

verblichen 260 mg Neutralteile vom Smp. 180°. Nach chromatographischer Reinigung auf Aluminiumoxyd schmolz das Produkt bei 198,5–200°. Es wurde zur Analyse aus Methylenchlorid-Äther umkristallisiert und dann im Hochvakuum bei 170° sublimiert.  $[\alpha]_D^{25} = -61^\circ \pm 1,5^\circ$  ( $c = 0,459$  in Feinsprit). UV.-Spektrum: max 287  $m\mu$ ;  $\log \epsilon = 1,8$  (in Feinsprit).

$C_{18}H_{26}O_3$  Ber. C 74,45 H 9,03%  $[\eta] 3$  Gef. C 74,45 H 9,00%  $[\eta] 2,93$

130 mg Ozonisationsprodukt wurden in einer 2,5-proz. Lösung von Kaliumhydroxyd in Methanol 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach der üblichen Aufarbeitung und nach chromatographischer Reinigung des Neutralproduktes wurde das Ausgangsmaterial unverändert (Smp. 199–201°) zurückerhalten.

Zur Isolierung der *Oxalsäure* wurden die ammoniakalischen Auszüge zuerst 10 Min. zur Entfernung des Essigesters gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit verd. Salzsäure angesäuert (Indikator Methylrot) und die Lösung bei etwa 80° mit Calciumchlorid versetzt, dann mit verd. Ammoniak neutralisiert und stehengelassen. Das ausgeschiedene Calciumoxalat wurde auf einer tarierten Glasnutsche abfiltriert, mit wenig Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und nach 10-stündigem Trocknen gewogen. Ausbeute 141,5 mg  $Ca(COO)_2 \cdot H_2O$ . Der Niederschlag wurde dann in Salzsäure gelöst, filtriert, und die Oxalsäure im Extraktionsapparat nach KUTSCHER-STEUDEL mit Äther extrahiert. Der Rückstand des Ätherextraktes wurde sublimiert: 60 mg wasserfreie Oxalsäure vom Smp. 187–189°, die mit authentischer Oxalsäure (Smp. 189°) keine Smp.-Erniedrigung zeigte und einen positiven Indophenol-Test gab.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung W. MANSER) ausgeführt. Die IR.-Absorptionsspektren wurden von Herrn A. HÜBSCHER auf einem BAIRD-Spektrographen, Mod. B, aufgenommen.

#### SUMMARY

The degradation of diketocassenic acid with ozone yields a triketone  $C_{18}H_{26}O_3$  and oxalic acid.

Organisch-chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

## 10. Neue $16\alpha$ -Hydroxysteroidoide aus menschlichem Urin und aus Schweine-Nebennieren. Isolierung, Konstitution, Synthesen

Über Steroide, 156. Mitteilung<sup>1)</sup>

von R. Neher, Ch. Meystre und A. Wettstein

(28. XI. 58)

Vor kurzem haben wir die Isolierung eines neuen Steroides, des  $3\beta, 16\alpha$ -Dihydroxyallopregnan-20-on (XV), aus Schweine-Nebennieren beschrieben<sup>1)</sup>. Dieses Steroid verursachte unter besonderen biologischen Bedingungen an der adrenaletomierten männlichen Ratte erhöhte oder beschleunigte Natriumausscheidung; es wurde daher provisorisch als SEF (Sodium excreting factor) bezeichnet. Auf Grund einer Hypothese von WILKINS & LEWIS<sup>2)</sup> zur Erklärung des adrenogenitalen Salzverlust-

<sup>1)</sup> 155. Mitteilung: R. NEHER, P. DESAULLES, E. VISCHER, P. WIELAND & A. WETTSTEIN, Helv. **41**, 1667 (1958).

<sup>2)</sup> L. WILKINS & R. A. LEWIS, Trans. 17th Meet. Conf. on Metabol. Aspects of Convalescence, J. Macy, Jr. Found. New York, **1948**, 168.

syndroms<sup>3)</sup> sowie der in gleiche Richtung weisenden Befunde von PRADER, SPAHR & NEHER<sup>4)</sup> über die Aldosteronausscheidung in solchen Fällen haben wir schon früher versucht, aus *Urin* eines dieser Patienten (B. M.) einen ähnlichen Faktor zu isolieren, was uns vor einiger Zeit auch gelungen ist<sup>1)5)</sup>. Die kürzlich erschienene Arbeit von KLEIN und Mitarbeitern<sup>6)</sup> über den biologischen Nachweis einer natriumdiuretischen Fraktion aus *Urin* von Neugeborenen<sup>7)</sup> veranlasst uns, die Versuche zur Isolierung des erwähnten Faktors aus *Urin* von Patienten mit adrenogenitalem Salzverlustsyndrom näher zu beschreiben und über seine Konstitution und Synthese zu berichten.

### Isolierung aus *Urin*

Auf Grund der bereits kurz beschriebenen<sup>1)</sup> und zahlreicher anderer Vorversuche mit *Harn* und der bei der Isolierung von SEF aus Nebennieren gewonnenen Erfahrung wurde unter ständiger biologischer Kontrolle *Urin* von 2 weiteren Patienten (B. U., F. R.) mit klinisch kompensiertem, congenitalem adrenogenitalem Salzverlustsyndrom auf folgende Weise aufgearbeitet:

Zunächst extrahierte man gemäss Schema 1 die freien und konjugierten Steroide nach EDWARDS, KELLIE & WADE<sup>8)</sup>, löste den Rohextrakt in Wasser, extrahierte einmal ohne Hydrolyse (A), dann nach enzymatischer (B) und schliesslich saurer Hydrolyse (C) und teilte die einzelnen Extrakte in neutrale (n) und saure (s) Anteile auf. In der Folge zeigte lediglich der enzymatisch hydrolysierte Neutralextrakt Bn bei der biologischen Testierung eine natriuretische Wirkung, so dass hier nur von diesem die weitere Aufarbeitung nach Schema 2 beschrieben wird. Nach Behandlung mit GIRARD-Reagens T<sup>9)</sup> befand sich die wirksame Substanz im ketonischen Anteil («Keton I»); sie liess sich ebenso wie die Hauptmenge des letzteren mit Digitonin *nicht* fällen, im Gegensatz zum 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (XV) aus Nebennieren<sup>1)</sup>.

Der ketonische, nicht fällbare Anteil<sup>10)</sup> wurde anschliessend mit Hilfe des roten Leitfarbstoffes F<sub>5</sub> hintereinander in 4 verschiedenen Systemen präparativ papierchromatographiert (in Schema 2 sind die biologisch wirksamen Zonen schraffiert dargestellt). Beim ersten Chromatogramm (F/Be-CHCl<sub>3</sub>) befand sich etwa die Hälfte der eingesetzten Menge in Fraktion b<sub>1</sub>, die noch zahlreiche Komponenten enthielt. Eine davon, *Verbindung III*, liess sich im zweiten Chromatogramm (Propylenglykol/Toluol) aus Fraktion c<sub>2</sub> abtrennen und in kristallisierter Form isolieren. Fraktion b<sub>2</sub> enthielt ferner noch die Verbindungen I, II und IV, aber kein XV; letzteres hätte sich nach seinen chromatographischen Eigenschaften hier befinden müssen, falls die

<sup>3)</sup> Über die verschiedenen Bezeichnungen dieses Krankheitsbildes vgl. A. PRADER, Schweiz. med. Wochenschr. **86**, 289 (1956).

<sup>4)</sup> A. PRADER, A. SPAHR & R. NEHER, Schweiz. med. Wochenschr. **85**, 1085 (1955).

<sup>5)</sup> A. WETTSTEIN, Verhandlg. Schweiz. naturforsch. Ges. **136**, 22 (1956).

<sup>6)</sup> R. KLEIN, P. TAYLOR, C. PAPADATOS, Z. LARON, D. KEELE, J. FORTUNATO, C. BYERS & C. BILLINGS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **98**, 863 (1958). Herr Dr. R. KLEIN hat uns von seinen Arbeiten freundlicherweise schon vorgängig dieser Publikation Kenntnis gegeben.

<sup>7)</sup> R. KLEIN, P. TAYLOR, Z. LARON, C. PAPADATOS, J. FORTUNATO & C. BYERS, Amer. J. Dis. Childr. **93**, 79 (1957).

<sup>8)</sup> R. W. H. EDWARDS, A. E. KELLIE & A. P. WADE, Memoirs Soc. Endocrinol. **2**, 53 (1953).

<sup>9)</sup> A. GIRARD & G. SANDULESCO, Helv. **19**, 1095 (1936).

