

63. Untersuchungen über Organextrakte.

(10. Mitteilung¹⁾).

Isolierung von Testosteron aus Testes des Pferdes

von E. Tagmann, V. Prelog und L. Ruzicka.

(26. XII. 45.)

Die Frage, ob das Testikelhormon bei verschiedenen Tierarten identisch und einheitlich sei, wurde bisher wenig behandelt²⁾. Eine der Ursachen dafür ist die schwierige Beschaffung so grosser Mengen des Organmaterials, wie sie bei der kleinen Hormonkonzentration in Testes für eine erfolgreiche Untersuchung notwendig sind. Die von E. David³⁾ im Laboratorium von E. Laqueur durchgeführte und von M. W. Goldberg⁴⁾ in unserem Laboratorium auf Grund einer anderen Methodik wiederholte Isolierung von Testosteron aus Stier-testes blieb deshalb bis heute die einzige in der Literatur erwähnte Isolierung eines chemisch definierten androgenen Wirkstoffes aus Testikeln.

Es ist uns nun gelungen, das Testosteron aus dem Acetonextrakt einer verhältnismässig kleinen Menge (13,1 kg) des Testesgewebes von jungen Pferden, also einer zweiten Tierart zu isolieren.

Die Isolierung, welche im experimentellen Teil ausführlicher beschrieben ist, führten wir zwar unter möglichst milden Bedingungen durch; da es sich jedoch um sehr kleine Mengen des Wirkstoffes handelt, kann man insbesondere in Bezug auf die erforderliche Behandlung mit Alkali daraus nicht schliessen, ob Testosteron in den Testes frei vorkommt oder gebunden in Form einer labilen Verbindung vorhanden ist, wie aus gewissen früher diskutierten Beobachtungen²⁾ hervorzugehen scheint. Die acet unlöslichen neutralen Lipoiden aus Testes wurden mit Girard-Reagens T behandelt und das erhaltene Keton-Konzentrat im Hochvakuum destilliert. Aus den bis 160° übergehenden Anteilen liess sich eine mit Digitonin nicht fällbare Fraktion abtrennen, aus welcher durch chromatographische Analyse an Aluminiumoxyd und Sublimation im Hochvakuum der krystalline Wirkstoff gewonnen wurde. Durch die physiologische Wirksamkeit, das Absorptionsspektrum sowie Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt liess sich die isolierte Verbindung mit Testosteron identifizieren.

¹⁾ 9. Mitt. Exper. 1, 64 (1945).

²⁾ Vgl. L. Ruzicka und V. Prelog, Helv. 26, 975 (1945).

³⁾ Z. physiol. Ch. 233, 281 (1935).

⁴⁾ Ergebn. Vitamin-Hormonf. 1, 388 (1938).

Wir danken Hrn. Dr. A. Wettstein von der CIBA Aktiengesellschaft in Basel für die Organisierung der Sammlung von Organmaterial und Hrn. Dr. E. Tschopp von der biologischen Abteilung derselben Firma für die Ausführung physiologischer Prüfungen.

Für die Durchführung dieser Arbeit konnten Mittel aus den Eidg. Arbeitsbeschaffungskrediten verwendet werden.

Experimenteller Teil¹⁾.

Das von uns verarbeitete Organmaterial wurde im Frühjahr 1944 im Jura-Gebiet bei der üblichen Kastration gesammelt²⁾. Die Testes wurden sofort in Trockeneis verpackt und nach Zürich versandt, wo man sie bis zur Verarbeitung bei -10° aufbewahrte. Das Drüsengewebe aus 950 Stück Testes, das sorgfältig von anderen Geweben befreit wurde, wog 13,1 kg. Nach Zerkleinerung mit einer Fleischhackmaschine wurde das breiige Material mit dem gleichen Gewicht Wasser bei Zimmertemperatur ausgezogen und der Rückstand abzentrifugiert. Das mit Wasser ausgezogene, abzentrifugierte Gewebe wurde mit 14,25 kg wasserfreiem Natriumsulfat in einer Kugelmühle zermahlen und mit kaltem Aceton extrahiert. Nach Durchlassen von etwa 215 Liter Lösungsmittel war die Extraktion praktisch beendet. Das Aceton wurde im Stickstoffstrom abdestilliert und der Rückstand mit 1,5 Liter absolutem Äther behandelt, wobei 14,8 g eines in Äther unlöslichen Niederschlages zurückblieben. Aus der ätherischen Lösung liessen sich saure Anteile durch Durchtropfenlassen von 0,1-n. Kalilauge entfernen. Da die alkalischen Auszüge mitgerissene neutrale Bestandteile enthielten, wurden die daraus nach Ansäuern und Extraktion mit Äther erhaltenen Anteile nochmals der Behandlung mit 0,1-n. Kalilauge unterworfen. Die Behandlung mit Lauge wurde in Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Die neutralen, teilweise krystallinen Inhaltsstoffe, welche nach dem Eindampfen der ätherischen Lösungen zurückblieben, wogen insgesamt 43 g. Durch Schütteln mit 100 cm³ leicht siedendem Petroläther und Umkrystallisieren der ungelösten Krystalle aus Aceton liessen sich daraus 5,85 g reines Cholesterin abtrennen. Der Rest der neutralen Anteile (37,1 g; Anreicherung 1 : 350) wurde dreimal mit Girard-Reagens T³⁾ behandelt. Die abgetrennten „Ketone“ (3,28 g; Anreicherung 1 : 4000) besaßen eine androgene Wirksamkeit von etwa 50 H.K.E./kg Drüsengewebe, während in den mit Girard-Reagens T nicht reagierenden Anteilen (33,5 g) etwa 10 H.K.E./kg Drüsengewebe enthalten waren⁴⁾.

