

131. Untersuchungen über Organextrakte.

25. Mitteilung¹⁾.

Über den Nachweis von Testosteron in einem virilisierenden Nebennierenrindentumor

von R. Anliker, O. Rohr und M. Marti.

(27. IV. 56.)

In der vorangehenden Mitteilung dieser Reihe¹⁾ wurde über die Isolierung von Östradiol aus einem feminisierenden Hodentumor berichtet. Die überraschend hohe Konzentration dieses Wirkstoffes (78 mg/kg Gewebe) sowie die histologischen Befunde liessen vermuten¹⁾²⁾, dass die Zeichen der Feminisierung (Gynäkomastie) beim Patienten durch „tumoreigenes“ Hormon hervorgerufen wurden.

In diesem Zusammenhang untersuchten wir nun Metastasen-Gewebe eines hormonal aktiven *Carcinoma solidum medullare* der Nebennierenrinde (NNR) von einem 12jährigen Mädchen (M.E.)³⁾, in der Hoffnung, auch in dieser, die hormonalen Störungen verursachenden Geschwulst einheitliche Wirkstoffe in anormal hoher Konzentration auffinden zu können.

Die klinischen Symptome waren typisch für eine Mischform von *Cushing*-Syndrom und adrenogenitalem Syndrom mit NNR-Karzinom³⁾. Nach der operativen Entfernung eines 800 g schweren NNR-Tumors zeigte die vorher sehr stark erhöhte Ausscheidung eines 17-Ketosteroiden^{4a)}, Corticosteroiden^{4b)} und Dehydro-iso-androsteron^{4c)} und der erhöhte Gehalt an Blutcorticoiden^{4d)} eine weitgehende Normalisierung, um aber nach drei Monaten infolge einer ausgedehnten Metastasierung, welche zum raschen Tode der Patientin führte, wieder enorm anzusteigen. Als Folge der erneuten Störung des Steroid-Haushaltes liessen sich bei der Patientin Anzeichen einer leichten Virilisierung erkennen.

Das Metastasengewebe (467 g), das histologisch eine nahe Verwandtschaft zu den NNR-Zellen zeigte, wurde uns durch Herrn Dr. *Siebenmann*⁵⁾ freundlicherweise für die chemische Bearbeitung überlassen, welche nach dem nebenstehenden Schema (Tab. 1) und den Angaben im experimentellen Teil erfolgte⁶⁾⁷⁾. Nach der Vertei-

1) 24. Mitt. *M. Marti & H. Heusser*, Helv. **37**, 327 (1954).

2) *W. Wenz*, Schweiz. med. Wschr. **83**, 677 (1953).

3) Dieser Fall wurde bereits von *A. Prader*, Schweiz. med. Wschr. **86**, 289 (1956), in einem andern Zusammenhang beschrieben.

4) Bestimmt nach a) *W. Zimmermann*, Chemische Bestimmungsmethode von Steroid-Hormonen in Körperflüssigkeiten, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, 63; b) *W. H. Daughaday, H. Jaffé & R. H. Williams*, J. clin. Endocrin. **8**, 166 (1948), und *C. C. Porter & R. H. Silber*, J. biol. Chemistry **185**, 201 (1950); c) *E. Dingemans, L. G. Huis in 'tVeld & B. M. de Laat*, J. clin. Endocrin. **6**, 535 (1946); *E. Dingemans & S. L. Hartogh-Katz*, ibid. **12**, 66 (1952); d) *D. H. Nelson & L. T. Samuels*, ibid. **12**, 519 (1952).

5) Pathologisches Institut der Universität Zürich, Leitung Prof. Dr. *E. Uehlinger*.

6) Auf die Isolierung von eventuell anwesenden konjugierten Hormonen (Proteingebundene Steroide, Steroid-Sulfate und -Glucuronoside) wurde im vorliegenden Falle verzichtet.

