werden. Die Gründe, welche zur Annahme mehrere männlicher Sexualhormone der Testes führen, wurden schon von *D. R. MacOullagh* diskutiert¹⁾. Wenn aber von den Testes mehrere Verbindungen erzeugt werden, die nach der physiologischen Definition die Bezeichnung „männliche Sexualhormone“ verdienen, so brauchen nicht alle die Teilwirkungen zu zeigen, welche den üblichen Testverfahren zugrunde liegen.

Wir hofften deshalb, bei einer genauen, rein chemischen Untersuchung der Inhaltsstoffe und besonders der Steroide der männlichen Gonaden auch auf solche biologisch wichtige Verbindungen zu stossen, welche im Kapaunenkammtest und im Samenblasentest zwar wenig wirksam oder ganz unwirksam sind, aber doch gewisse andere männliche hormonale Teilwirkungen zeigen und daher als männliche Hormone im weiteren Sinne zu bezeichnen wären. Diese Hoffnungen erfüllten sich in einem Falle schon am Anfang unserer Arbeit, was uns zu einem Bericht über die noch lange nicht abgeschlossenen Untersuchungen veranlasst.

Als Ausgangsmaterial dienten uns Lipoide aus Schweinehodern, welche durch Acetonextraktion der Frischhodern (weiter bezeichnet als Ac-Extrakt) oder durch Benzolextraktion der im Vakuum getrockneten und gepulverten Hodern (weiter bezeichnet als Bz-Extrakt) erhalten wurden. Durch Anwendung eines Isolierungsverfahrens, welches im experimentellen Teil ausführlich beschrieben ist, erhielten wir daraus eine Reihe von krystallinen Fraktionen, deren Bearbeitung grösstenteils noch im Gange ist.

Zuerst konnten wir aus diesen Krystallisaten zwei bekannte Verbindungen aus der Steroidreihe mit 21 Kohlenstoffatomen isolieren und identifizieren.

Verbindung A. Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20). Die erste von den Verbindungen erwies sich als identisch mit dem schon seit längerer Zeit bekannten Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20)²⁾. Diese bisher in der Natur nicht gefundene Verbindung verdient ein besonderes Interesse. *H. Selye*³⁾ fand unlängst bei seinen Untersuchungen über die pharmakologischen Wirkungen verschiedenster Steroide, dass dem Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) eine stark kurative Wirkung auf die Veränderungen der männlichen Geschlechtsorgane zukommt, die durch Oestrushormone oder durch Hypophysektomie hervorgerufen

¹⁾ *Endocrinology* **24**, 326 (1939).

²⁾ *A. Butenandt, U. Westphal und H. Cobler, B.* **67**, 1611 (1934).

³⁾ *Endocrinology* **30**, 437 (1942); *Revue canadienne de Biologie* **1**, 577 (1942).

werden¹⁾. Die Versuche von *Selye* wurden auf unser Ersuchen im Wissenschaftlichen Laboratorium der *Gesellschaft für Chemische Industrie* in Basel durch die Herren Prof. *Schuler* und Dr. *Gasche* nachgeprüft und bestätigt. Die Ergebnisse der physiologischen Prüfungen sollen in einem andern Zusammenhang mitgeteilt werden. Es lässt sich aber schon jetzt sagen, dass Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20), obwohl es im Kapaunenkammtest und Samenblasentest unwirksam ist, neben anderen Verbindungen wahrscheinlich eine gewisse Rolle in der Biologie der männlichen Geschlechtsorgane spielt; es kann demnach, entsprechend unseren obigen Ausführungen, als ein männliches Sexualhormon im weiteren Sinne betrachtet werden.

Es sei in diesem Zusammenhange nochmals auf den überraschend hohen Gehalt der Hoden einiger Tiere an oestrogenen Verbindungen hingewiesen, welche, von aussen zugeführt, eine atrophierende Wirkung auf wichtigste männliche Geschlechtsorgane ausüben. Wir haben uns bisher bei unseren Arbeiten über Schweinehodenextrakte vorläufig nur auf die biologische Auswertung der in 50-proz. Methanol löslichen, schwach sauren Fraktion IV beschränkt (siehe S. 984), welche nur einen Teil der Oestrogene enthielt. Die Fraktion IV aus Ac-Extrakt enthielt z. B. 370 R.E. pro 1 kg Hoden (entsprechend 0,15 mg Oestradiol oder 0,4 mg Oestron)²⁾. Die Gegenwart von Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) in Testes, welches der inhibierenden Wirkung der Oestrushormone auf eine der wichtigsten Funktionen, die Spermatogenesis, entgegenwirkt, gewinnt bei dieser Sachlage an Bedeutung.

Im Anschluss an das Vorkommen in den Schweinehoden soll noch erinnert werden, dass das Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) schon früher bei den theoretischen Erwägungen über den Steroidabbau als ein hypothetisches Bindeglied zwischen Cholesterin und Steroidhormonen angesehen wurde³⁾.

Verbindung B. Allo-pregnanol-(3 β)-on-(20). Die zweite aus den Schweinehodenextrakten isolierte bekannte Verbindung war Allo-pregnanol-(3 β)-on-(20). Allo-pregnanol-(3 β)-on-(20) wurde schon oft in der Natur gefunden. Es kommt im Corpus luteum⁴⁾, in der

¹⁾ *Selye* betrachtet diese Wirkung als eine unabhängige pharmakologische Teilwirkung der „Steroidhormone“ (natürlicher und künstlicher) und nennt sie „spermatogenic action“.

²⁾ Zum Vergleich sei erwähnt, dass in den weiblichen Geschlechtsdrüsen, in Schweine-Ovarien, von *W. W. Westerfeld* und Mitarbeitern (*J. Biol. Chem.* **126**, 181 (1938)) insgesamt 240 R.E. pro kg Ovarien gefunden worden sind.

³⁾ *L. Ruzicka*, *Helv.* **19**, E 89 (1936). Eine dominierende Stellung, als Mutter-substanz der natürlichen Steroidhormone, wird dem Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) von *Selye* zugewiesen. *R. E. Marker* (*Am. Soc.* **60**, 1725 (1938)) betrachtet es als ein nicht isoliertes Zwischenprodukt beim Übergang von Progesteron in 3 β -Oxy-allo-pregnan-Derivate.

⁴⁾ *O. Wintersteiner* und *W. M. Allen*, *J. Biol. Chem.* **107**, 321 (1934); *A. Butenandt* und *M. Westphal*, *B.* **67**, 1440 (1934); *K. H. Slotta*, *H. Ruschig* und *E. Fels*, *B.* **67**, 1270 (1934); *M. Hartmann* und *A. Wettstein*, *Helv.* **17**, 1370 (1934); *A. Butenandt* und *L. Mamoli*, *B.* **67**, 1897 (1934).

Nebennierenrinde¹⁾ und in Harn²⁾ trächtiger Tiere und Schwangerer vor. Da es sich nach gebräuchlichen Testverfahren als wirkungslos erwiesen hat, wissen wir bisher nichts über seine biologische Aufgabe.