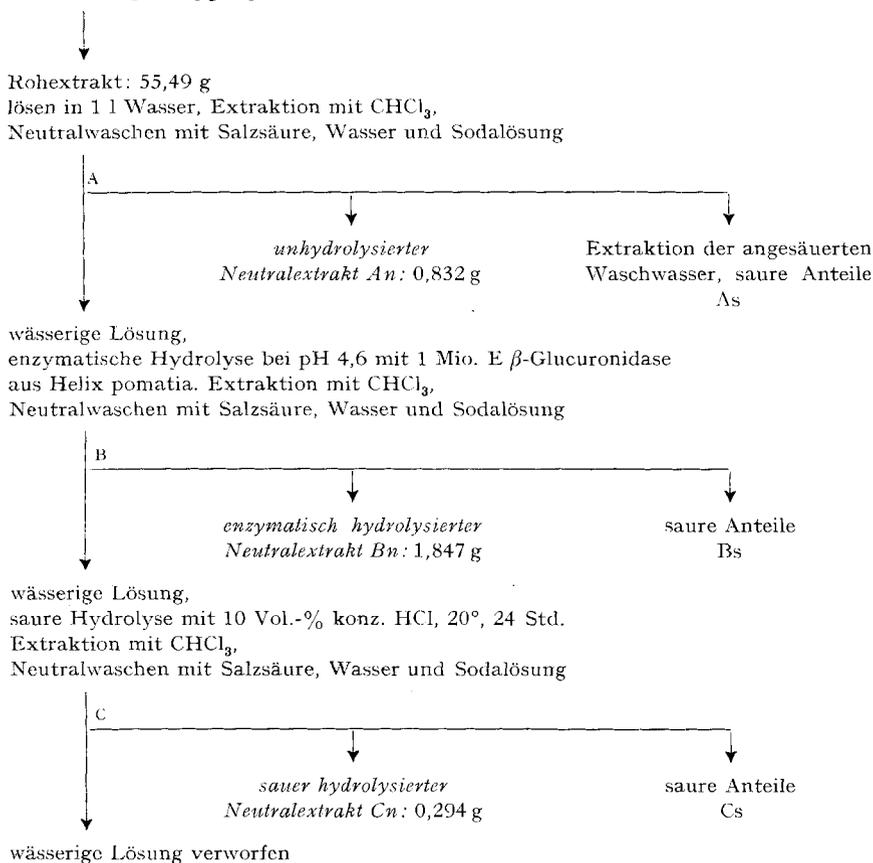
<sup>10)</sup> In weiteren Ansätzen wurde auf die Behandlung mit Digitonin verzichtet.

## Schema 1

## Urin-Extraktion

11 l Urin, pH 6,3 (Patient B. U., Charge 4)

versetzen mit 5,5 kg  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Extraktion mit  $3 \times 11$  l Äther-Äthanol (3:1)



Digitoninfällung durch Verunreinigungen verhindert worden wäre. Die Aufspaltung von Fraktion  $b_2$  im System Formamid/Benzol lieferte aus Fraktion  $d_3$  ein weiteres Kristallinat, *Verbindung II*. Die Auftrennung der wirksamen, aber noch uneinheitlichen Zone  $c_3$  gelang weitgehend in einem 4. Chromatogramm (BUSH  $B_3$ ), wobei schliesslich die *Verbindungen I* und *IV* in kristallisierter Form anfielen. Zur völligen Reinigung musste die Chromatographie in einzelnen Systemen gelegentlich wiederholt und noch in geringer Menge vorhandenes nicht-ketonisches Material durch neuerliche Umsetzung mit GIRARD-Reagens T entfernt werden.

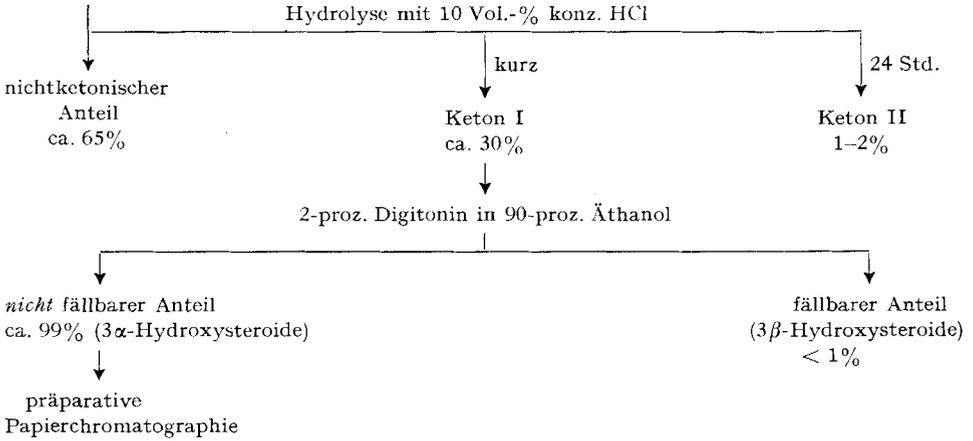
Der bei der Girardierung des Neutralextraktes  $\text{Bn}$  anfallende nicht-ketonische Anteil bestand im wesentlichen aus dem bekannten Pregnan- $3\alpha, 17\alpha, 20\alpha$ -trio<sup>11)</sup>, das wir in relativ grosser Menge isolierten.

<sup>11)</sup> H. L. MASON & E. J. KEPLER, J. biol. Chemistry **161**, 235 (1945).

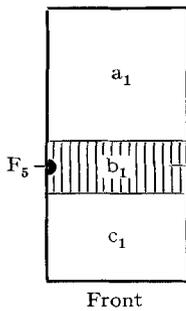
**Schema 2**

*Fraktionierung des enzymatisch hydrolysierten Neutralextraktes Bn (vgl. Schema 1)*

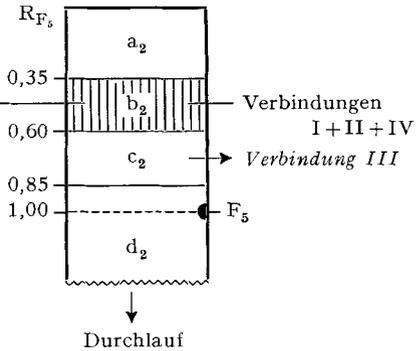
Girardierung



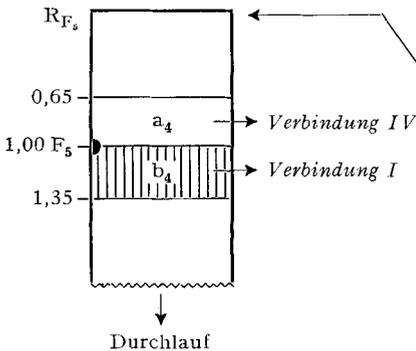
1. System: Formamid/Benzol-CHCl<sub>3</sub> (1:1)  
ca. 10 mg/Blatt



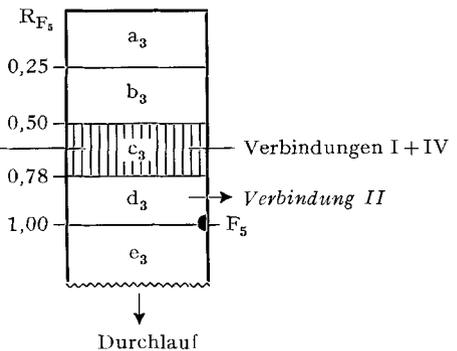
2. System: Propylenglykol/Toluol  
ca. 5 mg/Blatt



4. System: BUSH B<sub>3</sub>  
ca. 1–2 mg/Blatt



3. System: Formamid/Benzol  
ca. 2–3 mg/Blatt



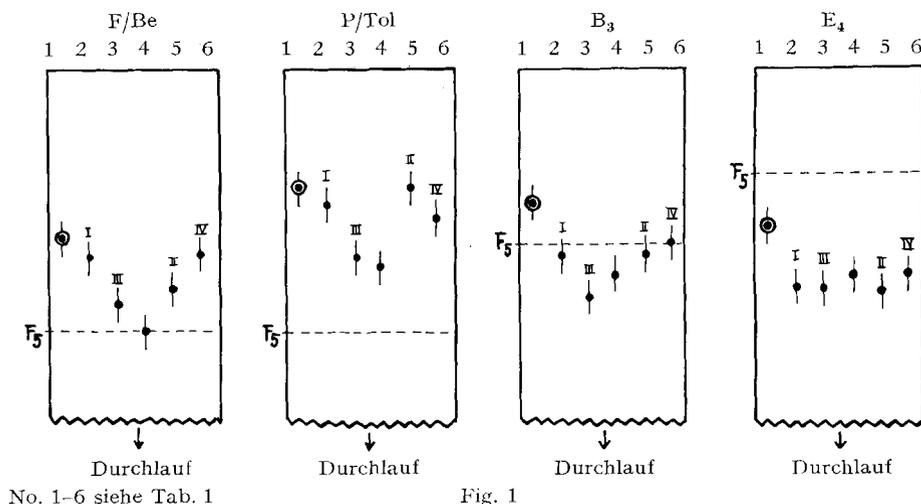


Fig. 1

No. 1-6 siehe Tab. 1

Tabelle 1. *Chromatographisches Verhalten von 3,16-Dihydroxy-pregnan-20-onen bzw. Verbindungen I-IV*

		$R_{F_5}$ -Werte ( $F_5$ = roter Azofarbstoff <sup>e)</sup> )						
		F/Be	P/Tol	$B_3$	$E_4$	DNPH <sup>a)</sup>	$SbCl_3$ <sup>b)</sup>	DNB <sup>c)</sup>
1	3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (= SEF, XV) . . . . .	0,65	0,44	0,77	1,50	+	blau <sup>d)</sup>	-
2	3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (= Verbindung I) <sup>f)</sup> . . . . .	0,72	0,51	1,06	2,08	+	blau <sup>d)</sup>	-
3	3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (= Verbindung III) . . . . .	0,89	0,71	1,29	2,08	+	blau <sup>d)</sup>	-
4	3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (XIX) . . . . .	1,00	0,75	1,17	1,96	+	blau <sup>d)</sup>	-
5	Verbindung II . . . . .	0,84	0,45	1,06	2,10	+	blau-violett	-
6	Verbindung IV . . . . .	0,71	0,56	0,99	1,94	+	hell-violett <sup>g)</sup>	rot
7	3 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (= 16-iso-SEF, XXIV) . . . . .	0,64	0,44	0,76	1,32	+	blau <sup>d)</sup>	-
8	$\Delta^5$ -3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnen-20-on (= $\Delta^5$ -SEF, XXXII) . . . . .	0,62	0,39	0,69	1,40	+	gelb-orange	-
9	$\Delta^5$ -3 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dihydroxy-pregnen-20-on (= $\Delta^5$ -16-iso-SEF, XXXIII) . . . . .	0,60	0,39	0,65	1,25	+	gelb-orange	-

a) Dinitrophenylhydrazin.

b) Fluoreszenz bei 360 m $\mu$ .

c) alkal. m-Dinitrobenzol (ZIMMERMANN).

d) Je nach Konzentration der Substanz und angewandtem Lösungsmittelsystem kann die Fluoreszenz auch gelb sein.

e) Die Relation zu Corticosteron oder Cortison ergibt sich ohne weiteres aus Tab. 1 in <sup>1)</sup>; Lösungsmittelsysteme s. Exp. Teil.f) Die 16 $\beta$ -isomere Verbindung X war papierchromatographisch praktisch nicht von I unterscheidbar.

g) Sehr schwach.