7) Das Aufbereitungsverfahren stützt sich im wesentlichen auf die Erfahrungen der Arbeiten von *L. Ruzicka & V. Prelog*, Helv. **26**, 975 (1943); *G. F. Cartland & M. H. Kuizenga*, J. biol. Chemistry **116**, 57 (1936); *S. A. Simpson, J. F. Tail, A. Wettstein, R. Neher, J. von Euv, O. Schindler & T. Reichstein*, Helv. **37**, 1163 (1954), und *M. Marti & H. Heusser*, Helv. **37**, 327 (1954). Kontrollversuche mit einem Gemisch von Cholesterin, Cortison, Desoxycorticosteron, Testosteron und Östron bekannten Gehaltes ergaben eine befriedigende quantitative Auftrennung der aufgeführten Komponenten.

lung des Acetonextraktes (B) zwischen Petroläther und wasserhaltigem Methanol liessen sich aus dem Rückstand der eingedampften Methanol-Phase durch Extraktion mit Äthylenchlorid 669 mg eines gelben Öles gewinnen, welches einer biologischen Prüfung⁸⁾ unterzogen wurde. Der Extrakt zeigte weder im *Allen-Doisy*-Test (Dosis 50 γ /kg) noch im Hahnenkammtest bei 250fachen Dosen als solche von Testosteron, die signifikantes Kammwachstum hervorrufen, eine östrogene bzw. androgene Wirkung. Durch Dosen von 1 mg/kg wurde das bei der Ratte durch Implantation eines Fremdkörpers erzeugte Bindegewebegranulom nicht beeinflusst, was schliessen liess, dass diese Dosen keine Cortison- bzw. Hydrocortison-ähnliche Wirkung besaßen. Es war deshalb zum vornherein nur mit minimalen Mengen von Steroid-Hormonen zu rechnen. Nach einer weiteren Anreicherung durch Verteilung zwischen Petroläther und 50-proz. Methanol konnten vom gewonnenen Methanolextrakt (D) aus benzolischer Lösung⁹⁾ 3 mg Säuren (E) und 26 mg Phenole (H) abgetrennt werden. In der phenolischen Fraktion (H) liess sich keine einheitliche Verbindung nachweisen.

In Anpassung an die kleine Materialmenge wurde die neutrale Fraktion (G) (21,6 mg) durch präparative Papierchromatographie weiter aufgetrennt. Das Gemisch erfuhr eine erste Auftrennung in polare und weniger polare Steroide durch Chromatographie auf einem Bogen Filtrierpapier im C-System von *Bush*¹²⁾. Parallel mitlaufendes Cortison und Testosteron bestimmten die Aufteilung des Blattes in 3 Zonen (I–III). Durch wiederholte, differenzierende Chromatographie in den Systemen Formamid/Chloroform¹³⁾ und C nach *Bush* des Eluates der Zone II konnten drei NNR-Hormone, nämlich Aldosteron (1–2 γ)¹⁴⁾, Cortison (5,5 γ) und 17 α -Hydroxy-

⁸⁾ Die biologischen Prüfungen wurden in der pharmakologischen Abteilung der *CIBA Aktiengesellschaft* in Basel (Leitung Prof. Dr. R. Meier) durchgeführt. Wir danken dieser Firma für die Durchführung der Versuche.

⁹⁾ Wir möchten an dieser Stelle darauf aufmerksam machen, dass sich Östron und Östradiol nur mit unverhältnismässig grossen Mengen Natronlauge aus Chloroform oder Chloroform-haltigen Gemischen extrahieren lassen. Es gelingt sogar, der Lösung von Östron in 1-n. Natronlauge das Steroid durch dreimaliges Schütteln mit diesen Lösungsmitteln quantitativ zu entziehen. Dies führt bei der Anwesenheit von relativ leicht wasserlöslichen Neutralkörpern (z. B. Corticosteroide) zu empfindlichen Verlusten. Sehr gut eignen sich für die Abtrennung der phenolischen Steroide Benzol oder Toluol, wie eine Gegenüberstellung der Verteilungskoeffizienten (K) der Systeme Toluol/1-n. NaOH¹⁰⁾ und Chloroform/1-n. NaOH¹¹⁾ erkennen lässt: Östron K = 0,14 und 1,88; Östradiol K = 0,046 und 0,21; Östriol K = 0 und 0,01.