Die Trennung kleiner Mengen der beiden nahe verwandten Verbindungen A und B war mit gewissen experimentellen Schwierigkeiten verbunden. Das Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) liess sich zwar als Acetat durch Chromatographieren und Umlösen rein erhalten, die Isolierung des einheitlichen gesättigten Steroids gelang aber auf diesem Wege nicht. Wir oxydierten deshalb das Gemisch der beiden Verbindungen mit Osmiumtetroxyd in Gegenwart von Pyridin. Das Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) ging dabei in das von *M. Ehrenstein*³⁾ zuerst beschriebene Pregnan-triol-(3 β ,5,6)-on-(20) über, während Allo-pregnan-ol-(3 β)-on-(20) unverändert blieb. Beide Verbindungen unterscheiden sich stark durch ihr Adsorptionsvermögen an aktiviertem Aluminiumoxyd und liessen sich durch Chromatographieren gut trennen. Die Oxydation mit Osmiumtetroxyd, verbunden mit der chromatographischen Analyse der Reaktionsprodukte ist die sauberste Methode, um kleine Mengen gesättigter Steroide aus dem Gemisch mit ungesättigten zu isolieren, wie wir uns durch Modellversuche überzeugen konnten, und kann in ähnlichen Fällen wie den unseren empfohlen werden.

Verbindung C, $C_{21}H_{32}O_3$. Neben den in ihrer Konstitution aufgeklärten Verbindungen isolierten wir einen weiteren Vertreter der C_{21} -Reihe, dessen Konstitution noch nicht aufgeklärt ist. Die Verbindung C ist wahrscheinlich identisch mit dem schon erwähnten Testalolon von *S. Hirano*⁴⁾. Es handelt sich um eine durch Digitonin fällbare, gesättigte Ketoverbindung der Formel $C_{21}H_{32}O_3$, der von *Hirano* und *Marker* die Konstitution eines Allo-pregnanol-(3 β)-on-(20)-als-(21) zugeschrieben wurde. Eine Synthese dieser letzten Verbindung, über die wir nächstens berichten werden, zeigte jedoch, dass Testalolon eine andere Konstitution besitzen muss.

Mit der Aufklärung der Konstitution der Verbindung C sind wir beschäftigt.

Das Vorkommen dieser drei Steroide der C_{21} -Reihe in Testes führt zu der Annahme, dass dieses Organ als ein Ursprungsort für die aus Harn männlicher Individuen isolierten Steroide mit 21 C-

¹⁾ *D. Beall* und *T. Reichstein*, *Nature* **142**, 479 (1938); *D. Beall*, *Biochem. J.* **32**, 1957 (1938); *J. Endocrinology* **2**, 81 (1940).

²⁾ Im Harn trächtiger Stuten: *R. E. Marker* und Mitarb., *Am. Soc.* **60**, 1559 (1938); *R. D. H. Heard* und *A. F. McKay*, *J. Biol. Chem.* **131**, 371 (1939). Im Harn trächtiger Säue: *R. E. Marker* und *E. Rohrmann*, *Am. Soc.* **61**, 3476 (1938). Im Harn der Schwangeren: *W. H. Pearlman*, *G. Pincus* und *N. T. Werthessen*, *J. Biol. Chem.* **142**, 649 (1942).

³⁾ *J. Org. Chem.* **4**, 506 (1939).

⁴⁾ *J. pharm. Soc. Japan* **56**, 122 (1936); *Am. Soc.* **60**, 1728 (1938).

Atomen in Betracht kommt¹⁾. Als ein weiterer Hinweis können die Untersuchungen von *R. E. Marker* und Mitarbeiter²⁾ dienen, welche aus Harn geschlechtsreifer Stiere grössere Mengen Pregnandiol-(3 α , 20 α); Allo-pregnandiol-(3 α , 20 α) und Allo-pregnandiol-(3 β , 20 α) neben den Steroiden der C₁₉-Reihe isolierten, während im Harn von Ochsen die Steroide der C₂₁-Reihe nicht aufgefunden werden konnten.

Verbindung D. Cholestan-triol-(3 β , 5, 6 trans). Die Verbindung D, welche mit *Girard*-Reagens T³⁾ nicht reagierte, war mit Digitonin fällbar und gegen Tetranitromethan gesättigt. Die Elementaranalyse stimmte auf die Formel C₂₇H₄₈O₃, mit Pyridin und Acetanhydrid gab die Verbindung D ein Diacetyl-Derivat C₃₁H₅₂O₅ vom Smp. 166°. Der Vergleich mit einem synthetisch hergestellten Cholestan-triol-(3 β , 5, 6 trans)⁴⁾ bestätigte die Vermutung, dass die beiden Verbindungen identisch sind. Entgegen den Angaben von *E. Fernholz*⁵⁾ ist Cholestan-triol-(3 β , 5, 6 trans) unter den von uns angegebenen Bedingungen fällbar mit Digitonin. Cholestan-triol-(3 β , 5, 6 trans) wurde schon einmal aus einem Organextrakt, und zwar aus Leber, von *G. A. D. Haslewood*⁶⁾ erhalten.

Verbindung E. C₁₃H₂₂O₂N₂(?). Neben den Verbindungen der Steroidreihe isolierten wir aus Schweinehodenextrakten in kleinen Mengen auch eine Stickstoffverbindung vom Schmelzpunkt 270°, deren Elementaranalyse auf die einfachste Formel C₁₃H₂₂O₂N₂ stimmte. Die Verbindung E ist optisch inaktiv oder sehr schwach rechtsdrehend und gibt keine Ninhydrin-Reaktion. Wegen der geringen Mengen, die uns zur Verfügung standen, mussten wir von einer eingehenderen Untersuchung vorläufig absehen.

$\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7). Das in unserem Laboratorium auch in anderen Organextrakten festgestellte Vorkommen dieser Verbindung ist möglicherweise auf eine Wasserabspaltung bei der Verseifung von 7-Keto-cholesterin-Estern zurückzuführen. Ob 7-Keto-cholesterin selbst in den Organen vorkommt, oder ob es sich erst bei der Verarbeitung durch Autoxydation des Cholesterins gebildet hat, ist nach den Erfahrungen von *Wintersteiner* und *Bergström*⁷⁾ über

¹⁾ Ausserdem werden bekanntlich auch im männlichen Organismus die C₂₁-Steroide von den Nebennieren produziert.

²⁾ Am. Soc. **60**, 2931 (1938); **61**, 1287 (1939).

³⁾ *A. Girard* und *G. Sandulesco*, Helv. **19**, 1095 (1936).

⁴⁾ *R. H. Pickard* und *J. Yates*, Soc. **93**, 1678 (1908); *T. Westphalen*, B. **48**, 1064 (1915); *B. Ellis* und *V. A. Petrow*, Soc. **1939**, 1078.