In Fig. 1 und Tab. 1 ist das relative chromatographische Verhalten von SEF (XV), seinen Stereoisomeren und den Verbindungen I–IV wiedergegeben. Während sich die am C-Atom 3 und 5 stereoisomeren Verbindungen durch ein- oder mehrfache Chromatographie in diesen Systemen trennen lassen, ist dies bei den nur an C-16 isomeren Verbindungen nicht der Fall; letztere weisen auch sonst viele untereinander ähnliche Eigenschaften wie Smp., Löslichkeit und IR.-Transmission auf. Von den Verbindungen I–IV erwies sich I als natriuretisch wirksam, aber nur in etwa 20fach höherer Dosis als der sehr ähnlich wandernde SEF aus Nebennieren. Ausserdem zeigte Verbindung II eine gewisse diuretische Wirkung. Verbindungen III und IV erwiesen sich in den geprüften Dosen als inaktiv<sup>12)</sup>.

### Konstitution und Synthese

*Verbindung I* (Smp. 209–212°), die in einer Ausbeute von einigen Milligrammen pro 10–15 l Urin isoliert werden konnte, absorbierte nicht bei 240 m $\mu$  und war nicht reduzierend. Das chromatographische Verhalten, die Farbreaktionen, die leichte völlige Acetylierbarkeit, das Ergebnis der Verseifung des Acetates (vgl. 1)) sowie die IR.-Spektren (Fig. 2a und b) liessen das Vorliegen eines zu XV sehr ähnlichen Dihydroxyketosteroides vermuten. Das Verhalten gegenüber Digitonin sowie die IR.-

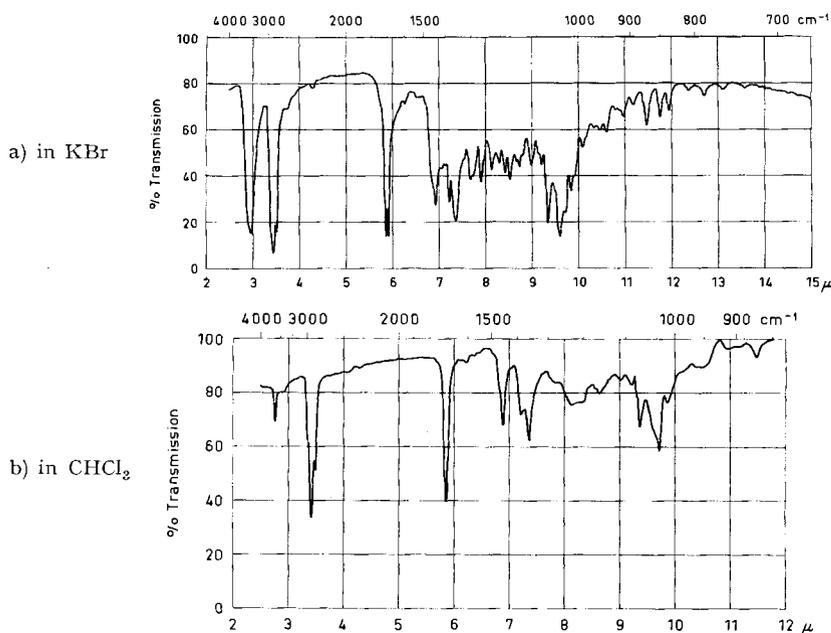


Fig. 2. IR.-Spektren von 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (I)

Das Spektrum in KBr weist eine interessante Doppelstruktur der 20-Keto-Bande auf. Das Material wurde regeneriert; es erwies sich nach Smp. und Papierchromatographie als völlig unverändert und gab in CHCl<sub>3</sub> nur eine normale einfache Bande im Doppelbindungs-bereich (vgl. hierzu auch <sup>13)</sup>).

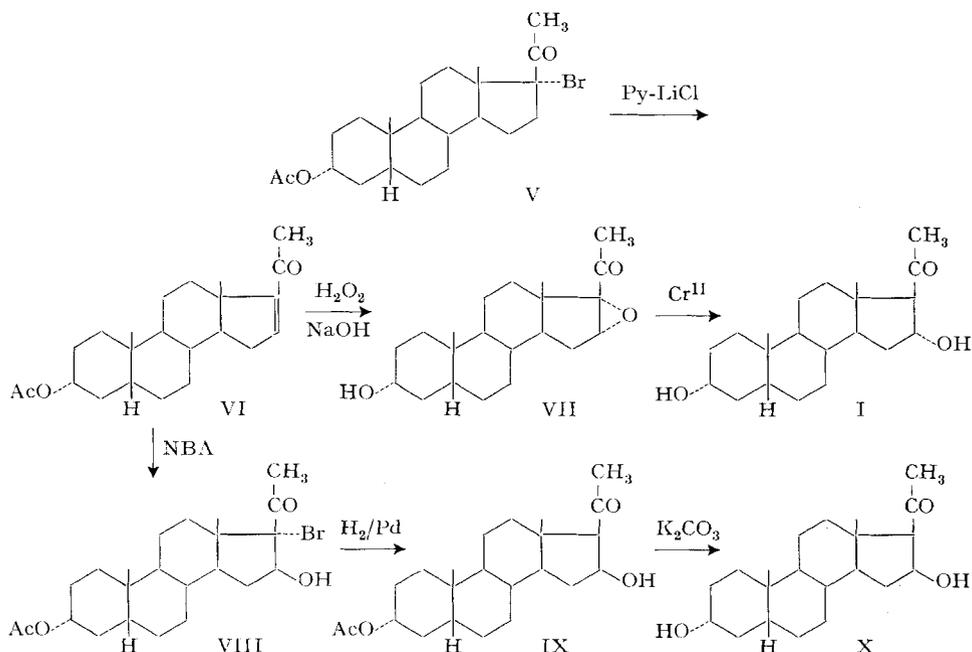
<sup>12)</sup> Wir danken Herrn Dr. P. DESAULLES bestens für die Ausführung der zahlreichen biologischen Testierungen, über deren Ausführung später berichtet wird.

<sup>13)</sup> R. N. JONES & K. DOBRINER, *Vitamins and Hormones* **7**, 310 (1949); H. ROSENKRANTZ & L. ZABLOW, *Analyt. Chemistry* **25**, 1025 (1953).

Spektren der freien und acetylierten Verbindung sprachen für ein  $3\alpha$ -Hydroxy- $5\beta$ -steroid. Durch Vergleich mit dem darauf partialsynthetisch hergestellten  $3\alpha,16\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on und seinem Diacetat im Misch-Smp., Papierchromatogramm, IR.-Spektrum sowie im biologischen Test liess sich für Verbindung I tatsächlich diese Konstitution beweisen.

Damit dürfte das  $3\alpha,5\beta$ -Isomere (I) des Nebennieren-SEF ( $3\beta,5\alpha$ -Isomeres, XV) das natriumdiuretische Prinzip der untersuchten Urinproben von 3 Patienten mit latentem congenitalem adrenogenitalem Salzverlustsyndrom darstellen. Von I war in den Nebennieren keine Spur zu finden gewesen. Ebensovienig konnte aus Urin, trotz grosser Bemühungen, der Nebennieren-SEF XV isoliert werden und zwar weder aus den mit Digitonin fällbaren noch den unfällbaren Anteilen. Eine chromatographisch sich identisch verhaltende Verbindung wurde lediglich in einem Fall (B. M., Charge 6) in kleinster Menge nachgewiesen.

Die Synthese von Verbindung I ging von  $\Delta^{16}$ - $3\alpha$ -Acetoxy-pregnen-20-on<sup>14</sup>) (VI) aus, welches durch Bromierung von  $3\alpha$ -Acetoxy-pregnan-20-on zum  $17\alpha$ -Brom-Derivat V und Bromwasserstoff-Abspaltung bereitet worden war. VI wurde in das  $16,17\alpha$ -Epoxyd VII und weiter durch Reduktion mit Chrom(II)-acetat in das gewünschte  $3\alpha,16\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (I) vom Smp. 211–213° übergeführt.



Das vergleichsweise synthetisierte  $16\beta$ -Isomere X war in mässiger Ausbeute ausgehend von VI über die  $16\beta$ -Hydroxy- $17\alpha$ -brom-Verbindung VIII und das 3-Monoacetat IX erhältlich. Papierchromatogramme und IR.-Spektren von I und X unterschieden sich praktisch nicht, hingegen zeigte das Gemisch der Isomeren eine Smp.-Erniedrigung.

<sup>14</sup>) R. E. MARKER, J. Amer. chem. Soc. **62**, 3350 (1940).

Die von I am schwersten trennbare und nur in geringerer Ausbeute erhaltene *Verbindung IV* (vom Smp. 188–196°) zeichnete sich durch rötliche ZIMMERMANN-Reaktion aus, besass aber, wie aus dem IR.-Spektrum ersichtlich (Fig. 3), keine 17-Ketogruppe; Reduktionsvermögen und UV.-Absorption bei 240 m $\mu$  fehlten.