¹⁰⁾ L. L. Engel, H. R. Patterson, H. Wilson & M. Schinkel, *J. biol. Chemistry* **183**, 47 (1950).

¹¹⁾ Eigene Messungen.

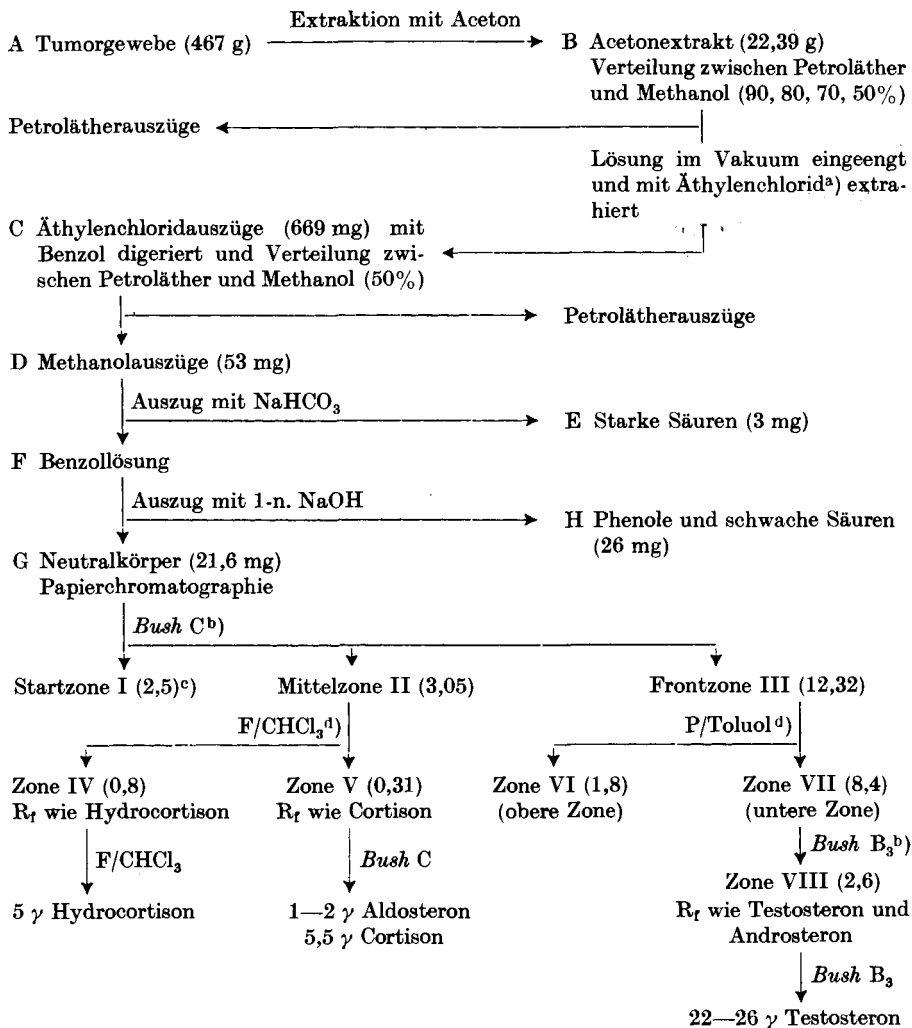
¹²⁾ I. E. Bush, *Biochem. J.* **50**, 370 (1952).

¹³⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, *Science* **111**, 6 (1950); R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann, *J. biol. Chemistry* **188**, 763 (1951).