⁵⁾ Z. physiol. Ch. **232**, 97 (1935); vgl. *T. Kawasaki*, J. pharm. Soc. Japan **57**, 281 (1937); C. **1938**, II. 2944.

⁶⁾ Biochem. J. **35**, 708 (1941).

⁷⁾ *O. Wintersteiner* und *S. Bergström*, J. Biol. Chem. **137**, 785 (1941); *S. Bergström* und *O. Wintersteiner*, J. Biol. Chem. **141**, 597 (1941); *S. Bergström*, Naturwiss. **30**, 684 (1942); Arkiv Kemi, Mineral, Geol. **16A**, Heft 10 (1942).

die Oxydation des Cholesterins in wässrigen Suspensionen an der Luft schwer zu entscheiden. Das Vorkommen von 7-Oxy- und 7-Keto-cholesterin-Derivaten soll deswegen später im Zusammenhang mit anderen in unserem Laboratorium durchgeführten Arbeiten über Organextrakte diskutiert werden.

Friedelin. Eine weitere, nicht nur aus Schweinehoden-Extrakten, sondern auch aus anderen Organextrakten in unserem Laboratorium isolierte Verbindung verdient eine Erwähnung lediglich aus analytischen Gründen. Es ist dies ein in geringen Mengen isoliertes Keton $C_{30}H_{50}O$, das sich als identisch erwies mit dem Triterpen Friedelin aus Kork¹⁾. Die Isolierung dieser Verbindung kann als ein Hinweis auf den hohen Stand der Arbeitstechnik dienen, mittels welcher sich so geringe Mengen einer Verbindung isolieren lassen, die bisher der Aufmerksamkeit entgangen ist, obwohl sie offenbar eine bei der Benützung von Korkstopfen in minimalen Mengen vorkommende, weitverbreitete Verunreinigung vorstellt.

Der *Rockefeller Foundation* in New York und der *Gesellschaft für Chemische Industrie* in Basel danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil²⁾.

Herstellung der Extrakte.

Das Ausgangsmaterial für unsere Untersuchung wurde durch Acetonextraktion frischer Schweinehoden von den *Wilson Laboratories Inc.*, Chicago, U.S.A. (Ac-Extrakt) und durch Benzolextraktion getrockneter und gepulverter Hoden von der *Gesellschaft für Chemische Industrie* in Basel hergestellt (Bz-Extrakt).

Die Acetonextraktion der frischen Organe wurde in der Kälte mit immer neuen Mengen trockenem Aceton durchgeführt. Die wässrig-acetonischen Auszüge wurden im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand nochmals mit trockenem Aceton extrahiert, um die acetonunlöslichen Körper zu entfernen. Nach dem Abdestillieren des Acetons und Trocknen im Vakuum blieb der Ac-Extrakt zurück.

Die Benzolextrakte wurden durch warme Extraktion des im Vakuum getrockneten und gepulverten Organmaterials erhalten. Aus den klaren Benzolauszügen wurde zuerst das Benzol bei gewöhnlichem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde in Äther-Aceton gelöst, bei -75° ausgefroren und abgenutscht. Die Filtrate wurden eingedampft, nochmals aus Äther-Aceton bei -75° ausgefroren und abgenutscht. Aus dem Filtrat wurden jetzt die Lösungsmittel, zuletzt im Vakuum, abdestilliert, wobei das Bz-Extrakt zurückblieb.

¹⁾ Vgl. *N. L. Drake* und *R. P. Jacobson*, *Am. Soc.* **57**, 1570 (1935).

²⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

Allgemeine Aufarbeitung.

Insgesamt wurden bis jetzt 4,76 kg Ac-Extrakt aus 181 kg Hoden in einem Ansatz und 5,50 kg Bz-Extrakt aus 1119 kg Hoden in drei Ansätzen bearbeitet. Die wichtigsten Phasen der Aufarbeitung bis zu den Fraktionen, welche der chromatographischen Analyse nach der Methode des Durchlauf-Chromatogramms unterworfen wurden, sind in der schematischen Übersicht der Aufarbeitung des Ac-Extraktes dargestellt. Die dort angegebenen Zahlen geben ein Bild über die Mengenverhältnisse der verschiedenen Fraktionen. Die Bz-Extrakte wurden auf grundsätzlich analoge Weise bearbeitet und gaben auch qualitativ ähnliche Ergebnisse, obwohl die Mengen der isolierten Zwischenfraktionen und die der Krystallisate auf verarbeitetes Organmaterial berechnet, viel kleiner waren. Dies ist wahrscheinlich auf die weitergehende Entfernung der Fettstoffe durch Ausfrieren zurückzuführen.

Zu der schematischen Übersicht (vgl. S. 984) fügen wir noch einige allgemeine Bemerkungen und ausführlichere Angaben bei.

