

filtriert, das Filtrat eingedampft (Badtemperatur höchstens 50°) und in einer geeigneten Menge 70-proz. Alkohol aufgenommen. Ein aliquoter Teil, entsprechend ca. 1000 counts per min., wurde ohne weitere Reinigung papierchromatographiert¹⁾. Auf den entwickelten und getrockneten Papierchromatogrammen wurden mittels eines speziell konstruierten *Geiger-Müller-Zählrohres* die radioaktiven Flecken quantitativ ausgewertet²⁾. Es soll speziell noch einmal darauf hingewiesen werden, dass bei der Herstellung von Homogenaten, mit denen diese Hydroxylierung ausgeführt werden soll, jede Anwendung von Druck irgendwelcher Art (Gewebepresse, dicht sitzender Homogenisator) vermieden werden muss.

SUMMARY.

The capacity of rat liver homogenates for the metabolism of different free bile acids has been established. The inhibition by different substances is discussed. Some conditions for the 7 α -hydroxylation of tauro-desoxycholic acid have also been investigated.

Ich danke Herrn Prof. Dr. *Sune Bergström* für die Unterstützung und die wertvollen Anregungen und Diskussionen zu dieser Arbeit.

Diese Arbeit ist von „*Statens Medicinska Forskningsrad*“, „*Knut och Alice Wallenbergs Stiftelse*“ und „*Magn. Bergvalls Stiftelse*“ unterstützt worden, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Lund,
Schweden.

227. Die Isolierung von 3 α ,17 α ,21-Trioxo-pregnanon-(20) (THS) aus menschlichem Harn

von J. P. Rosselet, L. Overland, J. W. Jailer und S. Lieberman.

(7. IX. 54.)

Im Verlauf unserer Untersuchungen über die Ausscheidung von Nebennierenrinden-Hormonen und ihrer Umwandlungsprodukte im Urin wurde in solchem von zwei Patientinnen mit *Cushing's* Syndrom ein neues reduzierendes Steroid isoliert und als 3 α ,17 α ,21-Trioxo-pregnanon-(20), das Tetrahydro-Derivat von *Reichstein's* Substanz S (THS), charakterisiert. Über die Isolierung dieser Substanz aus menschlichem Harn ist kürzlich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet worden.

Nach oraler Verabreichung von 2,4 g (800 mg/Tag) 17 α ,21-Dioxy-pregnanon-(3,20) (Dihydro-Derivat von Substanz S) isolierten *Ungar* und Mitarbeiter³⁾ aus dem Urin einer 66jährigen Frau mit Gelenkrheumatismus 1,5 mg THS. Auf die Anwesenheit dieser Substanz im Urin einer Patientin mit Nebennieren-Carcinom wurde von *Touchstone*

¹⁾ *J. Sjövall*, Acta Chem. Scand. **8**, 339 (1954).

²⁾ *S. Bergström & U. Gloor*, Acta Chem. Scand. **8**, 1373 (1954).

³⁾ *F. Ungar, J. W. Davis, H. Rosenkrantz & R. I. Dorfman*, J. Biol. Chem. **207**, 375 (1954).

und Mitarbeitern¹⁾ hingewiesen. Auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen schätzten sie die tägliche Ausscheidungsmenge an THS auf 12 mg. Diese Autoren fanden ferner diese Verbindung im menschlichen Harn nach oraler Verabreichung von Substanz S²⁾.

Extraktion und Isolierung, die zur Konstitutionsermittlung dieser Substanz führten, geschahen wie folgt: 24-Std.-Harn beider Patientinnen wurde mit β -Glucuronidase versetzt und die dabei freigesetzten Steroide mit Chloroform extrahiert. Die neutralen Rückstände der Chloroformextrakte wurden acetyliert und das so erhaltene Acetat-Gemisch an Al_2O_3 nach der Methode von *Lakshmanan & Lieberman*³⁾ chromatographiert. Jede der 150 Fraktionen wurde mit „Blautetrazolium“⁽⁴⁾⁵⁾ (BT) auf mögliches Reduktionsvermögen geprüft. Die Farbintensitäten BT-positiver Fraktionen wurden auf diejenigen von Cortexonacetat von bekanntem Gehalt bezogen und die so berechneten Mengenwerte graphisch gegen Fraktionsnummern aufgezeichnet. Die beiden acetylierten Extrakte gaben dabei vergleichbare Kurven. In beiden Fällen konnten zwei Hauptbanden (I und II) beobachtet werden, welche in den Chromatogrammen gleiche oder ähnliche Fraktionsnummern besetzten. Solche Fraktionen wurden dann weiter durch Farbreaktionen, IR.- und H_2SO_4 -Spektren, physikalische Eigenschaften und chemische Abbaureaktionen charakterisiert.