¹⁴⁾ Den Herren Dr. A. Wettstein und Dr. R. Neher, *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel, danken wir für die Überlassung einer noch nicht veröffentlichten, detaillierten Arbeitsvorschrift zum Nachweis von Aldosteron. Ihre Publikation wird demnächst erfolgen.

corticosteron (Hydrocortison) (5γ), eindeutig nachgewiesen werden¹⁵⁾.

Tabelle 1.



a) 1,2-Dichloräthan.

b) Systeme C und B₃ nach Bush¹²⁾.

c) Mengen in mg.

d) Systeme Formamid/Chloroform und Propylenglykol/Toluol nach R. B. Burton et al.¹³⁾.

¹⁵⁾ Ein ähnlicher Nachweis gelang kürzlich R. Neher & A. Wettstein, zit. in A. Wettstein & G. Anner, *Experientia* **10**, 397 (1954). Im Falle eines NNR-Tumors mit reinem Cushing-Syndrom, dessen Charakteristikum in einer Überproduktion von Glucocorticosteroiden, d. h. im wesentlichen von Hydrocortison³⁾ besteht, wiesen sie 9650 γ /kg Hydrocortison und 285 γ /kg Aldosteron nach.

Wesentlich schwieriger gestaltete sich die Isolierung von einheitlichen Verbindungen aus dem Extrakt der Zone III. Nach Chromatographie im System Propylenglykol/Toluol¹³) liessen sich die weniger polaren Steroide vom Typus des Testosterons aus der unteren Zone VII eluieren. Auf der UV.-Photokopie des Chromatogrammes zeigte sich auf der Höhe des parallel mitgelaufenen Testosterons eine absorbierende Zone. Die auf einem kleinen Streifen ausgeführte Natronlauge-Reaktion¹²) verlief positiv und zeigte die für Δ^4 -3-Keto-Steroide charakteristische gelbe UV.-Fluoreszenz. Vom Extrakt der den Laufstrecken des Testosterons und Androsterons entsprechenden Zone wurden 600 γ im System B₃ weiter angereichert. Der dem Testosteron entsprechende Flecken wurde mittels UV.-Photokopie lokalisiert, eluiert und das Eluat im System Propylenglykol/Toluol parallel mit Standardlösungen chromatographiert. Die semiquantitative Bestimmung erfolgte durch visuellen Vergleich¹⁶) der Natronlauge-Fluoreszenz im UV. und ergab einen Gehalt von insgesamt 22–26 γ Testosteron¹⁷).

Bis heute wurde Testosteron lediglich in sehr kleinen Mengen aus Stier-, Hengst- und Schweinehoden isoliert¹⁸). Bekanntlich wird dieses Hormon vom Gewebe und auch im Blut sehr schnell in weniger aktive Verbindungen umgewandelt. Während Testosteron nur nach Verabreichung von sehr grossen Dosen in geringer Menge im Harn gefasst werden konnte¹⁹), ist der Nachweis von endogenem Hormon in dieser Flüssigkeit wie auch im peripheren Kreislauf bis heute noch nicht gelungen. Eine Ausnahme bildet der Nachweis von Testosteron im Blut der *Vena spermatica* des Hundes²⁰). Er ist aber gerade ein Hinweis dafür, dass das im Gewebe und im Blut eine rasche Umwandlung erfahrende Testosteron in der Regel nur aus Geweben oder Körperflüssigkeiten, die sich in unmittelbarer Nähe oder in der eigentlichen Produktionsstätte selbst befinden, isoliert werden kann. Unter diesem Gesichtspunkt und im Vergleich mit den isolierten Mengen¹⁸) aus Testes ist die von uns nachgewiesene Konzentration von ca. 45–55 γ Hormon pro kg Metastasengewebe deshalb bemerkenswert, weil dadurch die Vermutung, dass der Tumor selbst das Testosteron zu produzieren vermag, eine wesentliche Stütze erfährt²¹). Obwohl

¹⁶) In Testversuchen war die Bestimmung bei Konzentrationen von 1–8 γ mit einer Genauigkeit von $\pm 50\%$ immer reproduzierbar.