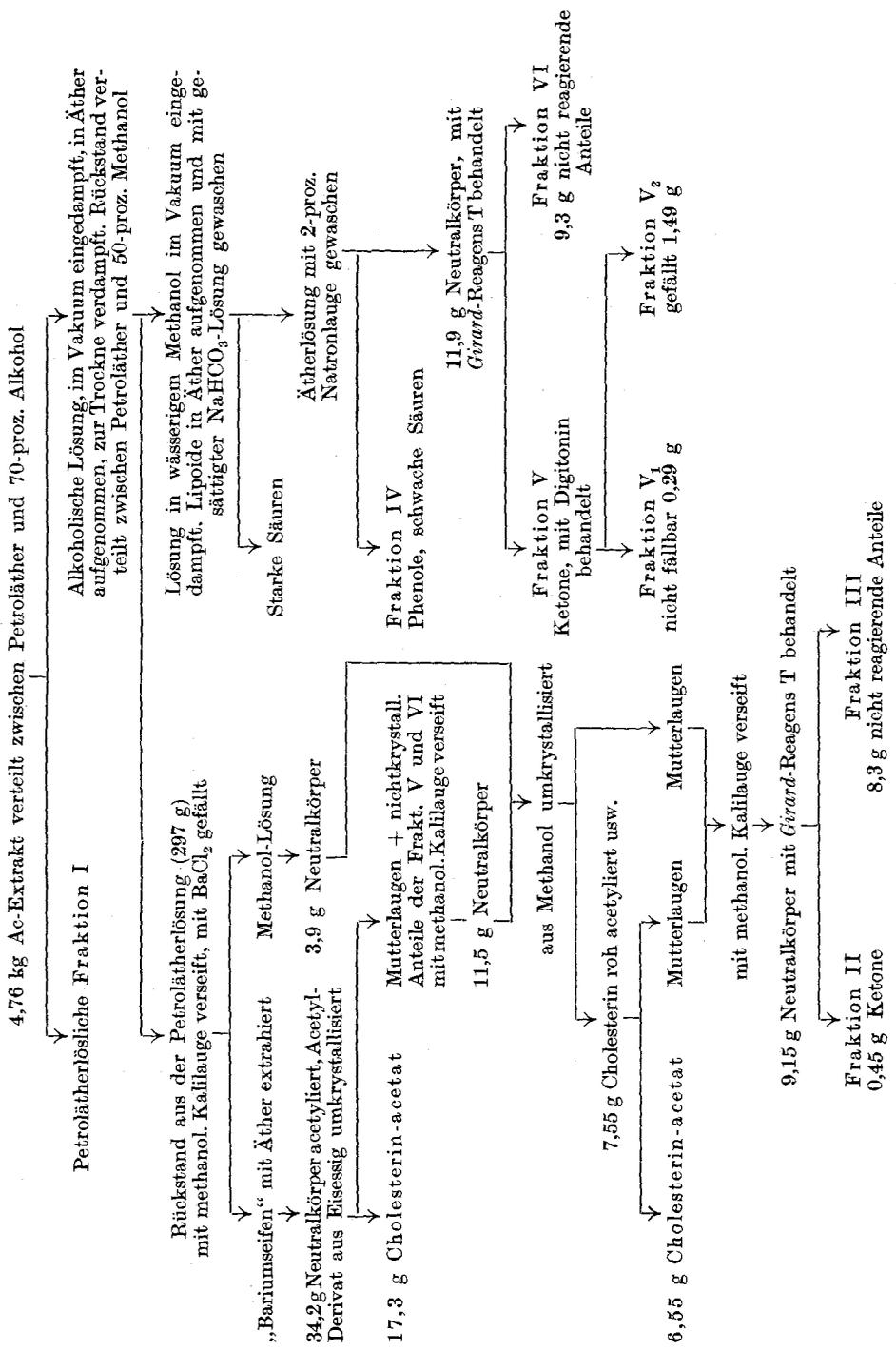
Die Verteilung. Die beiden Extrakte wurden zuerst durch Verteilung zwischen Petroläther und 70-proz. Alkohol in zwei Anteile getrennt. Der grösste Teil der Fette und des Cholesterins blieb dabei in der Petrolätherfraktion I, welche vorläufig nicht weiter untersucht wurde, zurück. Die noch immer stark fett- und cholesterin-haltigen, in 70-proz. wässrigem Alkohol löslichen Lipide wurden weiter zwischen Petroläther und 50-proz. Methanol verteilt. Bei der Bearbeitung des Bz-Extraktes wurde bei zwei Ansätzen statt des 50-proz. Methanols reinstes Äthylenglykol verwendet. Später verliessen wir diese Arbeitsweise, weil die Vorteile des Äthylenglykols durch die Schwierigkeiten, die seine Entfernung bereitet, aufgehoben werden. Die in 50-proz. Methanol löslichen Stoffe wurden in Äther zuerst mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und dann mit Natronlauge gewaschen und mit *Girard*-Reagens T in ketonische und nicht-ketonische Anteile getrennt¹⁾.

Die Verseifung. Die Anteile, welche bei der Verteilung zwischen Petroläther und 50-proz. Methanol (bzw. Äthylenglykol) in Petroläther gelöst blieben, wurden mit methanolischer Kalilauge verseift. Die Verseifung musste energisch und mehrere Male durchgeführt werden. Die schwere Verseifbarkeit von Organextrakten wurde auch von früheren Forschern beobachtet²⁾.

¹⁾ Bis zu diesem Punkte wurden die Vorarbeiten grösstenteils von Herrn Dr. *M. W. Goldberg* durchgeführt, der sie jedoch infolge seines Übertrittes in einen andern Wirkungskreis abbrechen musste.

²⁾ Vgl. z. B. *A. Dimter*, *Z. physiol. Ch.* **271**, 293 (1941).

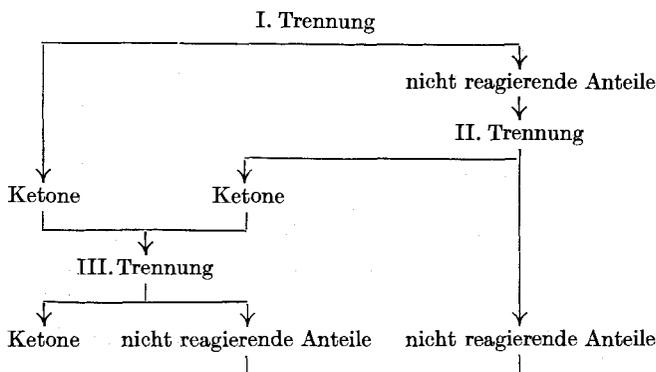
Übersicht



Wir beschreiben hier als Beispiel etwas ausführlicher die Isolierung der nach der Verseifung übrigbleibenden Neutralstoffe aus Ac-Extrakt und die grobe Abtrennung von Cholesterin, welche in der schematischen Übersicht nur kurz angedeutet ist. Die 297 g der erwähnten petrolätherlöslichen Fraktion aus Ac-Extrakt wurden mit 56 g Kaliumhydroxyd, 50 cm³ Wasser und 1 Liter Methanol 6 Stunden am Rückfluss gekocht. Zu der kochenden Lösung wurden langsam 100 g Bariumchlorid in 200 cm³ Wasser zugetropft, wobei sich ein reichlicher Niederschlag von „Bariumseifen“ bildete. Der eine Teil der Neutralstoffe blieb in wässrig-methanolischer Lösung und wurde daraus nach dem Abdestillieren des Methanols durch Extraktion mit Äther, Waschen der Ätherauszüge mit verdünnter Salzsäure, verdünnter Natronlauge, verdünnter Salzsäure, Wasser und Abdestillieren des Äthers gewonnen. Man erhielt so 3,9 g halbester Neutralstoffe. Der grösste Teil der Neutralstoffe schied sich aber zusammen mit den Bariumseifen aus. Die „Bariumseifen“ wurden deswegen im Extraktionsapparat erschöpfend mit Äther extrahiert. Die Ätherauszüge wurden mit verdünnter Salzsäure, verdünnter Natronlauge, verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen, mit Natriumcarbonat getrocknet und der Äther verdampft. Es blieben 34,2 g eines krystallinen, bräunlichen Rückstandes zurück. Um Cholesterin abzutrennen, wurde dieser Rückstand mit 50 cm³ reinem Acetanhydrid 3 Stunden auf 100° erhitzt. Nach dem Erkalten erstarrte das Reaktionsgemisch zu einem Krystallkuchen. Die Krystalle wurden abgesaugt und fraktioniert aus Eisessig umkrystallisiert. Es wurden so 17,3 g rein weisses Cholesterin-acetat vom Smp. 112–113° erhalten. Alle Mutterlaugen von Cholesterin-acetat wurden im Vakuum zur Trockne eingedampft (18,8 g) und zusammen mit nichtkrystallisierten Fraktionen vom Chromatographieren der Fraktion V und VI in 250 cm³ Methanol mit 14 g Kaliumhydroxyd in 14 cm³ Wasser 24 Stunden unter Rückfluss verseift. Nach vorsichtigem Abdestillieren des Methanols wurde Wasser zugegeben und die Suspension mit Äther ausgezogen. Die Ätherauszüge wurden mit verdünnter Natronlauge, verdünnter Salzsäure und verdünnter Natronlauge gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther abdestilliert. Der krystalline Rückstand wog 11,5 g. Er wurde zuerst zusammen mit den aus dem wässrigen Methanol erhaltenen Neutralteilen (3,92 g) aus 200 cm³ Methanol bei –10° umkrystallisiert. Es schieden sich 7,55 g unreines Cholesterin, Smp. 139–140° (sintert ab 135°) aus. Dieses wurde mit 15 cm³ Acetanhydrid, wie beschrieben, acetyliert und aus Eisessig umkrystallisiert, wobei 6,55 g Cholesterin-acetat, Smp. 112–112°, erhalten wurden. Die Mutterlaugen von Cholesterin-acetat und die methanolischen Mutterlaugen von Cholesterin wurden dann wieder mit 6 g Kaliumhydroxyd, 6 cm³ Wasser und 100 cm³ Methanol 24 Stunden am Rückfluss ver-