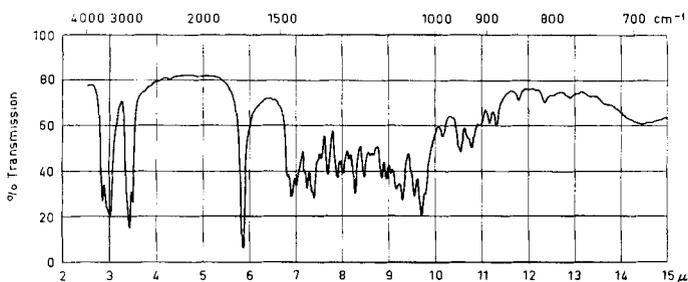


Fig. 3. IR.-Spektrum von *Verbindung IV* in KBr

Diese *Verbindung* ist aus Substanzmangel vorläufig nicht weiter untersucht worden. Dasselbe gilt für *Verbindung II* (vom Smp. 204–210°), die in ebenso geringer Ausbeute wie IV anfiel. Obwohl ihr IR.-Spektrum (Fig. 4) demjenigen von I bzw. 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (XV)<sup>1)</sup> bemerkenswert ähnlich ist und ihr Acetat bei der alkalischen Verseifung ebenfalls ein UV.-absorbierendes Produkt geringerer Polarität lieferte, kann es sich nach den bisherigen Befunden doch nicht um eines der 8 an C-3, -5 oder -16 isomeren 3,16-Dihydroxy-pregnan-20-one handeln.

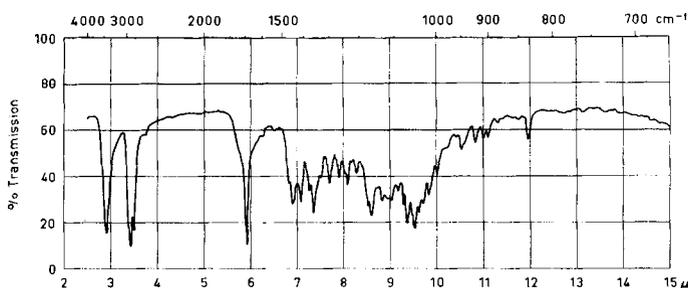


Fig. 4. IR.-Spektrum von *Verbindung II* in KBr

Die etwas schwächer polare *Verbindung III*, die sich bereits im 2. System abtrennen liess, fiel mit dem Smp. 209–211° in gleicher oder etwas grösserer Ausbeute als I an. Ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften (IR.-Spektrum s. Fig. 5a) sprachen für ein 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on, also ein Stereoisomeres von I und XV. Diese Vermutung liess sich durch Vergleich mit der für diesen Zweck synthetisierten *Verbindung III* mit dem Smp. 209–211° vollauf bestätigen. Die Synthese wurde analog zu derjenigen von I durchgeführt, wobei man ausgehend von 3 $\alpha$ -Hydroxy-allopregnan-20-on<sup>15)</sup> über das 17 $\alpha$ -Bromid,  $\Delta^{16}$ -20-Keton XI<sup>16)</sup> und 16,17 $\alpha$ -Epoxyd XII, letzteres mit Chrom(II)-acetat zu III reduzierte.

<sup>15)</sup> Ein Teil dieser Substanz wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. T. REICHSTEIN und Herrn J. VON EUW zur Verfügung gestellt, wofür wir auch hier bestens danken.

<sup>16)</sup> A. BUTENANDT, L. MAMOLI & A. HEUSNER, Ber. deutsch. chem. Ges. **72**, 1614 (1939).

In der Zwischenzeit gelang es, *Verbindung III* auch aus *Schweine-Nebennieren*, aber in Form einer Modifikation vom Smp. 227–229° zu isolieren. Bei der präparativen Papierchromatographie der Corticosteron-Mutterlaugen A III (s. <sup>1)</sup>, p. 1672–1673) in Formamid/Benzol-Chloroform (915 Blätter) und Propylenglykol/Toluol (110 Blätter) erhielt man aus der dort bezeichneten Fraktion c, die der SEF-Zone vorausgewandert war, Kristalle vom Smp. 227–229° in einer Ausbeute von 38 mg pro Tonne tiefgefrorener *Schweine-Nebennieren*. Diese Verbindung stellt die zweite aus *Nebennieren* gewonnene 16 $\alpha$ -hydroxylierte Verbindung dar. Papierchromatographisch und chemisch unterscheidet sie sich nicht von der tiefschmelzenden Verbindung III

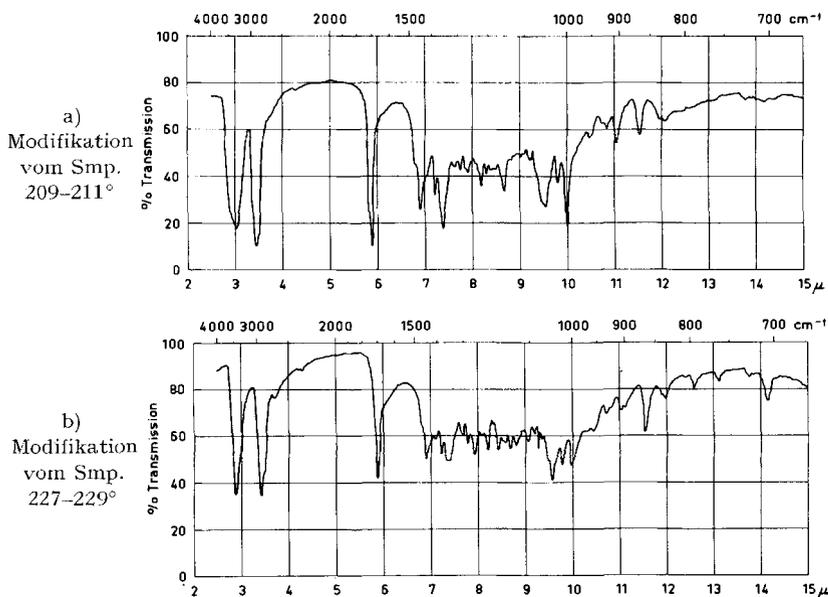
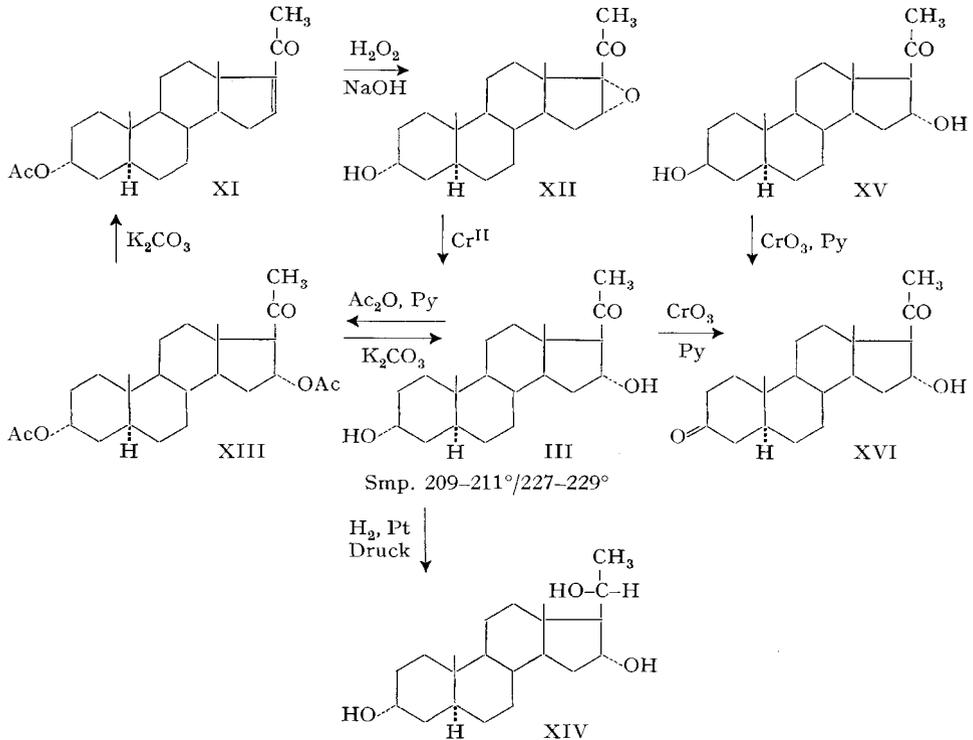


Fig. 5. IR.-Spektren von 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (III) in KBr

aus *Urin*, hingegen deutlich im IR.-Spektrum in KBr (Fig. 5b). Die Lösungsspektren der Diacetate beider Provenienz erwiesen sich aber als identisch, so dass der Unterschied der beiden Substanzen III mit verschiedenem Smp. lediglich durch Dimorphie verursacht ist<sup>13)</sup>. Die KBr-Technik wurde für die IR.-Spektren der freien Dihydroxy-Substanzen deshalb gewählt, weil deren Löslichkeit sehr gering ist; nur Chloroform gab noch einigermaßen brauchbare (identische) Spektren.

Aus synthetischem III liess sich durch Umkristallisieren schliesslich auch seine höher schmelzende Modifikation herstellen. Die Übereinstimmung des isolierten III mit synthetischem 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on in Misch-Smp., IR.-Spektren und papierchromatographischem Verhalten lässt auf Grund der Erfahrungen mit unseren synthetischen 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Hydroxy-pregnanderivaten nicht mit völliger Sicherheit feststellen, ob es sich beim isolierten Produkt um das 16 $\alpha$ - oder 16 $\beta$ -Isomere handelt. Dies konnte jedoch leicht durch Hydrierung zu den entsprechenden bekannten Triolen entschieden werden. Aus unseren Präparaten verschiedener Herkunft erhielten wir in jedem Fall Allopregnan-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,20 $\beta$ -triol (XIV) vom Smp.