¹⁷) Unseres Wissens wurde dieses Hormon bis heute noch nie aus Metastasen- oder NNR-Tumor-Gewebe isoliert.

¹⁸) Aus Stierhoden (100 γ /kg) *K. David, E. Dingemans, J. Freud & E. Laqueur*, Z. physiol. Chem. **233**, 281 (1935); aus Hengsttestes (200 γ /kg) *E. Tagmann, V. Prelog & L. Ruzicka*, Helv. **29**, 440 (1946), und aus Schweinetestes (30 γ /kg) *V. Prelog, E. Tagmann, S. Liebermann & L. Ruzicka*, Helv. **30**, 1080 (1947).

¹⁹) *S. Liebermann, D. K. Fukushima & K. Dobriner*, J. biol. Chemistry **182**, 299 (1950).

²⁰) *C. D. West, V. P. Hollander, T. H. Kritchevsky & K. Dobriner*, J. clin. Endocrin. **12**, 915 (1952).

²¹) Die Möglichkeit, dass der Tumor die von uns nachgewiesenen Verbindungen lediglich speichert ohne sie selbst zu produzieren, muss auch in Erwägung gezogen werden. Wir halten diese Variante aber für weniger wahrscheinlich.

die festgestellte Konzentration im Gewebe noch keine bindenden Rückschlüsse auf die vom Tumor tatsächlich in Umlauf gesetzte Menge dieses Hormons zulässt, darf angenommen werden, dass die bei solchen Fällen fast immer feststellbare, mehr oder weniger auffallende Virilisierung ihren Grund in der Ausschüttung von grossen Mengen von tumoreigenem Testosteron hat. Dafür spricht auch die sich mit fortschreitender Metastasierung stark steigende Ausscheidung von 17-Keto-steroiden²²⁾. Obschon Untersuchungen speziell der Arbeitskreise um *Dobriner*, *Dorfman* und *Samuels*²³⁾ über den Metabolismus des Testosterons zeigten, dass ein beträchtlicher Anteil dieses Hormones in Form von 17-Keto-steroiden ausgeschieden wird, kann leider der genaue Anteil der Testosteron-Metaboliten in der Gesamtmenge nicht bestimmt werden.

Wir danken der *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil.

Extraktion des Tumors. Das zusammenhängende Metastasengewebe (467 g) wurde in einem Mixer weitgehend homogenisiert und in 2 l Aceton 2 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Durch eine in die Lösung eingetauchte Glasfilternutsche wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff-Überdruck vom Gewebepulver abfiltriert. Nach Wiederholung dieser Operation kochte man den Rückstand mit 2 l Aceton 2 Std. am Rückfluss. Die vereinigten Acetonextrakte wurden bei 30° unter der Benützung einer mit Stickstoff beschickten Kapillare bis zur Trockene eingedampft. Der mit Kristallen durchsetzte gelbbraune Acetonextrakt (B) wog 22,39 g und wurde zur Verteilung, in 400 cm³ Methanol gelöst und mit 400 cm³ Petroläther (60—80°) im Scheidetrichter vermischt. Dann wurden 45 cm³ Wasser (20 cm³ gesättigte Natriumchlorid-Lösung enthaltend) zugefügt. Nach kurzem Umschwenken wurde die sich abtrennende untere Phase in einen anderen Scheidetrichter abgelassen. Die erneute Zugabe von 55 cm³ Wasser zum 1. Scheidetrichter bewirkte, dass sich wieder eine Petrolätherschicht abschied. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Operation (es wurden noch 70 und 130 cm³ Wasser zugefügt) passierte die wässrig-methanolische Phase noch 3 Scheidetrichter mit je 150 cm³ Petroläther. Anschliessend wurden die leichten Phasen in gleicher Reihenfolge dreimal mit je 100 cm³ 50-proz. Methanol gewaschen. Die Petrolätherauszüge hinterliessen nach dem Eindampfen 7,589 g fettartiges Material, das verworfen wurde.