seift. Nach der üblichen Aufarbeitung des Verseifungsproduktes erhielten wir 9,12 g cholesterinarme, nicht verseifte Neutralstoffe.

Die Behandlung mit *Girard*-Reagens T¹⁾. Die cholesterinarmen Neutralstoffe wurden nun mit *Girard*-Reagens T in ketonische und nicht-ketonische Anteile getrennt. Die Trennung wiederholten wir immer dreimal nach dem folgenden Schema, um eine möglichst vollkommene Aufteilung zu erreichen.



Die Reaktion selbst führten wir immer nach folgender allgemeiner Vorschrift durch: 1 Teil der betr. Fraktion wurde in 10 Teilen absolutem Methanol mit 1,1 Teilen *Girard*-Reagens T und 0,6 Teilen reinstem Eisessig 1 Stunde unter Rückfluss am Wasserbad erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf -5° abgekühlt, mit 10 Teilen Eis versetzt und sofort mit einer eiskalten Lösung von 0,5 Teilen Natriumcarbonat in 10 Teilen Wasser versetzt. Die eiskalte Lösung wurde möglichst schnell bei -5° erschöpfend mit Äther extrahiert, wobei die nicht umgesetzten Anteile in den Äther übergingen. Zu der wässrigen Lösung wurden 10 Teile 4-n. Schwefelsäure zugegeben, die Lösung wurde mit Äther überschichtet und etwa 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Ketone wurden dann erschöpfend mit Äther ausgeschüttelt.

Aus 9,12 g cholesterinarmen, unverseifbaren Neutralstoffen aus Ac-Extrakt erhielten wir 0,45 g der Ketonfraktion II und 8,3 g nicht-ketonische Anteile III.

Nach einer ähnlich durchgeführten Verseifung der Bz-Extrakte erhielten wir 14,4 g cholesterinarme, unverseifbare Neutralstoffe, aus welchen mit *Girard*-Reagens T 0,96 g einer Ketonfraktion II und 13,0 g einer nicht-ketonischen Fraktion III erhalten wurden.

Die chromatographische Analyse der Fraktionen II, III, V und VI.

Die Keton-Fraktionen II wurden einer sorgfältigen chromatographischen Analyse unterworfen. Als Beispiel soll das Chro-

¹⁾ A. *Girard* und G. *Sandulesco*, Helv. **19**, 1095 (1936).

matogramm der Fraktion II aus Bz-Extrakten dienen. 0,96 g Ketone wurden in 50 cm³ Petroläther-Benzol (1:1) gelöst und über 30 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* (Aktivität II)¹⁾ chromatographiert. Zum Eluieren wurden je 40 cm³ des angegebenen Lösungsmittels verwendet.

Nr.	Eluierungsmittel	Eluat g	Dessen Beschaffenheit
1—2	Petroläther-Benzol (1:1)	0,02	farbloses Öl
3—4	„ „ „	0,085	teilweise krystallin
5—8	„ „ „	0,05	gelbliches Öl
9—11	Benzol	0,075	„ „
12	Benzol-Äther (40:1)	0,02	„ „
13—14	„ „ (20:1)	0,065	„ „
15	„ „ (10:1)	0,04	teilweise krystallin
16—21	„ „ (10:1)	0,19	weisse Krystalle
22—23	„ „ (4:1)	0,065	teilweise krystallin
24—28	„ „ (2:1)	0,10	farbloses Öl
29—30	„ „ (2:3)	0,01	„ „
31	Äther	0,01	„ „
32—36	Äther-Methanol (40:1)	0,15	gelbliches Öl
37—40	„ „ (20:1)	0,06	gelbliches Harz
41—42	„ „ (2:1)	0,035	„ „
43—48	Methanol	0,04	„ „

Die teilweise krystallinen Fraktionen 3—4 wurden in wenig Benzol gelöst und die Lösung mit Methanol versetzt. Nach einigem Stehen schieden sich 4,2 mg dünner weisser Nadeln vom Smp. 255—258° aus, welche als Friedelin identifiziert werden konnten. Die Fraktionen 15—23 des Chromatogramms wurden aus Methanol umkrystallisiert. Es wurden insgesamt 113,2 mg weisser Blättchen vom Smp. 182—191° erhalten, welche hauptsächlich aus einem Gemisch der Verbindungen A und B bestanden.

Durch Chromatographieren der Fraktion II aus Ac-Extrakten wurden aus dem Benzol-Äther-(10:1)-Eluat 79,8 mg der Verbindungen A und B vom Smp. 182—191° erhalten.

Keton-Fractionen V. Die Ketone aus den Anteilen, die durch Verteilung zwischen Petroläther und 50-proz. Methanol (bzw. Äthylenglykol) erhalten wurden, gaben beim Chromatographieren ähnliche Ergebnisse wie die Fraktion II.

Die Fraktion V aus dem Ac-Extrakt wurde vor dem Chromatographieren mit Digitonin gefällt und die Digitonide nach *R. Schönheimer* und *H. Dam*²⁾ gespalten. 1,49 g der Ketone waren durch Digitonin fällbar und 0,29 g durch Digitonin nicht fällbar. Aus dem

¹⁾ *H. Brockmann* und *H. Schodder*, B. **74**, 73 (1941).

²⁾ *Z. physiol. Ch.* **215**, 59 (1933).

Benzol-Äther(10:1)-Eluat der durch Digitonin fällbaren Fraktion (V₂) erhielten wir 16,7 mg des Gemisches der Verbindungen A und B.

Die durch Digitonin nicht fällbaren Ketone (V₁) wurden auf androgene Wirkstoffe im Kapaunenkammtest geprüft, weil in dieser Fraktion die bekannten Androgene wie Testosteron und Androsteron zu erwarten waren. Es wurden nur etwa 1,2 H. K. E./kg Hoden gefunden. Durch sorgfältiges Chromatographieren gelang es nicht, aus dieser Fraktion krystalline Verbindungen zu erhalten.