Die erste Patientin, *K. S.*, war eine 49jährige Frau mit erwiesenem *Cushing's* Syndrom auf Grund eines Nebennieren-Carcinoms. Ihre Ausscheidung an 17-Ketosteroiden gab bei der Aufnahme in das Spital zwischen 6,7 und 10,4 mg/Tag variierende Werte (*Zimmermann-Reaktion*⁶⁾). Die Werte für 17-Oxycorticoide schwankten zwischen 7,5 und 17,7 mg/Tag (*Porter-Silber-Reaktion*⁷⁾). Chromatographie des acetylierten Extraktes lieferte für Bande I 11,2 mg BT-reduzierendes Material und für Bande II 16,7 mg.

Die zweite Patientin, *M. S.*, war eine 37jährige Frau mit einem durch Nebennieren-Carcinom verursachten klassischen *Cushing's* Syndrom. Die Ausscheidungswerte an Steroiden betragen bei der Aufnahme 57,5 mg/Tag an 17-Ketosteroiden und 16,5 mg/Tag an 17-Oxycorticoiden. Chromatographie des acetylierten Urin-Extraktes ergab für Bande I 3,4 mg BT-reduzierendes Material und für Bande II 4,4 mg.

¹⁾ *J. C. Touchstone, E. M. Richardson, M. S. Bulaschenko, J. Landolt & F. C. Dohan, J. Clin. Endocrinol. and Metabolism* **14**, 676 (1954).

²⁾ In Fussnote 1 zitierte, unveröffentlichte Resultate.

³⁾ *T. K. Lakshmanan & S. Lieberman, Arch. Biochem. and Biophys.* **45**, 235 (1953); **53**, 258 (1954).

⁴⁾ *W. J. Mader & R. R. Buck, Anal. Chem.* **24**, 666 (1952).

⁵⁾ *J. J. Izzo & A. M. Gabiga, Fed. Proc.* **12**, 224 (1953).

⁶⁾ *A. F. Holtorf & F. C. Koch, J. Biol. Chem.* **135**, 377 (1940).

⁷⁾ *C. C. Porter & R. H. Silber, J. Biol. Chem.* **185**, 201 (1950).

In beiden Fällen deutete die IR.-spektroskopische Analyse des Materials in Bande II auf ein Gemisch der Diacetate von $3\alpha, 17\alpha, 21$ -Trioxy-pregnandion (11, 20) (THE) und $3\alpha, 11\beta, 17\alpha, 21$ -Tetroxy-pregnanon-(20) (THF).

IR.-Analyse des Materials in Bande I beider Chromatogramme wies auf ein und dieselbe Substanz hin. In der „Fingerprint-Region“ jedoch schien das Spektrum dieser Substanz von unseren Standard-Spektren bekannter Harncorticoide verschieden zu sein, so dass eine IR.-spektroskopische Identifizierung unmöglich war. Absorptionsbanden bei $1750-1756\text{ cm}^{-1}$ und $1729-1732\text{ cm}^{-1}$ deuteten auf die Anwesenheit einer 21-Acetoxy-20-Keton-Gruppierung. Die Hydroxylbande bei 3600 cm^{-1} deutete auf eine unacetylierte OH-Gruppe, wahrscheinlich in C-11 oder C-17. Die Abwesenheit der charakteristischen Bande bei ca. 1675 cm^{-1} bewies, dass kein α, β -ungesättigtes Keton vorlag.

Das in Bande I beider Chromatographien vorgefundene Material kristallisierte aus Äther-Ligroin in farblosen Nadeln vom Smp. 201 bis 203° (*K. S.*) bzw. $199-203^\circ$ (*M. S.*). Ein Gemisch beider schmolz bei $201-205^\circ$. Beide gaben positive Formaldehyd¹⁾ und *Porter-Silber*-Reaktionen. Da letztere Reaktion nur für solche Substanzen positiv ist, die am C-17 des Corticoidgerüsts eine OH-Gruppe tragen, war die Anwesenheit einer solchen Gruppierung somit bewiesen. CrO_3 -Oxydation der unbekannt krist. Substanz gab ein 17-Keton, 3α -Acetoxy-ätiocolanon-(17), welches durch IR.-Spektren, Smp. und Misch-Smp. mit authentischem Material identifiziert wurde.

Obige Befunde erlaubten, auf ein Pregnanderivat mit einer 3α -Acetoxygruppe (CrO_3 -Oxydation und IR.-Spektren), einer 17α -Hydroxylgruppe (*Porter-Silber*-Reaktion und IR.-Spektren), einer α -Ketolgruppierung (BT-, Formaldehyd-Reaktionen und IR.-Spektren) und keiner weiteren Sauerstofffunktion im Steroidgerüst (CrO_3 -Oxydation), zu schließen. Es lag somit nahe, anzunehmen, dass die aus dem Harn isolierte und in Bande I beider Chromatogramme gefundene, unbekannt Substanz das Tetrahydro-Derivat von *Reichstein's* Substanz S war.