234–235°<sup>17)</sup>, während das 3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,20 $\beta$ -Isomere bei 263–265°<sup>18)</sup> und das 3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,20 $\alpha$ -Isomere bei 210–212°<sup>19)</sup> schmilzt. Ausserdem wurde III durch partielle Dehydrierung in 3-Stellung in das 16 $\alpha$ -Hydroxy-allopregnan-3,20-dion (XVI) übergeführt, das früher aus dem entsprechenden 3 $\beta$ -Hydroxy-Derivat XV hergestellt worden war<sup>1)</sup>.



In diesem Zusammenhang haben wir noch weitere, ebenfalls in Tab. 1 aufgeführte 3,16-Dihydroxy-20-oxo-pregnane und ihre  $\Delta^5$ -Derivate synthetisiert. Die letzte der vier in 3- und 5-Stellung isomeren Verbindungen der 16 $\alpha$ -Hydroxyreihe, das 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (XIX), von welchem lediglich das 3-Monoacetat und das amorphe Diacetat bekannt waren<sup>20)</sup>, wurde analog zu seinem 5 $\alpha$ -Isomeren XV<sup>1)</sup> durch Seitenkettenabbau von Di-O-acetyl-pseudosarsasapogenin (XVII) über die  $\Delta^{16}$ -Verbindung XVIII<sup>21)</sup> und ihr 16,17 $\alpha$ -Epoxyd hergestellt. Verbindung XIX schmolz bei 198–199°, eine zweite Modifikation bei 212–215°; über die papierchromatographische Differenzierung von den anderen Isomeren I, III und XV geben Tab. 1 und Fig. 1 Aufschluss; IR.-Spektrum s. Fig. 6. Verbindung XIX liess sich weder

<sup>17)</sup> H. HIRSCHMANN, F. B. HIRSCHMANN & M. A. DAUS, J. Amer. chem. Soc. **74**, 539 (1952).

<sup>18)</sup> R. E. MARKER, D. L. TURNER, R. B. WAGNER, P. R. ULSHAFFER, H. M. CROOKS, JR. & E. L. WITTLER, J. Amer. chem. Soc. **63**, 779 (1941).

<sup>19)</sup> R. E. MARKER, D. L. TURNER, R. B. WAGNER & P. R. ULSHAFFER, J. Amer. chem. Soc. **63**, 772 (1941).

<sup>20)</sup> H. HIRSCHMANN & F. B. HIRSCHMANN, J. Amer. chem. Soc. **78**, 3755 (1956).

<sup>21)</sup> R. E. MARKER & E. ROHRMANN, J. Amer. chem. Soc. **62**, 521 (1940).

in Urin noch in Nebennieren nachweisen, besitzt aber eine mit I vergleichbare natriumdiuretische Wirksamkeit.

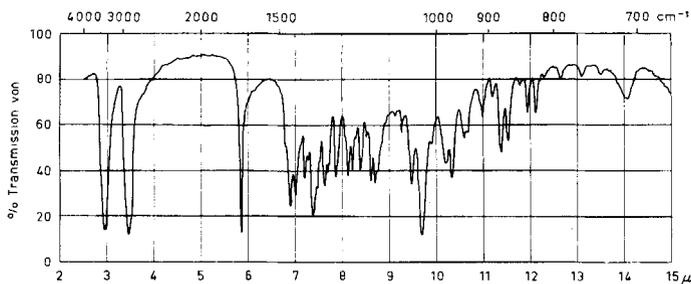
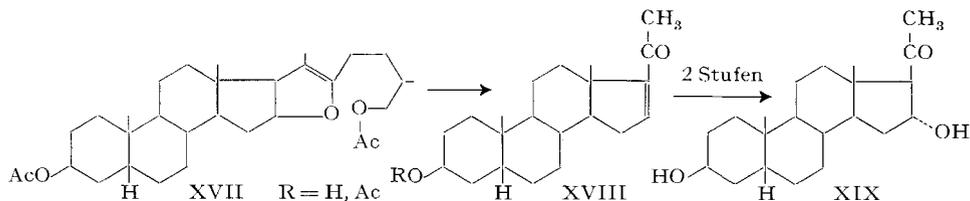


Fig. 6. IR.-Spektrum von  $3\beta,16\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (XIX) in KBr

Von den  $16\beta$ -Hydroxy-Verbindungen der gesättigten Reihe wurde ausser dem erwähnten  $3\alpha,5\beta,16\beta$ -Derivat X auch das mit Verbindung XV nahe verwandte  $3\beta,16\beta$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (XXIV) entsprechend dem Formelschema aus Tigogenin über XX, XXI, XXII und XXIII synthetisiert. XXIV zeigte praktisch den gleichen Smp. wie XV, keine nennenswerte Depression im Misch-Smp. und ein ausserordentlich ähnliches IR.-Spektrum in KBr oder Nujol<sup>1)</sup>, liess sich aber von XV eindeutig durch Hydrierung zum Allopregnan- $3\beta,16\beta,20\beta$ -triol (XXVI) bzw. dessen 3-Monoacetat XXV oder Triacetat XXVII<sup>22)</sup> differenzieren; das entsprechende



Allopregnan- $3\beta,16\alpha,20\beta$ -triol aus XV, welches das sog. MARRIAN'sche Triol<sup>23)24)</sup> darstellt, unterschied sich nämlich gut in seinen Eigenschaften von XXVI. Letzteres war auch auf dem übersichtlicheren Weg direkt aus XX über das Hydrierungsprodukt XXVIII<sup>22)</sup> erhältlich. XXII wurde zur Kontrolle in das  $16,17\beta$ -Epoxyd XXX und dessen Acetat XXXI übergeführt. Die beiden letzteren Verbindungen liessen sich ebenfalls aus XX über die  $17\alpha$ -Bromverbindung XXIX gewinnen, allerdings nur in mässiger Ausbeute, so dass diese Variante, welche auch zu XXII führen müsste, zugunsten der anderen nicht weiter verfolgt wurde.

Vergleichsweise haben wir ferner die in 5,6-Stellung ungesättigten Analogen von XV und XXIV, das bereits bekannte<sup>25)</sup>  $\Delta^5$ - $3\beta,16\alpha$ -Dihydroxy-pregnen-20-on (XXXII) und sein  $16\beta$ -Isomeres XXXIII hergestellt. Verbindung XXXII wurde ausgehend von Diosgenin nach der schon mehrfach benutzten Methode über das  $\Delta^{5:16}$ -Dien erhalten; das  $16\beta$ -Isomere XXXIII stellten wir aus dem schon bekannten  $\Delta^5$ - $3\beta,16\beta$ -

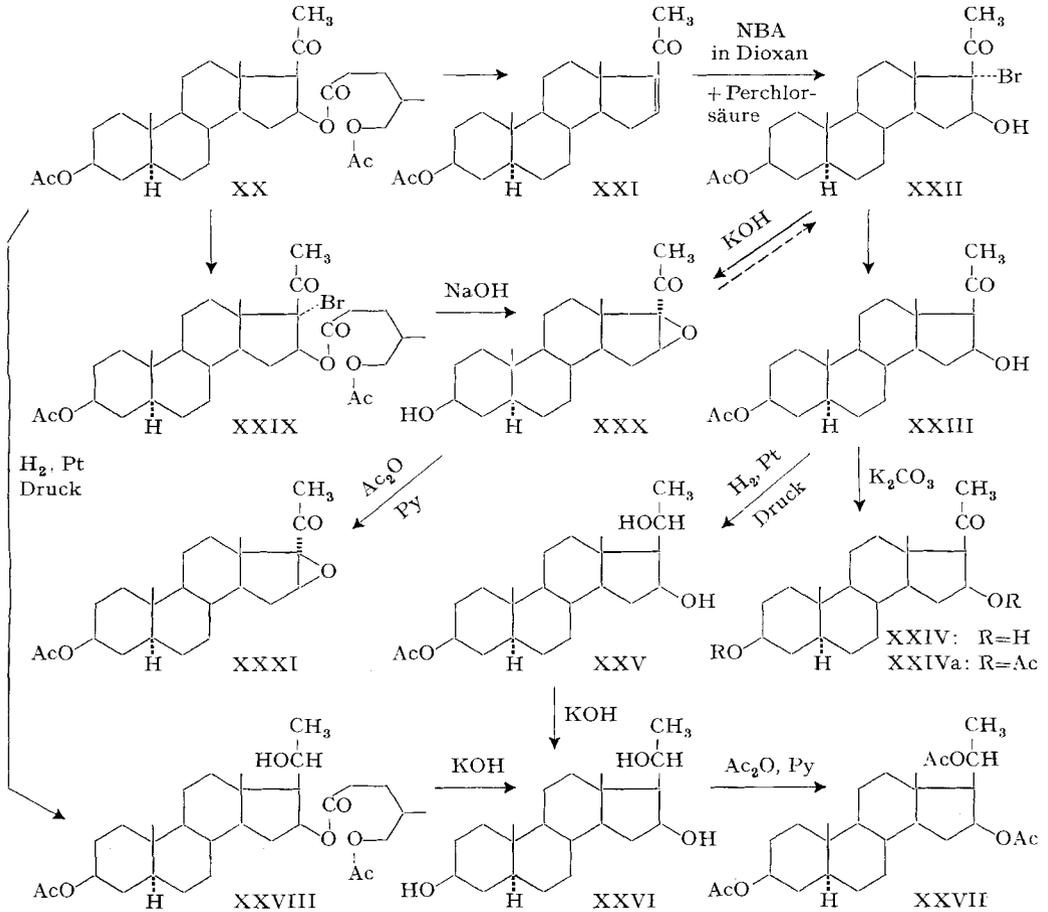
<sup>22)</sup> H. HIRSCHMANN, F. B. HIRSCHMANN & M. A. DAUS, J. biol. Chemistry **178**, 751 (1949).