Fraktion V aus Bz-Extrakt (0,99 g) wurde direkt chromatographiert. Beim Auflösen in 80 cm³ Petroläther-Benzol (1:1) blieben 47 mg weisser schwerlöslicher Krystalle ungelöst zurück, die nach Umkrystallisieren aus Methanol bei 268—270° schmolzen (Verbindung C). Aus dem Benzol-Äther(10:1)-Eluat nach dem Chromatographieren wurden auf übliche Weise 25,4 mg des Gemisches der Verbindungen A und B erhalten.

Die nicht krystallisierenden Anteile der Fraktionen V wurden alkalisch verseift (s. S. 983).

Fraktionen III. Die mit *Girard*-Reagens T nicht reagierenden Anteile, 8,3 g, aus dem Ac-Extrakt und 13,0 g aus dem Bz-Extrakt wurden jeder für sich über 30-facher Menge Aluminiumoxyd nach *Brockmann* (Aktivität II) chromatographiert. Aus mehreren Fraktionen wurden Krystallisate erhalten, die vorläufig noch grössten-teils nicht genauer untersucht wurden.

Besonders leicht liess sich durch Umkrystallisieren der Petroläther-Benzol-(1:1)-Eluate aus Pentan das $\Delta^{3,5}$ -Cholestadienon-(7) isolieren. Die 7-Keto-Gruppe dieser Verbindung reagiert nicht oder nur schwer mit *Girard*-Reagens T, wie schon *Wintersteiner* und *Bergström* beobachtet haben¹⁾. Aus Ac-Extrakt wurden 114,3 mg, aus Bz-Extrakt 129,0 mg rohes $\Delta^{3,5}$ -Cholestadienon-(7) mit dem Smp. 100—110° erhalten.

Durch Umkrystallisieren der Äther-Methanol(10:1)-Eluate aus Essigester erhielten wir 59,5 mg der rohen Verbindung D mit dem Smp. 224—226°.

Fraktionen VI. Besondere Erwähnung verdient die Fraktion VI aus Bz-Extrakt, weil wir aus ihr die Verbindung E isolierten. 6,42 g dieser Fraktion wurden in 80 cm³ Petroläther-Benzol (1:1) gelöst, wobei eine weisse krystalline Verbindung ungelöst blieb. Nach dem Umkrystallisieren aus Essigester wurden 9,0 mg weisse, sehr feine Nadeln mit dem Schmelzpunkt und Sublimationspunkt 270° erhalten (Verbindung E). Durch chromatographische Analyse des in Petroläther-Benzol gelösten Anteils an 150 g Aluminiumoxyd

¹⁾ Vgl. *Bergström*, Arkiv Kemi, Mineral. Geol, **16A**, Heft 10 (1942).

nach *Brockmann* (Aktivität II) wurden aus den Äther-Methanol-(10:1)-Eluaten weitere 24,9 mg derselben Verbindung erhalten. Die andern, nicht krystallisierenden Anteile der Fraktionen VI wurden alkalisch verseift (s. S. 983).

Isolierung und Reinigung einzelner Verbindungen.

Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) und Allo-pregnanol-(3 β)-on-(20). Verbindungen A und B. 113 mg des Krystallisates aus Fraktion II des Bz-Extraktes vom Smp. 182—191° (s. S. 987) wurden aus 2 cm³ Methanol und dann aus 0,5 cm³ Alkohol + 2 cm³ Hexan umkrystallisiert. Es wurden 30 mg weisser Blättchen vom Smp. 189—190° erhalten. Diese wurde im Hochvakuum bei 0,01 mm zwischen 130—140° sublimiert; das Produkt schmolz dann bei 190—191°. Es gab eine positive Reaktion mit Tetranitromethan, eine schwache *Zimmermann*-Reaktion und war fällbar mit Digonin. Die Analyse des sublimierten Produktes gab folgende Werte.

3,807; 3,736 mg Subst. gaben 11,064; 10,861 mg CO₂ und 3,506; 3,462 mg H₂O

C ₂₁ H ₃₂ O ₂	Ber. C 79,70	H 10,19%
C ₂₁ H ₃₄ O ₂	„ „ 79,19	„ 10,76%
	Gef. „ 79,31; 79,34	„ 10,30; 10,37%

$[\alpha]_D = +50^\circ (\pm 2^\circ)$; (c = 1,08 in Feinsprit)

Die Analysenwerte und die hohe spez. Drehung deuteten auf ein Gemisch von Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) mit einer höher drehenden, gesättigten Verbindung. Um das Gemisch zu trennen, wurden alle Mutterlaugen nach dem Umkrystallisieren, sowie die 25 mg des Gemisches vom Smp. 182—191° der Fraktion V aus Bz-Extrakten zur Trockne eingedampft. Auf diese Weise wurden 116 mg des Gemisches mit einem $[\alpha]_D = +39^\circ (\pm 1^\circ)$; (c = 2,32 in Feinsprit) erhalten. Diese wurden mit 4 cm³ trockenem Pyridin und 3,5 cm³ Acetanhydrid über Nacht kalt acetyliert. Pyridin und Acetanhydrid wurden im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Äther aufgenommen, die ätherische Lösung mit verdünnter Salzsäure und Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und abgedampft. Der Rückstand (130 mg) schmolz unscharf von 103 bis 111°.

$[\alpha]_D = +29,6^\circ (\pm 1^\circ)$; (c = 2,60 in Feinsprit)

Die Wiederholung der Acetylierung ergab 132 mg roher Acetyl-Derivate mit denselben Eigenschaften. Diese 132 mg wurden in 20 cm³ Benzol gelöst und über 6,5 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* (Aktivität I) chromatographiert. Für die Eluierung wurden je 20 cm³ Lösungsmittel verwendet.

Die Fraktionen 7—17 wurden dreimal aus Methanol umkrystallisiert und bei 0,02 mm zwischen 120—125° sublimiert. Das Sublimat zeigt eine positive Tetranitromethan-Reaktion, schmolz bei 141—143°

und gab mit einem synthetischen Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20)-acetat vom Smp. 143–145° keine Schmelzpunktserniedrigung.

3,673 mg Subst. gaben 10,36 mg CO₂ und 3,18 mg H₂O

C₂₃H₃₄O₃ Ber. C 77,05 H 9,56%
Gef. „ 76,97 „ 9,69%

Nr.	Eluierungsmittel	Eluat mg
1–3	Benzol	3
5–6	Benzol-Äther (100:1)	21
7	„ „ „	12
8–11	„ „ (50:1)	28,5
12–14	„ „ (20:1)	11,5
15	„ „ (10:1)	2
16	„ „ (5:1)	2
17	„ „ (1:1)	2,5
18	Äther	1
19–20	Äther-Methanol (100:1)	29,5
20–21	„ „ (50:1)	9

Die Mutterlaugen vom Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20)-acetat und die Fraktionen 1–7, 18–20 des letztbeschriebenen Chromatogramms wurden zusammen gespült und zur Trockne verdampft. Rückstand (100 mg) wurde mit 50 mg Kaliumcarbonat in 0,5 cm³ Wasser und 10 cm³ Methanol 1 Stunde am Rückfluss verseift.