Diese Substanz wurde kürzlich von *Ungar & Dorfman*²⁾ beschrieben, welche sie durch in-vitro-Reduktion von $17\alpha, 21$ -Dioxy-pregnandion-(3, 20) (DHS) in Leberhomogenaten herstellten. Für das Diacetat ihrer Substanz fanden diese Autoren einen Smp. von 201 bis 206° . Drs. *Ungar* und *Dorfman* sandten uns in freundschaftlicher Weise eine Probe ihres in-vitro-Reduktionsproduktes. Ferner wurde THS durch NaBH_4 -Reduktion von DHS³⁾ nach der Methode von

1) *W. H. Daughaday, H. Jaffe & R. H. Williams*, J. Clin. Endocrinol. and Metabolism **8**, 166 (1948).

2) *F. Ungar & R. I. Dorfman*, Am. Soc. **76**, 1197 (1954).

3) Von Dr. G. Rosenkrantz, Syntex S. A., Mexico City, in freundlicher Weise übergeben.

Solovay und Mitarbeitern¹⁾ dargestellt. Beide, das *in vitro* biochemisch und das chemisch dargestellte Reduktionsprodukt, waren nach Acetylierung untereinander und mit der von uns aus dem Harn isolierten Substanz in Smp., Misch-Smp., IR.- und H₂SO₄-Spektren identisch.

Die Vermutung, dass das im Urin ausgeschiedene THS ein Umwandlungsprodukt von *Reichstein's* Substanz S sein könnte, wurde in einem *in vivo* durchgeführten Experiment geprüft. Zu diesem Zweck wurde einer dritten Patientin, *V. D.*, einer bilateral adrenalectomierten 29jährigen Frau mit vorgeschrittenem Brustkrebs, während drei Tagen 400 mg/Tag *Reichstein's* Substanz S per os verabreicht. Der gesamte während diesen drei Tagen und den folgenden zwei ausgeschiedene Urin (21,2 l) wurde zunächst vier Tage mit β -Glucuronidase hydrolysiert und mit Essigester ausgeschüttelt. Der verbliebene wässrige Anteil wurde hierauf mit H₂SO₄ versetzt und bei kontinuierlicher Extraktion 48 Std. hydrolysiert. Die neutralen Rückstände beider Auszüge wurden vereinigt und acetyliert. $\frac{1}{5}$ des so erhaltenen Materials wurde an Al₂O₃ nach der „gradient“-Eluierungsmethode²⁾ chromatographiert. Es wurden dadurch 12 mg BT-reduzierendes Material erhalten, welches durch Smp., Misch-Smp., IR.- und H₂SO₄-Spektren als THS-Diacetat identifiziert wurde. CrO₃-Oxydation lieferte wie erwartet 3 α -Acetoxy- Δ^4 -cholestanon-(17). Die insgesamt ausgeschiedenen Mengen THS liessen sich auf Grund von BT-Werten und der durch Kristallisation tatsächlich erhaltenen Menge zu 60 bzw. 50 mg (5% Ausbeute) berechnen.

Die Isolierung relativ bedeutender Mengen THS aus dem Urin der Patientinnen *K. S.* und *M. S.* gibt Anlass zu folgenden Überlegungen. Auf Grund bekannter Tatsachen über den Katabolismus der Steroid-Hormone ist es logisch, anzunehmen, dass diese Substanz ein Umwandlungsprodukt von *Reichstein's* Substanz S ist, einer Verbindung, die aus Nebennierenextrakten³⁾⁴⁾ isoliert wurde und vermutlich auch im venösen Blut der Nebenniere vorkommt⁵⁾. THS ist ebenfalls nach Verabreichung entweder von Substanz S oder von DHS⁶⁾ aus dem Urin isoliert worden. Die Ausbeuten an dabei ausgeschiedenem THS waren im Vergleich zu den verabreichten Mengen der genannten Vorläufer sehr gering. Obwohl es unmöglich ist, aus den für THS gefundenen Werten jene der Vorläufer zu berechnen, ist anzunehmen, dass S und/oder DHS in diesen Patientinnen durch die kranken Neben-

¹⁾ *A. H. Solovay, A. S. Deutsch & T. F. Gallagher, Am. Soc. 75, 2356 (1953).*

²⁾ *T. K. Lakshmanan & S. Lieberman, l. c.*

³⁾ *T. Reichstein & J. v. Euw, Helv. 21, 1197 (1938).*

⁴⁾ *W. J. Haines, Recent Progress in Hormone Research 7, 255 (Academic Press Inc., New York 1952).*