<sup>23)</sup> G. A. D. HASLEWOOD, G. F. MARRIAN & E. R. SMITH, Biochem. J. **28**, 1316 (1934).

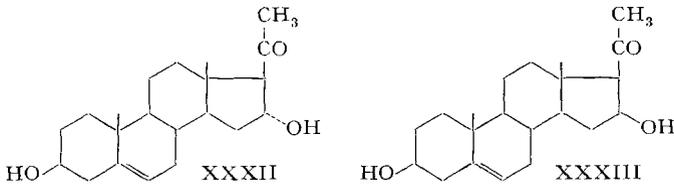
<sup>24)</sup> R. E. MARKER & E. L. WITTE, J. Amer. chem. Soc. **61**, 855 (1939).

<sup>25)</sup> S. BERNSTEIN, M. HELLER & S. M. STOLAR, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5674 (1954).

Dihydroxy-pregnen-20-on-3-acetat<sup>26)</sup> dar. Die papierchromatographischen Eigenschaften von XXXII und XXXIII sind ebenfalls aus Tab. 1 zu entnehmen, wobei wiederum die grosse Ähnlichkeit zwischen dem 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Isomeren auffällt. Allerdings wiesen diese beiden Verbindungen der A<sup>5</sup>-Reihe deutliche Unterschiede im Smp. und IR.-Spektrum auf.



Von den hier beschriebenen 16 $\alpha$ -Hydroxy-Verbindungen zeigte ausser I, XV und XIX nur noch XXXII natriumdiuretische Wirkung. Alle Isomeren mit einer 16 $\beta$ -Hydroxygruppe waren inaktiv<sup>12)</sup>.



<sup>26)</sup> B. LÖKEN, S. KAUFMANN, G. ROSENKRANZ & F. SONDEHEIMER, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1738 (1956).

Soweit genügend Material zur Verfügung stand, sind die molekularen Drehungen der erwähnten Verbindungen bestimmt worden; aus diesen ergaben sich folgende Drehungsbeiträge:

$\Delta M_D$ 16 $\alpha$ -OH bei Verbindungen III, XV und XXXII	- 101° bis - 137°
$\Delta M_D$ 16 $\alpha$ -OAc bei 3 $\beta$ , 16 $\alpha$ -Diacetoxy-allopregnan-20-on <sup>1)</sup>	- 189°
$\Delta M_D$ 16 $\beta$ -OH bei Verbindungen XXIV und XXXIII	- 143°
$\Delta M_D$ 16 $\beta$ -OAc bei Verbindung XXIVa	- 51°

Der geringe Unterschied in den molaren Drehungsbeiträgen dieser 16-Hydroxyverbindungen lässt, im Gegensatz zu entsprechend substituierten Steroiden ohne 20-Ketogruppe<sup>17, 27a)</sup>, keine sichere Entscheidung zwischen 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Substituent zu. Immerhin ist hier wie dort das Acetylierungsincrement negativ für 16 $\alpha$ -hydroxylierte und positiv für 16 $\beta$ -hydroxylierte Verbindungen; ebenfalls negativ wurde es früher für 16 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron<sup>27b)</sup>, für das eine Ketolseitenkette enthaltende 16 $\alpha$ -Hydroxycortexon<sup>27c,d)</sup> aber positiv gefunden. Der bei 3 $\beta$ , 16 $\alpha$ -Diacetoxy-allopregnan-20-on beobachtete molare Drehungsbeitrag der 16 $\alpha$ -Acetoxygruppe entspricht weitgehend den in der Literatur<sup>27a)</sup> angegebenen Werten. Der ebenfalls negative Beitrag der 16 $\beta$ -Acetoxygruppe in XXIVa (- 51°) liegt hingegen in der Mitte zwischen den früheren Angaben für 16 $\alpha$ - und 16 $\beta$ -Acetoxygruppen und stimmt auffallend gut mit dem von MOORE<sup>27a)</sup> bei 3 $\beta$ , 16 $\beta$ -Diacetoxy-ätiansäure-methylester errechneten Wert von  $- 54^\circ \pm 17^\circ$  überein. Bei den beiden genannten 16 $\beta$ -Acetoxy-Verbindungen ist ein starker vicinaler Effekt zu erwarten und eine entsprechende Beeinflussung des molaren Drehungsbeitrages des 16 $\beta$ -Substituenten durch die Keto- bzw. Carbomethoxygruppe an C-17 somit nicht überraschend.

#### Nachweis von 3 $\alpha$ , 16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (I) in Urinproben verschiedener Herkunft

Da der Verbindung I aus Urin von Patienten mit latentem adrenogenitalem Salzverlustsyndrom anscheinend natriumdiuretische Eigenschaften zukommen, untersuchten wir, ob I oder seine Stereoisomeren auch in anderen Harnen nachweisbar seien. Zu diesem Zweck arbeitete man verschiedene Harnproben auf analoge Weise auf und versuchte die entsprechenden Fraktionen chromatographisch bzw. biologisch zu identifizieren. Infolge der Vielfalt ähnlicher Substanzen liegen allerdings noch keine streng spezifischen *Routine*-Bestimmungsmethoden für die einzelnen Verbindungen I, III und XV vor; eine einwandfreie Identifizierung ist vorläufig nur durch ihre Isolierung in reiner Form möglich.

Sind nur sehr kleine Mengen enthalten, so kann man sich ebenfalls des in Schema 1 und 2 gezeigten Verfahrens bedienen, wenn man die letzten beiden Chromatogramme analytisch ausführt, bekannte Mengen der Verbindungen I, III und XV parallel laufen lässt und die Konzentrationen aus den mit Antimontrichlorid resultierenden, blau bis gelb fluoreszierenden Flecken schätzt. Auf diese Art ist eine befriedigende Spezifität gewährleistet, da die sukzessive Verwendung der erwähnten Systeme mit der ausgewählten Zoneneinteilung *und* die Farbreaktion praktisch alle anderen Harn-

<sup>27)</sup> a) J. A. MOORE, *Helv.* **37**, 659 (1954); b) D. PERLMAN, E. TITUS & J. FRIED, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 2126 (1952); c) E. VISCHER, J. SCHMIDLIN & A. WETTSTEIN, *Helv.* **37**, 321 (1954); d) H. HIRSCHMANN, F. B. HIRSCHMANN & L. F. FARRELL, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 4862 (1953).

steroide eliminieren, die sich noch im *ketonischen* Anteil des *enzymatisch* hydrolysierten Neutral-extraktes befinden können. Dies gilt auch für die aus Schwangeren-harn isolierten 3,6-Dihydroxy-pregnan-20-one<sup>28)</sup>, die sich chromatographisch zwar nur schwer von den 3,16-Dihydroxy-pregnan-20-onen abtrennen lassen, jedoch *keine* Fluoreszenzreaktion mit Antimontrichlorid zeigen. Ob sich für eine bessere quantitative Auswertung die Überführung der 3,16-Dihydroxy-pregnan-20-one in Dinitrophenylhydrazone der entsprechenden  $\Delta^{16}$ -20-Ketone<sup>1)</sup> eignet, ist noch genauer zu untersuchen.

Die vorläufigen Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefasst. Der biologische Nachweis erfolgte an Eluaten des 1., 2. oder 3. Chromatogrammes und ist naturgemäss weniger zuverlässig als der chromatographische.

Tabelle 2. *Nachweis von 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (I) und 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (III) in Urinproben verschiedener Herkunft<sup>33)</sup>*

Relative Konzentration pro Liter Harn:

(+) gering, + mittel, ++ gross, – nicht untersucht

	Urin von	Verbindung I		Verbindung III
		chromatographisch	biologisch	chromatographisch
1	Adrenogenitalem Salzverlust-syndrom, kompensiert, 3 Fälle (B. M., B. U., F. R.) . . . . . 1 Fall (C. P.) . . . . .	++ , isoliert +	+ (+)	++ , isoliert –
2	Gesunden Erwachsenen . . . . .	(+), ca. $\frac{1}{10}$ von 1	–	(+), ca. $\frac{1}{10}$ von 1
3	Neugeborenen (s. Text) (Sammelharn) . . . . .	+	+	(+)
4	Schwangeren (1 Fall) . . . . .	(+)	(+)	
5	CUSHING-Syndrom <sup>29)</sup> (1 Fall) . . . . .	(+)	(+)	++
6	Patienten nach Operation . . . . .		(+)	–

<sup>28)</sup> S. LIEBERMAN, D. K. FUKUSHIMA & K. DOBRINER, *J. biol. Chemistry* **182**, 299 (1950); S. LIEBERMAN, K. DOBRINER, B. R. HILL, L. F. FIESER & C. P. RHOADS, *ibid.* **172**, 263 (1948); R. B. MOFFETT & W. M. HOEHN, *J. Amer. chem. Soc.* **69**, 1995 (1947); R. B. MOFFETT, J. E. STAFFORD, J. LINSK & W. M. HOEHN, *ibid.* **68**, 1857 (1946).

<sup>29)</sup> Aus Harn von Patienten mit CUSHING-Syndrom ist vor einiger Zeit  $\Delta^{16}$ -3 $\alpha$ -Hydroxy-pregnen-20-on isoliert worden<sup>30)</sup>; es ist wahrscheinlich, dass diese Verbindung ein Artefakt von I darstellt. Andererseits sind als mögliche Metaboliten von I, III oder XV mehrere isomere 3,16,20-Triole aus Harn verschiedener Herkunft gewonnen worden<sup>31)</sup>. Über anscheinend natriumdiuretische Urinfraktionen von Patienten mit CUSHING-Syndrom vgl. <sup>32)</sup>.