Die vereinigten Methanol-Phasen wurden im Vakuum bei 40° auf 100 cm³ eingengt. Dieses Konzentrat extrahierte man fünfmal mit je 150 cm³ frisch destilliertem Äthylchlorid. Die zu Beginn entstandenen Emulsionen liessen sich durch Zugabe von 20 cm³ gesättigter Natriumchlorid-Lösung brechen. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum bei 40° verblieb ein viskoses Öl, das nach 1stündigem Erhitzen auf 40° bei 0,01 Torr 669 mg wog (Extrakt C)²⁴⁾.

Die Lösung dieses Extraktes in wenig Chloroform verdünnte man mit 500 cm³ Benzol. Die sich dabei abscheidenden Flocken wurden abfiltriert und die Lösung unter reduziertem Druck zur Trockene eingedampft. Zur weiteren Entfettung wurde der Rückstand zwischen Petroläther und 50-proz. Methanol verteilt. Nach einer 5stufigen Vertei-

²²⁾ 2 Tage vor dem Tod der Patientin betrug sie 58,3 mg in 24 Std. (Normalwert 4—8 mg; vgl. dazu Fussnote 14).

²³⁾ Vgl. z. B. zusammenfassende Referate *L. T. Samuels & D. C. West*, *Vitamins and Hormones* **10**, Academic Press Inc., N. Y. 1952, S. 251; *D. K. Fukushima & R. S. Rosenfeld*, *Chemical Pathway of Metabolism* **1**, Academic Press Inc., N. Y. 1954, S. 349.

²⁴⁾ Über die Prüfung dieses Extraktes (C) auf hormonale Aktivität vgl. weiter oben.

lung (mit je 100 cm³ Petroläther und 100 cm³ 50-proz. Methanol pro Stufe) und dem sorgfältigen Verdampfen der wässrig-methanolischen Phasen blieben 53 mg eines zähflüssigen Öls zurück. Der im Petroläther gelöste Teil (383 mg) wurde verworfen. Der Rückstand der Methanolauszüge (D) liess sich in 50 cm³ Benzol lösen. 4 weitere Scheidetrichter wurden mit derselben Menge dieses Lösungsmittels beschickt. Bei 0° wusch man die Benzolösung (F) zweimal mit je 10 cm³ 0,5-n. HCl, dreimal mit je 10 cm³ ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dann fünfmal mit je 25 cm³ eiskalter 1-n. Natronlauge und schliesslich dreimal mit je 10 cm³ gesättigter Natriumchlorid-Lösung. Die getrockneten Benzolösungen wurden im Vakuum eingedampft und hinterliessen 21,6 mg neutrale Anteile (G). Nach dem Ansäuern der alkalischen Auszüge wurden in üblicher Weise die Säuren (E) (3 mg) bzw. die Phenole (H) (26 mg) isoliert.

Bestimmung der Corticosteroide im Neutralteil. Der Extrakt (G) (21,5 mg) wurde auf einem Filtrierpapierbogen²⁵⁾ auf der Startlinie (ca. 1,3 mg/cm) aufgetragen und im System C von *Bush*¹²⁾ 2¼ Std. bei 27° chromatographiert, wobei 10 γ Cortison parallel auf demselben Blatt mitchromatographiert wurden (Laufstrecke des Cortisons 9 cm). Vom getrockneten Blatt wurde eine UV.-Photokopie²⁷⁾ bereitet, auf Grund derer es in 3 Zonen zerschnitten wurde (Zone I bis 4 cm und Zone II bis 13 cm unterhalb der Startlinie, Zone III Front)²⁸⁾.

Zone I. Das Eluat (2,5 mg) wurde im System Formamid-Chloroform¹³⁾ 29) (0,8 mg/cm Startlinie) 27 Std. bei 27° chromatographiert. Die an schmalen Streifen des bei 90° getrockneten Papierses aufgeführten Farbreaktionen mit Blautetrazolium³⁰⁾, Antimontrichlorid³¹⁾ und Phosphormolybdänsäure³²⁾ verliefen negativ.