⁵⁾ *G. I. Farrell & B. Lamus, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84, 89 (1953).*

⁶⁾ *F. Ungar, J. W. Davis, H. Rosenkrantz & R. I. Dorfman, loc. cit.*

nieren in ausserordentlichen Mengen gebildet werden. Da *Reichstein's* Substanz S, soweit bekannt, nur geringe biologische Wirksamkeit besitzt, sind die physiologischen Folgen einer aussergewöhnlich hohen Produktion dieser Substanz durch die Nebennieren schwer zu beurteilen. Im Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel wurde diesem Bestandteil der Nebenniere keine biologische Aktivität zugeschrieben. Obwohl *Fajans* und Mitarbeiter¹⁾ im Mineralstoffwechsel bei gesunden Männern nach intramuskulärer Injektion von 200–400 mg Substanz S keine Wirksamkeit beobachteten, berichten *Clinton & Thorn*²⁾ und *Masson* und Mitarbeiter³⁾ über eine solche Wirksamkeit. Ferner hat *Selye*⁴⁾ gefunden, dass Substanz S in ihrer Fähigkeit, in Ratten neben toxischen Wirkungen auf die Nieren und das kardiovaskuläre System auch Ödeme hervorzurufen, dem Cortexon ähnlich ist. Diese beobachtete Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel kann mit dem klinischen Befund bei den Patientinnen *K. S.* und *M. S.* in Verbindung gebracht werden. Beide zeigten zur Zeit der Versuche allgemeines Ödem. Das Erscheinen eines Ödems kann natürlich nicht nur der Anwesenheit aussergewöhnlicher Mengen von *Reichstein's* Substanz S zugeschrieben werden, da unbekannte Mengen Aldosteron, das auf den Mineralstoffwechsel wirksamste Hormon, wahrscheinlich auch ausgeschieden worden sein dürften. Wie einerseits aus dem klinischen Bild und andererseits aus den im Urin ausgeschiedenen Mengen an THE-THF-Gemisch ersichtlich ist, dürfte Hydrocortison, dessen schwach wirksame Eigenschaften auf den Mineralstoffwechsel bekannt sind, ebenfalls in bedeutenden Mengen gebildet worden sein. Diese Werte (16 mg für *K. S.* und 4 mg für *M. S.*) überschreiten jedoch die beobachteten Normalwerte (1–6 mg/Tag) nur wenig⁵⁾.

Möglicherweise ist das Auftreten aussergewöhnlicher Mengen gebildeter Substanz S bei diesen Patienten auf eine Störung der biosynthetischen Prozesse innerhalb der Carcinome zurückzuführen. Der Überschuss an vorrätigen Vorläufern (Pregnenolon, Progesteron usw.) bewirkt vielleicht, dass die zur Bildung von Hydrocortison nötige Hydroxylierung an den Kohlenstoffatomen 11, 17 und 21 nur unvollständig vor sich geht⁶⁾ und dass somit Endprodukte wie 17 α -Oxy-progesteron, 11 β -Oxy-progesteron oder wie in unserem Fall 17 α ,21-Dioxy-progesteron (Substanz S) gebildet und von dem Carcinom abgesondert werden.

¹⁾ *S. S. Fajans, L. H. Lovis & J. W. Conn*, J. Lab. Clin. Med. **38**, 911 (1951).

²⁾ *M. Clinton & G. W. Thorn*, Science **96**, 343 (1942).

³⁾ *G. M. C. Masson, A. C. Corcoran & I. H. Page*, Endocrinol. **46**, 441 (1950).

⁴⁾ *H. Selye*, Symposium on Steroids in Experimental and Clinical Practice (Editor A. White), p. 15, 1951; Philadelphia, Pa., The Blakiston Co.

⁵⁾ *B. Baggett, J. H. Glick jr. & R. A. Kinsella jr.*, J. Clin. Invest. **31**, 615 (1952).

⁶⁾ Cf. *S. Lieberman & S. Teich*, J. Clin. Endocrinol. and Metabolism **13**, 1140 (1953).

Experimenteller Teil.

Alle Smp. sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt worden und korrigiert. Substanzproben zur Drehung wurden 1 Std. bei 0,1 Torr und 65°, zur Analyse 10 Std. bei 0,1 Torr und 100° getrocknet. Al_2O_3 zur Chromatographie wurde von Alkali befreit¹⁾ und 4 Tage einer konstanten relativen Feuchtigkeit von 64% \pm 1% ausgesetzt²⁾. Der H_2O -Gehalt des so behandelten Al_2O_3 betrug 7,5% \pm 0,5%. Die IR.-Spektren wurden von Frau *William M. Furman* auf einem *Perkin-Elmer*-Spektrophotometer „double-beam“, Modell 21, aufgenommen. H_2SO_4 -Spektren wurden nach der Methode von *Zaffaroni*³⁾ aufgenommen.