Durch Destillation der „Ketone“ im Hochvakuum erhielten wir 610 mg (Anreicherung 1 : 21500) eines bis 160° übergehenden Destillates, welches den grössten Teil der Androgene enthielt, indem die physiologische Prüfung eine Wirksamkeit von 30–40 H.K.E./kg Drüsengewebe ergab. Durch Fällung mit 3,0 g Digitonin in 300 cm³ 80-proz. Alkohol liessen sich daraus 105 mg eines unlöslichen Digitonids entfernen, während die nicht gefällten Anteile nach üblicher Aufarbeitung 490 mg wogen (Anreicherung 1 : 26700). Diese letzteren wurden in Benzol gelöst und über 15 g Aluminiumoxyd (Aktivität 3–4) chromatographiert (vgl. Tabelle 1), wobei Fraktionen von je 25 cm³ Eluat getrennt aufgefangen wurden.

Die Fraktionen 5–6, welche ein $[\alpha]_D = +77^{\circ} \pm 3^{\circ}$ ($c = 0,83$ in Chloroform) zeigten, liessen sich durch Destillation im „molecular still“ bei 0,01 mm und einer Badtemperatur von 110° weiter reinigen. Aus dem krystallinen Destillat konnten durch Waschen mit wenig Äther die öligen Anteile abgetrennt werden, worauf die Krystalle im Rohr bei 110°

¹⁾ Die Schmelzpunkte wurden unter dem Mikroskop bestimmt, Fehlergrenze $\pm 2^{\circ}$.

²⁾ Es handelte sich meistens um einjährige, also geschlechtlich nicht reife Tiere.

³⁾ Vgl. Helv. **26**, 986 (1943).

⁴⁾ Die Prüfung auf androgene Wirksamkeit wurde nach *Fussgänger* durchgeführt. Die geprüften Fraktionen wurden in Sesamöl je zwei Kapaunen einmal täglich während 10 Tagen aufgefingelt. Wir geben die androgene Wirksamkeit in internationalen Hahnenkamm-Einheiten an: 1 H.K.E. = 15 γ Testosteron.

und 0,01 mm sublimiert wurden. Das Sublimat, welches 2,8 mg (Anreicherung 1 : 4 500 000) wog, bestand aus einem krystallinen (A) und einem glasigen (B) Anteil, welche mechanisch getrennt wurden.

Tabelle 1.

Nr.	Eluierungsmittel	Eluat mg	Beschaffenheit
1—4	Benzol	360	gelb, ölig
5—6	„	7,5	farblos, teilweise krystallin
7—13	„	30	farblos, teilweise krystallin
14—20	Äther	50	gelb, ölig
21—27	Methanol	20	gelb, ölig

Die Fraktion A (1,7 mg) schmolz bei 151—153° und gab mit authentischem Testosteron keine Schmelzpunktserniedrigung. Die Verbindung zeigte in alkoholischer Lösung das für α, β -ungesättigte Ketone charakteristische Absorptionsmaximum bei 240 $m\mu$, $\log \epsilon = 4,2^1$). 144 γ der Verbindung besaßen im Hahnenkamm-Test nach *Fussgänger* eine androgene Wirksamkeit von etwa 10—13 H.K.E. (entspr. 150—195 γ Testosteron).

Die Fraktion B (1,1 mg) wurde auf übliche Weise in das Oxim übergeführt, welches nach zweimaligem Umlösen aus wässrigem Methanol farblose Nadelchen vom Smp. 217—220° bildete. Für das Testosteron-oxim ist in der Literatur der Schmelzpunkt 222 bis 223°²⁾ angegeben.

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

64. Zur Kenntnis der Triterpene.

(104. Mitteilung³⁾)

Überführung des Breïns in epi- α -Amyrin

von G. Büchi, O. Jeger und L. Ruzicka.

(12. II. 46.)

Das im Manila-Elemiharz in geringer Menge vorkommende Triterpendiol Breïn ist schwer zugänglich und wurde deswegen nur wenig untersucht. *Vesterberg*⁴⁾ stellte als erster die richtige Bruttoformel des Breïns $C_{30}H_{50}O_2$ fest. Durch Überführung in das Diacetat $C_{34}H_{54}O_4$ wurden zwei Hydroxyle nachgewiesen. Die Oxydation des Breïns mit Chromsäure gibt nach *Rollet*⁵⁾ eine Dicarbonyl-Verbindung $C_{30}H_{46}O_2$, wodurch die beiden Hydroxylgruppen als sekundär oder primär erkannt wurden. *Morice* und *Simpson*⁶⁾ bestätigten später die

¹⁾ Für die Aufnahme des Absorptionsspektrums danken wir Herrn *E. Heilbronner*.

²⁾ *Helv.* **18**, 1275 (1935).

³⁾ 103. Mitt. *Helv.* **29**, 360 (1946).

⁵⁾ *M.* **53—54**, 231 (1929).

⁴⁾ *B.* **39**, 2467 (1906).

⁶⁾ *Soc.* **1942**, 198.