Bestimmung von Corticosteroiden in der Zone II. Den aus der Zone II gewonnenen Extrakt (3,05 mg) chromatographierte man im System Formamid-Chloroform 4 Std. lang parallel mit je 20 γ Hydrocortison und Cortison. Mittels UV.-Photokopie wurden die Positionen der beiden Testsubstanzen ermittelt und die entsprechenden Zonen IV (Hydrocortison) und V (Cortison), welche schwache UV.-absorbierende Banden zeigten, als 4 cm breite bzw. 6 cm breite Streifen ausgeschnitten und eluiert.

Das Eluat der Zone IV (0,8 mg) wurde im gleichen System parallel mit bekannten Mengen von Hydrocortison (2, 5, 10, 15 γ) weiter aufgetrennt. Der Streifen wurde im Dunkeln 12 Std. bei Zimmertemperatur getrocknet, im UV.-Licht photokopiert und mit einer Mischung von 1 Vol. 0,1-proz. Blautetrazolium in Wasser mit 9 Vol. wässriger

²⁵⁾ Wenn nichts anderes vermerkt ist, handelt es sich um Papier *Whatman* Nr. 1. Zur präparativen Chromatographie wurde das Papier je 2 Tage mit feuchtem Methanol und Chloroform in einer *Soxhlet*-Apparatur extrahiert. Die Papiere wurden im Sinne eines absteigenden Chromatogrammes in geschlossenen Gefässen (wichtig!) eluiert. Die Blindwerte können auf diese Weise (5 cm³ Methanol/100 cm² Papier) praktisch ausgeschaltet werden. Bei Verwendung von Systemen mit schwerflüchtigen Imprägnierungsmitteln wurde das Eluat 15 Min. bei 60° und 0,01 Torr getrocknet.

²⁶⁾ System C: Toluol-Äthylacetat-Methanol-Wasser 45:5:25:25; System B 3: Ligroin-n-Heptan-Benzol-Methanol-Wasser 1:1:1:1,2:0,3. Die schwere Schicht wurde als stationäre und die leichte Schicht als bewegliche Phase verwendet.

²⁷⁾ Lichtquelle: *Philips* Sterilisationslampe TUV 15 Watt. Papier: Foto-Dokumentenpapier F. 49 der *Kopit AG.*, Bern.

²⁸⁾ Vor der Eluierung der Papierstücke wurden die Standardsubstanzen durch Ausscheiden der entsprechenden Zonen sorgfältig entfernt.

²⁹⁾ Das Blatt tauchte man in einer 20-proz. Lösung des Imprägnierungsmittels in Aceton und trocknete 5 Min. bei Raumtemperatur, Startlinie nach oben.

³⁰⁾ *W. J. Mader & R. R. Buck*, *Anal. Chemistry* **24**, 666 (1952); *S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euv, O. Schindler & T. Reichstein*, *Helv.* **37**, 1163 (1954); Empfindlichkeit der Reaktion im Chromatogramm 0,2 γ /cm².

³¹⁾ Vgl. Fussnote 13 sowie *R. Neher & A. Wettstein*, *Helv.* **34**, 2278 (1951). Empfindlichkeit 0,5—2 γ /cm².

³²⁾ *D. Kritchevsky & M. R. Kirk*, *Arch. Biochemistry Biophysics* **35**, 346 (1952).

2-n. NaOH entwickelt. Die Intensität des sich blau färbenden Fleckens mit demselben R_f -Wert wie Hydrocortison wurde unabhängig von 2 Personen visuell mit denjenigen bekannter Konzentration verglichen und mengenmässig abgeschätzt. Nach 5 Min. wurde der Streifen 15 Min. auf 90° erhitzt. Die für Δ^4 -3-Ketosteroide charakteristische gelbe Fluoreszenz des Fleckens im UV. wurde wie oben ausgewertet. Der Mittelwert der Schätzungen ergab 5 γ Hydrocortison.