Extraktion der Urinproben. *Urin K. S.* 1000 cm^3 einer täglichen Ausscheidung von 1600 cm^3 wurden mit Acetat-Pufferlösung auf pH 4,5 gebracht, mit 300000 E.⁴⁾ eines aus Leber bereiteten β -Glucuronidase-Präparates⁵⁾ versetzt und 48 Std. bei 37° stehengelassen. Das Gemisch wurde hierauf dreimal mit dem halben Volumen CHCl_3 ausgeschüttelt und die CHCl_3 -Extrakte der Reihe nach zweimal mit je 50 cm^3 H_2O , 50 cm^3 kalter 1-n. NaOH und schliesslich mit Wasser neutral gewaschen. Über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft, lieferten die vereinigten Extrakte einen braunen Rückstand, der 284 mg wog. Die *Zimmermann*-Reaktion deutete auf einen Gesamtwert von 21,3 mg Ketosteroiden, die *Porter-Silber*-Reaktion auf einen solchen von 23,0 mg 17-Oxycorticoiden.

Urin M. S. Diese Probe wurde in genau gleicher Weise wie für *Urin K. S.* beschrieben, aufgearbeitet. Der Harn von 24 Std. (1070 cm^3) lieferte in diesem Fall 247 mg dunkelbraunen Extrakt, der gemäss *Zimmermann*-Reaktion 83 mg Ketosteroide, nach *Porter-Silber*-Reaktion 16,5 mg 17-Oxycorticoide enthält.

Urin V. D. 21,21 *Urin* (Gesamtausscheidung von 5 Tagen; siehe Theoretischer Teil) wurden mit Acetat-Pufferlösung auf pH 5,0 gebracht, mit 750000 E. β -Glucuronidase-Präparat versetzt, 4 Tage bei 37° stehengelassen und hierauf dreimal mit dem halben Volumen Essigester ausgeschüttelt. Die Essigester-Lösungen wurden der Reihe nach mit H_2O , kalter 1-n. NaOH und schliesslich mit H_2O neutral gewaschen (diese Waschlösungen wurden mit dem ausgeschüttelten *Urin* zur Weiterverarbeitung vereinigt; siehe weiter unten). Über Na_2SO_4 getrocknet, lieferten die vereinigten Extrakte nach Eindampfen im Vakuum 2,16 g dunkelbraunen, öligen Rückstand (Extrakt *V. D.* I). Die *Zimmermann*-Reaktion deutete auf einen Gehalt von 98,5 mg Ketosteroiden, die *Porter-Silber*-Reaktion auf einen solchen von 96,2 mg 17-Oxycorticoiden hin.

22,51 *Urin*-Gemisch aus obiger Enzymspaltung wurden mit 2500 cm^3 einer 50-proz. H_2SO_4 -Lösung (1/9 Vol.) versetzt, worauf der Säuregehalt einer ca. 1,8-n. Lösung entsprach. Das Gemisch wurde hierauf im *Kutscher-Stuedel*-Extraktionsapparat kontinuierlich mit Äther extrahiert. Die mit H_2O , kalter 1-n. NaOH und schliesslich mit H_2O neutral gewaschenen vereinigten Auszüge lieferten nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum 1,21 g braunes Öl, das gemäss *Zimmermann*-Reaktion 34,2 mg Ketosteroide und gemäss *Porter-Silber*-Reaktion 21,4 mg 17-Oxycorticoide enthielt (Extrakt *V. D.* II).

Die verbliebene wässrige Phase aus der Säurespaltung wurde mit obigen Waschlösungen vereinigt, 30 Min. unter Rückfluss erhitzt und mit dem halben Volumen Äther ausgeschüttelt. Die wie oben gewaschenen und getrockneten Auszüge lieferten nach Eindampfen 138 mg Rückstand, der nach *Zimmermann*-Reaktion noch 7,7 mg Ketosteroide enthielt (Extrakt *V. D.* III).

Acetylierung der gespaltenen Urinextrakte. *Extrakt K. S.* 284 mg roher Extrakt wurden viermal mit 20 cm^3 Benzol getrocknet, im CaCl_2 -Exsikkator über Nacht stehengelassen und hierauf mit 2 cm^3 abs. Acetanhydrid in 4 cm^3 abs. Pyridin acetyliert.