<sup>30)</sup> D. K. FUKUSHIMA, A. D. KEMP, R. SCHNEIDER, M. B. STOKEN & T. F. GALLAGHER, *J. biol. Chemistry* **210**, 129 (1954).

<sup>31)</sup> Siehe Lit. bei a) R. REUBER & J. SCHMIDT-THOMÉ in HOPPE-SEYLER-THERFELDER, *Handb. der physiol. und pathol. chem. Analyse*, 10. Aufl. III/2, S. 1451, Springer 1955; b) S. BERNSTEIN, *Recent Progr. in Hormone Res.* **14**, 1 (1958).

<sup>32)</sup> E. H. VENNING, B. SINGER, A. CABALLEIRA, I. DYRENFURTH, J. C. BECK, C. J. P. GIROUD, CIBA Foundation Coll. *Endocrin.* **8**, 190 (1955); J. S. L. BROWNE, J. C. BECK, I. DYRENFURTH, C. J. P. GIROUD, A. B. HARTHOME, L. G. JOHNSON, K. R. MCKENZIE & E. H. VENNING, *ibid.* **8**, 505 (1955).

<sup>33)</sup> Für die Hilfe bei der Beschaffung verschiedener Urinproben danken wir auch an dieser Stelle den Herren Dr. A. PRADER und Prof. H. WILLI, Zürich, sowie Prof. TH. KOLLER und Prof. R. WENNER, Basel.

Die grösste Konzentration von I und III war nach wie vor im Urin der Patienten mit kompensiertem adrenogenitalem Salzverlust-Syndrom nachweisbar; in 3 von 4 Fällen sind die Verbindungen in kristallisierter Form isoliert worden.

In vergleichbaren Urin-Volumina gesunder Erwachsener wurden I und III zwar auch, aber in deutlich geringerer Menge (ca.  $\frac{1}{10}$ ) gefunden. Werte für 24-Stunden-Ausscheidung liegen noch keine vor.

Im Fall von Neugeborenenharn (1.-5. Tag) trat eine Diskrepanz auf, die vorläufig noch keine sichere Erklärung gefunden hat. Gemäss biologischem Test enthielt dieser Urin einen natriumdiuretischen Faktor mit gleichem Rf-Wert wie I in erster Linie im unhydrolysierten Extrakt An (s. Schema 1), während sich die Hauptmenge von I laut chromatographischer Analyse erst im Extrakt nach enzymatischer Hydrolyse (Bn) befand.

Biologisch und chromatographisch übereinstimmende Resultate erhielten wir beim Nachweis von I in Schwangerenharn und im Urin eines Patienten mit CUSHING-Syndrom. Letzterer Fall war ausserdem durch eine ziemlich hohe Ausscheidung von Verbindung III gekennzeichnet<sup>29)</sup>. Lediglich auf biologischem Wege wurde Verbindung I im Harn postoperativer Patienten nachgewiesen. Weitere Fälle sind noch in Bearbeitung begriffen; von Interesse ist auch eine Abklärung der Frage, ob das natriumdiuretische Prinzip von KLEIN *et al.*<sup>6)</sup> mit  $3\alpha, 16\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (I) identisch ist oder nicht.

Auf die Frage, ob und wie weit die aus Urin bzw. Nebennieren isolierten  $3, 16\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-derivate I, III und XV als Metaboliten von  $16\alpha$ -Hydroxyprogesteron aufzufassen sind, wird in einer späteren Mitteilung eingegangen. Hier ist lediglich noch eine auffallende Parallele im biologischen Effekt (an der Ratte) der  $16\alpha$ -Hydroxylgruppe, einerseits in den hier beschriebenen Nebennieren- und Harn-Methylketonen, andererseits in bestimmten synthetischen Ketolen zu erwähnen. Von letzteren wurde kürzlich berichtet<sup>31b)</sup>, dass die Einführung der  $16\alpha$ -Hydroxylgruppe eine ausgesprochene Verminderung der Natrium-retinierenden Eigenschaften bewirkt.

### Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden auf dem KOFER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-double-beam-Instrument, Mod. 21, aufgenommen.

*Papierchromatographie*: Absteigend auf WHATMAN-Papier Nr. 1; Systeme nach ZAFFARONI<sup>34)</sup> sowie Phenylcellosolve/Heptan (PC/Hp)<sup>35)</sup> bei 22°, solche nach BUSH<sup>36)</sup> und nach EBERLEIN & BONGIOVANNI<sup>37)</sup> [ $E_4$  = Isooctan-Butanol-Methanol-Wasser (50:22,5:22,5:5)] bei 38°, wie in <sup>38)</sup> angegeben. Über die Ausführung der Farbreaktionen vgl. <sup>38)</sup> und die der präparativen Papierchromatographie auf einzelnen Blättern in Metalltrögen oder als Chromatoblock s. <sup>39)</sup>. Als Leitfarbstoff diente besonders  $F_5$ . Konstitution und Wandergeschwindigkeiten dieses und anderer nützlicher Leitfarbstoffe für die Durchlaufchromatographie sind in Tab. 3 und Fig. 7 angegeben.

Die Elution der Substanzen aus den Papierchromatogrammen erfolgte mit 20-proz. Methanol und Methanol nach dem in <sup>40)</sup> angegebenen Modus a.

<sup>34)</sup> A. ZAFFARONI, Recent Progr. in Hormone Res. **8**, 51 (1953).

<sup>35)</sup> R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. **35**, 276 (1952).

<sup>36)</sup> I. E. BUSH, Biochem. J. **50**, 370 (1952).

<sup>37)</sup> W. R. EBERLEIN & A. M. BONGIOVANNI, Arch. Biochemistry Biophys. **59**, 90 (1955).

<sup>38)</sup> R. NEHER, J. Chromatogr. **1**, 205 (1958).

<sup>39)</sup> E. VON ARX & R. NEHER, Helv. **39**, 1664 (1956).

<sup>40)</sup> R. NEHER & A. WETTSTEIN, J. clin. Investig. **35**, 800 (1956).

Tabelle 3. Leitfarbstoffe für die Papierchromatographie in ZAFFARONI- und BUSH-Systemen

F<sub>5</sub> rot = 4-Nitro-2'-methyl-4'-diäthanolamino-azobenzol.  
 F<sub>9</sub> violett = 1,4-Diamino-anthrachinon.  
 F<sub>11</sub> blau = 1-Methylamino-4-amino-anthrachinon.  
 F<sub>13</sub> blau, aus 2 Komponenten bestehend: a = 1-Amino-4-phenylamino-anthrachinon.  
 b = 1-Methylamino-4-phenylamino-anthrachinon.  
 F<sub>14</sub> blau = 1,4,5,8-Tetraamino-anthrachinon.  
 F<sub>63</sub> rot = 1-(2'-Methoxy-phenylazo)-2-naphтол.

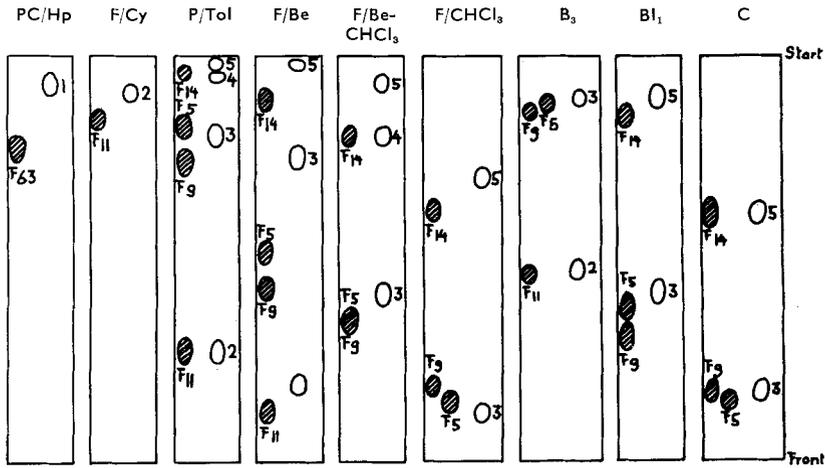


Fig. 7. Papierchromatographisches Verhalten der in Tab. 3 erwähnten Leitfarbstoffe im Vergleich zu einigen Steroiden

Wandergeschwindigkeit von F<sub>13</sub> vgl. Fig. 4 in 1)

PC = Phenylcellösolve	Tol = Toluol	1 = Progesteron
F = Formamid	B <sub>3</sub> = BUSH B <sub>3</sub>	2 = Cortexon (DOC)
P = Propylenglykol	C = BUSH C	3 = Corticosteron
Hp = Heptan	Bl <sub>1</sub> = Petroläther-Benzol-	4 = Cortison
Cy = Cyclohexan	Methanol-H <sub>2</sub> O	5 = Cortisol
Be = Benzol	(3:7:5:5)	

*Enzymatische Hydrolyse:* Der vorextrahierte Harn oder die vorextrahierte wässrige Lösung des Harnrohextraktes (s. Schema 1) wurde auf pH 4,6 gestellt und auf 1000 ml davon mit 50 ml m. Acetatpuffer (n. Essigsäure / n. Natriumacetat 1:1) und 500000 Einheiten β-Glucuronidase aus dem Magensaft von *Helix pomatia*<sup>41)</sup> 6 Std. bei 38° inkubiert. Nach dieser Zeit wurde nochmals die gleiche Menge des Enzyms zugesetzt und zusätzlich 12–14 Std. einwirken gelassen, worauf man wie üblich mit Chloroform extrahierte (vgl. Schema 1).