Das Eluat (0,3 mg) des dem Cortison entsprechenden Streifens (Zone V) chromatographierte man parallel mit den Standardlösungen von Hydrocortison und 20 γ Cortison im C-System von *Bush*. Auf der Photokopie liessen sich auf der Höhe der beiden Testsubstanzen 2 absorbierende Flecken erkennen, die eine positive Reduktionsprobe ergaben. Nach dem Erhitzen der nassen, alkalischen Streifen zeigten sie im UV.-Licht die charakteristische gelbe Fluoreszenz. Für die halbquantitative Bestimmung wurde wie oben beschrieben vorgegangen. Es konnten 1—2 γ Aldosteron und 5,5 γ Cortison nachgewiesen werden. Da Hydrocortison bereits im System Formamid-Chloroform vom Cortison und Aldosteron abgetrennt wurde, Aldosteron aber im C-System ungefähr die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie das parallel mitlaufende Hydrocortison aufweist, ist die Identität der langsamer wandernden Substanz mit Aldosteron gesichert.

Bestimmung von Testosteron in der Zone III. Gemäss unseren Erfahrungen konnte die Zone III noch weniger polare Cortico-Steroide und androgene Hormone vom Typus des Testosterons enthalten. Ihr Eluat (12,32 mg) wurde im System Propylenglykol-Toluol parallel mit Testosteron chromatographiert. Der Papierbogen wurde knapp oberhalb der Markiersubstanz durchgeschnitten. Im Eluat der oberen Zone VI (1,8 mg) liessen sich nach der Auftrennung im System B3 von *Bush* keine aktiven Corticosteroide nachweisen. Nach der Chromatographie des Extraktes (8,4 mg) der unteren Zone VII im System B3 wurde der durch mitgelaufenes Testosteron und Androsteron begrenzte Streifen abgetrennt und eluiert. 600 γ des Rückstandes (2,6 mg) trennte man im selben System weiter auf. Auf der Höhe des Testosterons zeigte sich ein UV.-absorbierender Flecken, dessen Eluat im System Propylenglykol-Toluol parallel mit Standardlösungen von Testosteron (1, 2, 5, 10 γ) chromatographiert wurde. Auch in diesem stark differenzierenden System zeigte die isolierte Substanz genau dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit wie Testosteron. Das trockene Papier erhitze man nach dem Tauchen in 2-n. Natronlauge 15 Min. auf 90°, worauf die Intensitäten der im UV.-Licht gelb fluoreszierenden Flecken verglichen wurden. Der Mittelwert aus 3 Bestimmungen betrug 5—6 γ , berechnet auf die Gesamtmenge 22—26 γ .

In einem mit 600 γ parallel durchgeführten Chromatogramm im System B3 liessen sich weder reduzierende (Blautetrazolium) Substanzen noch mit Phosphormolybdänsäure Androsteron nachweisen.

Untersuchung der Phenole (H). Dieser Anteil wurde lediglich auf seinen Gehalt an Östron, Östradiol und Östriol untersucht. Nach Chromatographie im System Formamid-Benzol wurden die Eluate der den drei aufgeführten Hormonen entsprechenden Zonen im System B3 weiter angereichert. Die für Östrogene positiven Farbreaktionen mit FeCl_3 - $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ³³⁾, SbCl_3 und nach *O. Folin & V. Ciocaltu*³⁴⁾ verliefen mit allen Fraktionen negativ.

Zusammenfassung.

In Metastasen eines NNR-Karzinoms, welches bei der Patientin Anzeichen einer leichten Virilisierung erzeugte, konnte neben Aldosteron, Hydrocortison und Cortison erstmals Testosteron nachgewiesen werden.

Medizinische Universitätsklinik, Zürich,
und Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

³³⁾ G. M. Barton, R. S. Evans & J. A. F. Gariner, *Nature* **170**, 249 (1952).

³⁴⁾ *J. biol. Chemistry* **73**, 627 (1927).