¹⁾ *J. v. Eruw, A. Lardon & T. Reichstein, Helv. 27, 1292 (Fussnote 2) (1944).*

²⁾ *T. K. Lakshmanan & S. Lieberman, loc. cit.*

³⁾ *A. Zaffaroni, Am. Soc. 72, 3828 (1950); siehe auch S. Bernstein & R. H. Lenhard, J. Org. Chem. 18, 1146 (1953).*

⁴⁾ *Fishman* Einheiten; cf. *P. Talaly, W. H. Fishman & C. Huggins, J. Biol. Chem. 166, 757 (1946).*

⁵⁾ Präparat von *Warner-Chilcott Laboratories, New York, N. Y.*

Nach 30stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Gemisch bei 30° im Vakuum zur Trockene eingedampft, in Essigester aufgenommen und je zweimal mit wenig 2-n. HCl, 2-n. Sodälösung und H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft (übliche Aufarbeitung). Das so erhaltene rohe, dunkelbraune Acetat-Gemisch wog 262 mg.

Extrakt M. S. 247 mg Extrakt wurden wie oben getrocknet und acetyliert. Übliche Aufarbeitung lieferte 255 mg dunkelbraunen Rückstand.

Extrakt V. D. 637 mg Rohextrakt ($\frac{1}{5}$ der vereinigten Extrakte *V. D. I* und *V. D. II*) wurden mit 3,5 cm³ abs. Acetanhydrid in 6 cm³ abs. Pyridin acetyliert und nach 30stündigem Stehen in üblicher Weise aufgearbeitet. Dabei wurden 576 mg rohes, dunkelbraunes Acetat-Gemisch erhalten.

Chromatographische Trennung obiger Acetat-Gemische. *Acetat-Gemisch K. S.* 262 mg rohes Gemisch wurden in 10 cm³ Benzol-Ligroin-(1:1)-Gemisch, das 0,2% Alkohol enthält, gelöst und an 10 g Al₂O₃ nach der „gradient“-Eluierungsmethode chromatographiert, wobei V₀ = 800 cm³ Benzol-Ligroin-(1:1)-Gemisch, 0,2% Alkohol enthaltend; c₀ = 6% Alkohol in Benzol-Ligroin-(1:1)-Gemisch; R₁ = 0,33 cm³/Min.; R₂ = 2,50 cm³/Min. Es wurden 150 Fraktionen zu je 5 cm³ gesammelt, wovon je 1 cm³ zur Prüfung auf Reduktionsvermögen gegenüber „Blautetrazolium“ entnommen wurde.

Die Fraktionen 16–26 (bei einer Alkoholkonzentration von 0,38–0,40% eluiertes Volumen von 55 cm³) enthielten BT-reduzierendes Material, das einer Menge von 6,9 mg entsprach. Die Substanz wurde aus Äther-Ligroin kristallisiert und lieferte 6,5 mg Nadeln vom Smp. 201–205°; *Porter-Silber-* und Formaldehyd-Reaktionen positiv.

Die Fraktionen 36–51 (bei einer Alkoholkonzentration von 0,43–0,47% eluiertes Volumen von 75 cm³) enthielten gemäss „Blautetrazolium“-Reaktion 10,1 mg reduzierendes Material. Die *Porter-Silber-* und Formaldehyd-Reaktionen deuteten auf 9,4 mg bzw. 12,6 mg Material. In Vergleichschromatogrammen mit bekannten Nebennieren-Hormonen und ihren Umwandlungsprodukten wurde festgestellt, dass die Diacetate von 3 α , 17 α , 21-Trioxy-pregnanon-(11,20) (THE) und 3 α , 11 β , 17 α , 21-Tetroxy-pregnanon-(20) (THF) bei entsprechenden Alkoholkonzentrationen eluiert wurden. Die IR.-Spektren deuteten in Übereinstimmung mit dieser Beobachtung darauf hin, dass das eluierte Material in der Tat ein Gemisch von THE und THF war.

Die Fraktionen 96–110 und 118–132, in welchen sich Cortison und Hydrocortison, falls anwesend, hätten befinden müssen, gaben negative BT-Reaktionen.

Acetat-Gemisch M. S. 255 mg Gemisch wurden in 10 cm³ des oben beschriebenen Lösungsmittelgemisches gelöst und unter denselben Bedingungen chromatographiert.

Die Fraktionen 16–26 (bei einer Alkoholkonzentration von 0,38–0,40% eluiertes Volumen von 55 cm³) enthielten gemäss „Blautetrazolium“-Reaktion 3,2 mg reduzierendes Material, welches, aus Äther-Ligroin kristallisiert, 3 mg farblose Nadeln vom Smp. 202–205° lieferte. *Porter-Silber-* und Formaldehyd-Reaktionen waren positiv.