Das Methanol aus dem Verseifungsprodukt wurde im Vakuum abdestilliert, der Rückstand mit Wasser versetzt und mit Äther und Benzol ausgeschüttelt. Das nach dem Abdestillieren der Lösungsmittel erhaltene Produkt wog 89,9 mg. Ein Versuch, die gesättigte Verbindung B vom Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) durch Chromatographie abzutrennen, misslang; es ist nicht gelungen, eine Fraktion mit einer negativen Tetranitromethan-Reaktion zu erhalten. Nach mehreren Modellversuchen mit synthetischen Gemischen wurde die Oxydation mit Osmiumtetroxyd¹⁾ als das beste Verfahren angewandt. Die ungesättigten Verbindungen gaben nach der Oxydation Glykole, welche sich von unveränderten gesättigten Verbindungen quantitativ durch Chromatographieren abtrennen liessen.

48 mg des Gemisches wurden in 1 cm³ Methylendichlorid gelöst, 4 cm³ absoluter Äther, 3 Tropfen Pyridin und 15 mg Osmiumtetroxyd in 1,5 cm³ absolutem Äther zugegeben und 7 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Schon nach einigen Stunden schied sich ein bräunlicher, krystalliner Niederschlag aus der Lösung aus. Das Lösungsmittel wurde nach beendeter Reaktion verdampft; zum Rückstand wurden 1,8 cm³ 0,1-n. Kalilauge und 250 mg Mannit

¹⁾ R. Criegee, A. 522, 75 (1936); 550, 99 (1941).

zugegeben und das Gemisch 12 Stunden geschüttelt. Nach Zugabe von einigen cm³ Methylendichlorid, 1,8 cm³ 0,1-n. Kalilauge und 250 mg Mannit wurde weitere 12 Stunden geschüttelt. Die Steroide wurden jetzt mit Methylendichlorid ausgeschüttelt, die Methylendichloridlösung mit 0,1-n. Kalilauge und Wasser gewaschen und zur Trockne verdampft. Der etwas bräunlich gefärbte Rückstand (46 mg) wurde in 40 cm³ Benzol gelöst und über 2 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* (Aktivität II) chromatographiert. Für die Eluierung wurden je 20 cm³ Lösungsmittel verwendet.

Nr.	Eluierungsmittel	Eluat mg	$[\alpha]_D$
1—2	Benzol	4,0	
3	„	7,4	+ 85° ($\pm 4^0$) (c=0,493 in Chloroform)
4	„	3,5	+ 98° ($\pm 9^0$) (c=0,234 in Chloroform)
5—6	„	2,0	
7—8	Benzol-Äther (10:1)	1,0	
9—10	Äther-Methanol (100:1)	Spuren	
11	„ „ (20:1)	6,0	
12	„ „ (10:1)	19,5	+ 60° ($\pm 1,5^0$) (c=1,30 in Feinsprit)
13	„ „ „	4,6	
14	„ „ (3:1)	4,0	

Die hochdrehenden Benzoleluate 3—4 wurden aus wenig Alkohol umkristallisiert. Es wurden 5,0 mg weisse Blättchen vom Smp. 194—198° erhalten. Für die Analyse wurde bei 0,005 mm bei 125° sublimiert.

2,969 mg Subst. gaben 8,623 mg CO₂ und 2,872 mg H₂O
 $C_{21}H_{34}O_2$ Ber. C 79,19 H 10,76%
 Gef. „ 79,26 „ 10,82%

Die Verbindung gab keine Gelbfärbung mit Tetranitromethan und keine Schmelzpunktserniedrigung mit Allo-pregnan-ol-(3 β)-on-(20).

Die Fraktionen 12 und 13, welche durch Osmium-Verbindungen etwas gefärbt waren, wurden 4-mal aus Essigester umkristallisiert. Es wurden weisse Nadelchen vom Pregnan-triol-(3 β , 5, 6)-on-(20) mit dem Smp. 229° erhalten. Dieses war mit einem nach *M. Ehrenstein*¹⁾ aus Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) durch Oxydation mit Osmiumtetroxyd hergestellten Präparat identisch.

Zur Analyse wurde 24 Stunden bei 110° im Hochvakuum getrocknet.

2,736 mg Subst. gaben 7,164 mg CO₂ und 2,445 mg H₂O
 $C_{21}H_{34}O_4$ Ber. C 71,96 H 9,78%
 Gef. „ 71,46 „ 10,00%

¹⁾ J. Org. Chem. 4, 506 (1939).

Die Isolierung dieser Verbindung ist ein weiterer Beweis für das Vorkommen von Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20).

Verbindung C.

Die rohe Verbindung C wurde 3-mal aus heissem Methanol umkrystallisiert. Sie bildete dann schön ausgebildete sechseckige Täfelchen vom Smp. 268° (Sintern ab 257°). *Hirano* gibt für Testalolon den Smp. 258—264° an.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum 10 Stunden bei 130° getrocknet.

3,574 mg Subst. gaben 9,948 mg CO₂ und 3,115 mg H₂O

C ₂₁ H ₃₂ O ₃	Ber. C 75,86	H 9,70%
	Gef. „ 75,96	„ 9,75%

Die Verbindung C gab keine Gelbfärbung mit Tetranitromethan und reduzierte langsam eine ammoniakalische Silberoxydlösung. Die spez. Drehung wurde wegen der Schwerlöslichkeit in Pyridin bestimmt: $[\alpha]_D = -48^\circ (\pm 2^\circ)$ ($c = 1,065$ in Pyridin), gemessen etwa 30 Minuten nach Auflösung, nach 48 Stunden war $[\alpha]_D = -39^\circ (\pm 2^\circ)$.

Dioxim. 10,8 mg Verbindung C, welche von der Drehungsbestimmung zurückerhalten worden waren, wurden mit Hydroxylaminacetat aus 150 mg Hydrochlorid und 300 mg Natriumacetat in 40 cm³ Alkohol kurz erwärmt und dann über Nacht stehen gelassen. Der Alkohol wurde aus dem Reaktionsgemisch im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Äther aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Aus den Ätherauszügen wurde 13 mg Rückstand erhalten, welcher aus wenig Alkohol 2mal umkrystallisiert wurde. Die sechseckigen Blättchen schmolzen dann bei 238—239° (unter Braunfärbung und Zersetzung). *Hirano* gibt für Testalolon-dioxim einen Smp. 234—235° (bei 238° unter Schäumen) an.

Verbindung D. Cholestan-triol-(3 β , 5, 6 trans).