Die Fraktionen 40–53 (bei einer Alkoholkonzentration von 0,45–0,49% eluiertes Volumen von 70 cm³) enthielten nach „Blautetrazolium“-Reaktion 4,1 mg reduzierendes Material. Die *Porter-Silber-* und Formaldehyd-Reaktionen deuteten auf 4,6 bzw. auf 5,8 mg Material. Das aus diesen Fraktionen erhaltene Material wurde durch IR.-Analyse ebenfalls als ein Gemisch der Diacetate von THE und THF identifiziert.

Kristalle der Fraktionen 16–26 beider Chromatogramme wurden, da Smp., Misch-Smp., IR.- und H₂SO₄-Spektren identisch waren, vereinigt und aus Äther-Ligroin umkristallisiert. Erhalten wurden 9,5 mg farblose Nadeln vom Smp. 201–206°; $[\alpha]_D^{25} = +78^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,682 in Methanol)¹⁾.

6,82 mg Subst. zu 1,000 cm³, l = 1 dm; $\alpha_D^{25} = +0,54^\circ \pm 0,02^\circ$

Diese Substanz konnte mit dem Diacetat von 3 α , 17 α , 21-Trioxy-pregnanon-(20) (THS) durch direkten Vergleich (Smp., Misch-Smp., IR.- und H₂SO₄-Spektren) einerseits mit der von Drs. *Ungar* und *Dorfman* zur Verfügung gestellten Substanzprobe und andererseits mit dem aus DHS durch NaBH₄-Reduktion erhaltenen Produkt identifiziert werden.

¹⁾ *F. Ungar & R. I. Dorfman*, l. c., fanden einen Drehungswert von +77° (in Methanol).

CrO₃-Oxydation. 6 mg des isolierten Materials vom Smp. 201–206° wurden in 1 cm³ Eisessig gelöst, portionenweise mit insgesamt 0,2 cm³ einer 1-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung (2 mg CrO₃) versetzt und 12 Std. bei 20° stehengelassen. Das Gemisch wurde hierauf im Vakuum eingedampft, in Chloroform-Äther (1:3) aufgenommen, mit 2-n. H₂SO₄, 2-n. Sodalösung und H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es wurden dabei 4,5 mg gelbes, öliges Oxydationsprodukt erhalten, das nach Filtrieren durch wenig Al₂O₃ farblos war. Kristallisation aus Äther-Ligroin lieferte nach Impfen mit authentischem 3 α -Acetoxy- β -tiocholanon-(17) 3 mg Kristalle. Umkristallisation aus demselben Lösungsmittelgemisch gab 2,5 mg Kristalle vom Smp. 91–93°. Misch-Smp. mit authentischem Material keine Depression. Die IR.-Spektren beider Substanzen bewiesen ihre Identität.

Acetat-Gemisch V. D. 576 mg Acetat-Gemisch wurden in 10 cm³ Benzol-Ligroin (1:1)-Gemisch, das 0,2% Alkohol enthielt, gelöst und an 10 g Al₂O₃ unter den für Extrakt K. S. angegebenen Bedingungen nach der „gradient“-Eluierungsmethode chromatographiert und in 150 Fraktionen zu je 5 cm³ getrennt.

Die Fraktionen 21–28 enthielten 7,8 mg „Blautetrazolium“-reduzierendes Material, das nicht weiter untersucht wurde.

Die Fraktionen 33–39 gaben einen „Blautetrazolium“-Wert von 12,5 mg rohes THS-Diacetat, Smp. 198–201°. Umkristallisieren aus Äther-Ligroin lieferte 10 mg Nadeln vom Smp. 201–205°; Misch-Smp. mit authentischem Material ebenso; die IR.- und H₂SO₄-Spektren waren identisch mit denen des authentischen Materials. CrO₃-Oxydation lieferte wie erwartet 3 α -Acetoxy- β -tiocholanon-(17) vom Smp. 92–94°, das ebenfalls noch mittels IR.-Spektrum identifiziert wurde.

Reduktion von 21-Acetoxy-17 α -oxy-pregnandion-(3,20) (DHS-Acetat) mit NaBH₄. 500 mg (1,34 mMol) DHS-Acetat wurden in 36 cm³ reinstem Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wurde unter Stickstoff ein Gemisch von 12 cm³ Methanol, 0,4 cm³ 2-n. NaOH und 1,2 cm³ einer 0,06-m. NaBH₄-Lösung in Pyridin unter ständigem Rühren zugegeben. Die Reaktion wurde nach genau 10 Min. durch Zugabe von 3 cm³ konz. HCl gestoppt. 1/3 des Methanols wurde im Vakuum abdestilliert und das Gemisch einmal mit 250 cm³ und zweimal mit je 100 cm³ Essigester ausgeschüttelt. Die der Reihe nach mit 2-n. HCl, 2-n. Sodalösung und mit H₂O gewaschenen Essigesterlösungen hinterliessen nach Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum 382 mg kristallinen Rückstand, der mit 3 cm³ Acetanhydrid in 4,5 cm³ Pyridin 27 Std. acetyliert wurde. Übliche Aufarbeitung gab 392 mg Kristallgemisch, das an 20 g Al₂O₃ chromatographiert wurde. Zum Nachwaschen dienten für jede Fraktion je 10 cm³ Benzol- und Benzol-Alkohol-Gemische.

Die mit 0,6% Alkoholgehalt eluierten Fraktionen lieferten 122 mg kristallines Material, das bei 198–203° schmolz. Umkristallisieren aus Äther-Ligroin lieferte 104 mg farblose Nadeln, Smp. 201–206°; $[\alpha]_D^{25} = +74^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,12$ in Methanol).

11,2 mg Subst. zu 1,000 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{25} = +0,83^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$

C₂₅H₃₈O₆ (434,8) Ber. C 69,09 H 8,81% Gef. C 69,03 H 9,03%

CrO₃-Oxydation. 50 mg des obigen Reduktionsproduktes vom Smp. 201–206° wurden in 2 cm³ Eisessig gelöst, portionenweise mit 0,7 cm³ einer 2-proz. CrO₃-Eisessig-Lösung (14 mg CrO₃) versetzt und 20 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Übliche Aufarbeitung lieferte 28 mg farbloses Öl, das durch wenig Al₂O₃ filtriert 25 mg farbloses Öl gab, welches aus Äther-Ligroin nach Impfen mit authentischem 3 α -Acetoxy- β -tiocholanon-(17) sofort kristallisierte. Die 19 mg reine Substanz schmolzen bei 92–93°, Misch-Smp. mit authentischem Material ohne Depression. Das IR.-Spektrum bestätigte die Identität mit der Vergleichssubstanz.

Die Analyse wurde im Mikroanalytischen Laboratorium (Leitung: Mr. L. M. Francone), Research Division, American Cyanamid Co., Pearl River, ausgeführt.

Diese Arbeit wurde zum Teil vom *US. Public Health Service* (grant no. A-110 C) und durch ein *Institutional Grant* der *American Cancer Society* unterstützt.

SUMMARY.

The isolation of a new adrenocortical metabolite from the urine of two women suffering from *Cushing's* syndrome due to adrenal carcinoma has been described. The substance has been characterized as $3\alpha,17\alpha,21$ -trihydroxypregnane-20-one (tetrahydro Compound S; THS). Since it was isolated after β -glucuronidase hydrolysis of the urines, this metabolite was apparently excreted in the form of its glucuronoside conjugate. The possible relationship between the occurrence of THS in the urine of these patients with *Cushing's* syndrome and the excessive edema they exhibited has been noted. In addition THS has been isolated in 5% yield from the urine of a bilaterally adrenalectomized patient to whom *Reichstein's* Compound S was administered orally.

Departments of Biochemistry
and of Obstetrics and Gynecology,
College of Physicians and Surgeons,
Columbia University, New York, N.Y.

228. Zur Kenntnis des Dampfdrucks von Quecksilber(II)-chlorid

von R. Ruf und W. D. Treadwell.

(11. IX. 54.)

Der Dampfdruck von Salzen mit Molekelgittern beansprucht vom physikalischen Standpunkt aus besonderes Interesse als Mass für die Gitterkräfte. Energetisch relativ einfache Verhältnisse sind beim Quecksilber(II)-chlorid zu erwarten, da hier die lineare Struktur der Molekel des Gaszustandes¹⁾ auch im Bau des Kristalls²⁾ vorkommt. Der Dampfdruck dieses Salzes ist bereits von mehreren Autoren im Temperaturbereich von $t = 60 - 300^{\circ}$ (entsprechend $1/T = 0,003 - 0,0017$) bestimmt worden. Eine Zusammenstellung von einigen besonders wichtigen Werten im $\log p, 1/T$ -Diagramm zeigt Fig. 3.

Ältere Messungen von *K. Stelzner* und *G. Niederschulte*³⁾, die statisch und durch Bestimmung des Gewichtsverlustes bei Mitführungsversuchen im Bereich von $60 - 300^{\circ}$ gewonnen wurden, passen gut in die Gerade von Fig. 3, ebenso wie die statisch gewon-

¹⁾ Vgl. *L. Pauling*, The Nature of the Chemical Bond, 2. Ed., S. 89 (1940).

²⁾ Vgl. *A. F. Wells*, Structural Inorganic Chemistry, S. 148 (1945).

³⁾ *K. Stelzner & G. Niederschulte*, Verh. d. D. Phys. Ges. **7**, 159 (1905).