Die rohe Verbindung D schmolz um 224—226°, gab keine Gelbfärbung mit Tetranitromethan und zeigte eine schwache positive Drehung: $[\alpha]_D = +3,8^\circ (\pm 1,9^\circ)$; ($c = 1,065$ in Feinsprit).

Fällung mit Digitonin. 16 mg Verbindung D in 3 cm³ Alkohol wurden mit einer Lösung von 70 mg Digitonin in 4 cm³ Alkohol und 0,5 cm³ Wasser versetzt. Nach etwa ½ Stunde setzt die Ausscheidung des schön krystallisierenden Digitonids ein. Nach 48 Stunden wurde das Digitonid zentrifugiert, mit 2 cm³ Alkohol und 2mal mit je 10 cm³ Äther gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum wurden 54,1 mg weisse Nadelchen vom Smp. um 265° (Zers.) erhalten. Die Zersetzung des Digitonids erfolgte durch Lösen in 1 cm³ Pyridin und Fällen des Digitonins mit 20 cm³ Äther. Das Digitonin wurde abzentrifugiert und 2mal mit je 10 cm³ Äther gewaschen. Ätherlösungen wurden mit Wasser, verdünnter Schwefel-

säure und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne verdampft. Der Rückstand wog 13,9 mg, schmolz bei 236–241° und zeigte eine unveränderte spez. Drehung von $[\alpha]_D = +3,2^\circ (\pm 2,1^\circ)$; ($c = 0,927$ in Feinsprit).

Zur Analyse wurde 2mal aus Essigester umkrystallisiert und bei 100–120° im Hochvakuum getrocknet.

3,571 mg Subst. gaben 10,074 mg CO₂ und 3,707 mg H₂O

C₂₇H₄₈O₃ Ber. C 77,09 H 11,50%
Gef. „ 76,98 „ 11,61%

Diacetyl-Derivat. 10 mg der aus den Mutterlaugen erhaltenen Verbindung D wurden mit 0,5 cm³ Pyridin und 0,4 cm³ Acetanhydrid über Nacht kalt acetyliert. Das auf übliche Weise isolierte Acetylderivat wurde aus Chloroform-Hexan zweimal umkrystallisiert und bei 0,01 mm und 170° sublimiert. Es schmolz bei 166° und gab mit einem Vergleichspräparat keine Schmelzpunktserniedrigung.

3,433 mg Subst. gaben 9,228 mg CO₂ und 3,124 mg H₂O

C₃₁H₅₂O₅ Ber. C 73,76 H 10,39%
Gef. „ 73,36 „ 10,18%

Verbindung E.

Die 24,9 mg der rohen Verbindung E wurden 2mal aus etwa 3 cm³ Essigester umkrystallisiert. Die weissen Nadeln vom Smp. 270–280° (sublimiert stark) wurden 10 Stunden bei 120–130° im Hochvakuum getrocknet und analysiert.

3,120 mg Subst. gaben 7,496 mg CO₂ und 2,581 mg H₂O

1,999 mg Subst. gaben 0,209 cm³ N₂ (17°, 726 mm)

C₁₃H₂₂O₂N₂ Ber. C 65,51 H 9,31 N 11,76%
Gef. „ 65,57 „ 9,26 „ 11,75%

Die Verbindung zeigte keine Gelbfärbung mit Tetranitromethan. Die spez. Drehung war $[\alpha]_D = +3,5^\circ (\pm 3,5^\circ)$; ($c = 0,57$ in Chloroform). Da es sich um eine Aminosäure handeln könnte, wurde mit Ninhydrin geprüft, die Ninhydrin-Reaktion war aber negativ. Die geringen Mengen erlaubten nicht, die Verbindung E gründlicher zu reinigen und zu untersuchen; die Resultate der Elementaranalyse sind deswegen vielleicht nicht ganz zuverlässig.

$\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7).

Das rohe $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7) wurde mehrere Male aus wässrigem Aceton umkrystallisiert, wobei der Schmelzpunkt auf 114,5° stieg. Die Verbindung färbte sich mit Tetranitromethan gelb und gab mit einem synthetischen $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7) keine Schmelzpunktserniedrigung. Sie besass ein sehr charakteristisches Spektrum im U. V. mit einem Maximum bei 280 m μ , $\log \epsilon = 4,38$. Die spez. Drehung war $[\alpha]_D = -305^\circ (\pm 5^\circ)$; ($c = 0,845$ in Chloroform). Ein nach A. Windaus und C. Resau¹⁾ hergestelltes Vergleichspräparat zeigte dasselbe Maximum der Absorption im U. V. und eine spez. Drehung $[\alpha]_D = -306^\circ (\pm 4)$; ($c = 0,974$ in Chloroform).

¹⁾ B. 48, 851 (1915).

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

3,708 mg Subst. gaben 11,454 mg CO₂ und 3,574 mg H₂O

C ₂₇ H ₄₂ O	Ber. C 84,75	H 11,07%
	Gef. „ 84,30	„ 10,79%

Friedelin.

Die 7,2 mg des rohen Friedelins, welche insgesamt isoliert wurden, gaben nach Umkrystallisieren aus Benzol-Methanol dünne farblose Prismen. Für die Analyse wurde bei 0,02 mm bei 170° sublimiert. Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt mit einem Muster Friedelin aus Kork war 258°.

3,717 mg Subst. gaben 11,49 mg CO₂ und 3,90 mg H₂O

C ₃₀ H ₅₀ O	Ber. C 84,44	H 11,81%
	Gef. „ 84,36	„ 11,74%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von den Herren *Hs. Gubser* und *W. Manser* ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

99. Über Assimilation in vitro

von **Emil Baur** und **Florian Niggli**.

(I. IV. 43.)

Wir müssen an einer Angabe in unserer kürzlichen, gleichnamigen Mitteilung¹⁾ wegen eines rechnerischen Versehens eine Korrektur anbringen. Es ist dort ein Gasraum von 700 cm³ für die Berechnung der insgesamt gewonnenen Menge Sauerstoff angesetzt worden. Eine Nachmessung hat jedoch ergeben, dass effektiv nur 400 cm³ Fassraum in der Apparatur vorhanden waren. Damit werden die richtigen Werte im Versuch mit

	25 cm ³ Phytol mit 50 mg Chlorophyll rein
	50 cm ³ Glycerin mit 25 mg Methylenblau
erhalten:	8,2 mg Formaldehyd
	5,3 mg Sauerstoff
	stöchiometrisch gleich 5,0 mg Formaldehyd.

Dies sind 62% Sauerstoff vom Sollwert. Wahrscheinlich ist eine gewisse Sauerstoffzehrung durch Oxydation der beiden Farbstoffe die Ursache des Fehlbetrages.

Wir haben inzwischen die Anordnung abgeändert, um uns den natürlichen Verhältnissen anzunähern. Das Gemisch der Glycerin-Phytol(Geraniol)-Phasen wird mit Lecithin zu einer Paste verrieben,

¹⁾ Helv. **26**, 251 (1943).