Girardierungen<sup>9)</sup> und Fällungen mit Digitonin<sup>42)</sup> wurden wie üblich ausgeführt.

3α,16α-Dihydroxy-pregnan-20-on (I). – a) *Isolierung:* aus Urin nach Schema 2. Aus dem Eluat b<sub>4</sub> kristallisierte I in Nadeln aus Aceton-Pentan mit dem Smp. 209–212°.

b) *Partialsynthese:* 230 mg Δ<sup>16</sup>-3α-Acetoxy-pregnen-20-on<sup>14)</sup> (VI), hergestellt durch HBr-Abspaltung aus der 17α-Bromverbindung V mit Hilfe von LiCl in Pyridin<sup>43)</sup>, wurden in 20 ml Methanol gelöst. Die Lösung versetzte man mit 2 ml 30-proz. Wasserstoffperoxyd und mit 2 ml

<sup>41)</sup> Präparat der INDUSTRIE BIOLOGIQUE FRANÇAISE S.A., Gennevilliers (Seine), Quai du Moulin de Cage 35–49. Es enthält pro ml 100000 E. β-Glucuronidase (pH-Optimum 4,5) und ca. 50000 E. Sulfatase (pH-Optimum 5,1).

<sup>42)</sup> S. LIEBERMAN, E. R. KATZENELLENBOGEN, R. SCHNEIDER, P. E. STUDER & K. DOBRINER, J. biol. Chemistry **205**, 87 (1953).

<sup>43)</sup> R. P. HOLYSZ, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4432 (1953).

5-proz. Natriumhydroxyd in Wasser und liess sie 16 Std. bei 20° stehen<sup>44</sup>). Das Gemisch wurde mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert. Die ätherischen Lösungen wusch man mit Wasser, trocknete und dampfte sie ein. Der Rückstand wurde aus Äther-Pentan-Gemisch umkristallisiert und gab Nadeln des *3 $\alpha$ -Hydroxy-16,17 $\alpha$ -epoxy-pregnan-20-ons (VII)* vom Smp. 200–203°.

$C_{21}H_{32}O_3$  (332,47) Ber. C 75,86 H 9,70% Gef. C 76,05 H 10,14%

80 mg des Epoxyds VII wurden analog zu dem entsprechenden Allopregnan-Derivat<sup>1</sup>) mit Hilfe von Chrom(II)-acetat reduziert. Das erhaltene Reaktionsprodukt (70 mg) wurde aus Äther-Pentan-Gemisch umkristallisiert und gab 10 mg reines *3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (I)* vom Smp. 211–213°.

$C_{21}H_{34}O_3$  (334,48) Ber. C 75,40 H 10,25% Gef. C 75,15 H 9,99%

*3 $\alpha$ -Acetoxy-16 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -brom-pregnan-20-on (VIII)*: 300 mg  $\Delta^{16}$ -*3 $\alpha$ -Acetoxy-pregnan-20-on (VI)* wurden in 10 ml Dioxan gelöst. Die Lösung versetzte man mit 1 ml Wasser, 0,05 ml 70-proz. Perchlorsäure und 500 mg N-Bromacetamid, liess sie 1 Std. bei 20° stehen, verdünnte sie dann mit Wasser und etwas Natriumhydrogensulfid-Lösung und extrahierte mit Äther. Die ätherischen Lösungen wurden mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der amorphe Rückstand wurde an 9 g Aluminiumoxyd (Aktivität III) chromatographiert. Die im Vakuum eingedampften Benzol-Fractionen gaben 260 mg Rückstand, aus welchem 100 mg des kristallisierten Bromids VIII vom Smp. 160–168° (u. Zers.) erhalten wurden.

*3 $\alpha$ -Acetoxy-16 $\beta$ -hydroxy-pregnan-20-on (IX)*: 100 mg Bromid VIII wurden in 10 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 100 mg Ammoniumacetat und 50 mg 5-proz. Pd/CaCO<sub>3</sub>-Katalysator hydriert. Die Wasserstoff-Aufnahme hörte nach 30 Min. auf, wonach die filtrierte Lösung im Vakuum eingengt wurde. Den Rückstand extrahierte man mit Äther, wusch die ätherischen Lösungen mit Wasser, trocknete und dampfte sie ein. Aus dem Rückstand liessen sich 20 mg des Monoacetats IX vom Smp. 157–167° durch Umkristallisieren aus Äther-Pentan-Gemisch gewinnen.

*3 $\alpha$ ,16 $\beta$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (X)*: 20 mg IX löste man in 6 ml Methanol, setzte eine Lösung von 30 mg Kaliumcarbonat in 1,5 ml Wasser zu und liess 15 Std. bei 20° stehen. Hierauf wurde mit Wasser verdünnt und im Vakuum eingengt. Den Rückstand extrahierte man mit Essigester, wusch die Essigester-Lösungen mit Wasser, trocknete und dampfte sie im Vakuum ein. Die zurückgebliebene Dihydroxy-Verbindung X wurde aus Äther-Hexan-Gemisch umkristallisiert und gab 4 mg Nadeln, die langsam ab ca. 180° sublimierten und bei 208–212° schmolzen. Bei der Papierchromatographie (Tab. 1) und im IR.-Spektrum liess sich X von dem 16 $\alpha$ -Isomeren I (Fig. 2) nicht eindeutig unterscheiden, hingegen zeigte das Gemisch beider eine Smp.-Depression. Im Gegensatz zu I war X biologisch inaktiv.

*3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (III)*. – a) *Isolierung aus Urin*. Entsprechend dem Schema 2 befand sich III in Zone c<sub>2</sub>. Das Eluat wurde in acetonischer Lösung über wenig Kohle filtriert und der farblose Rückstand aus Aceton-Pentan kristallisiert. Nach Waschen mit Äther schmolzen die Kristallnadeln bei 209–211°. Keine Depression im Misch-Smp. mit der unter c) beschriebenen niedrig schmelzenden Modifikation.

b) *Isolierung aus Schweine-Nebennieren*, s. theoret. Teil. Aus Aceton-Äther erhielt man dicke, kurze Prismen, die ab ca. 190° in Blättchen oder Tröpfchen sublimierten und bei 227–229° schmolzen. Keine Depression im Misch-Smp. mit der unter c) beschriebenen höher schmelzenden Modifikation.  $[\alpha]_D^{28} = + 59,9 \pm 1,3^\circ$  (c = 0,77; CH<sub>3</sub>OH-CHCl<sub>3</sub> 1:1); M<sub>D</sub> = + 200°.

$C_{21}H_{34}O_3$  (334,48) Ber. C 75,40 H 10,25% Gef. C 75,50 H 10,56%

$\lambda_{max}$  285  $\mu$  ( $\epsilon = 48$ ). – Ihr in KBr aufgenommenes IR.-Spektrum (Fig. 5b) ist im Fingerringgebiet und besonders zwischen 9 und 10  $\mu$  deutlich verschieden von demjenigen der niedrig schmelzenden Form (Fig. 5a); letzteres liess typische Banden für ein *3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -steroid* erkennen, ersteres aber nicht. Die identischen Spektren beider Formen in CHCl<sub>3</sub> entsprachen einem *3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -steroid*.

III war mit Digitonin nicht fällbar; es bildete mit GIRARD-Reagens T nur in Gegenwart von Essigsäure ein Hydrazon, das sich in n. salzsaurer Lösung leicht wieder spalten liess unter Regeneration von III. Die Acetylierung führte zu einem amorphen Diacetat XIII, das in Phenyl-

<sup>44</sup>) Vgl. hierzu P. L. JULIAN, E. W. MEYER, W. J. KARPEL & F. R. WALLER, J. Amer. chem. Soc. 72, 5145 (1950).

cellosolve/Heptan praktisch gleich schnell wanderte wie das Diacetat von XV und nur sehr langsam kristallisierte. Es liess sich mit  $K_2CO_3$  in wässrigem Methanol bedeutend schlechter versetzen als das Diacetat von XV, aber ähnlich wie jenes von XIX, und lieferte u. a. das sehr schwach polare, bei 240  $m\mu$  absorbierende Produkt XI (vgl. <sup>1)</sup>).

c) *Partialsynthese*: 260 mg  $\Delta^{16}$ -3 $\alpha$ -Acetoxy-allopregnen-20-on<sup>16)</sup> wurden in 20 ml Methanol gelöst. Die Lösung versetzte man mit 2 ml 30-proz. Wasserstoffsuperoxyd und einer Lösung von 200 mg Natriumhydroxyd in 3 ml Wasser und liess sie 20 Std. bei 20° stehen. Die mit Wasser versetzte Lösung engte man im Vakuum ein; der Rückstand wurde in Äther aufgenommen. Die ätherischen Lösungen wusch man mit Wasser, trocknete und dampfte sie im Vakuum ein, wobei 250 mg rohes 3 $\alpha$ -Hydroxy-16,17 $\alpha$ -epoxy-allopregnan-20-on (XII) erhalten wurden. Man versetzte ein Gemisch von 60 ml Eisessig, 12 ml 10-n. Natriumhydroxyd und 15 ml Dimethylformamid bei 0° mit 18 ml einer salzsauren Lösung von 18 mMol Chrom(II)-chlorid<sup>45)</sup> und gab zu dieser Lösung die erhaltenen 260 mg des rohen Epoxyds XII in wenig Chloroform gelöst zu. Das Ganze wurde kurz evakuiert und im geschlossenen Gefäss 12 Std. geschüttelt. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit Essigester versetzt. Die Essigesterlösungen wusch man mit verd. Salzsäure, Wasser, verd. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete und dampfte sie im Vakuum ein. Der Rückstand wurde an 8 g Aluminiumoxyd (Aktivität III) chromatographiert. Die Säule wurde nacheinander mit Benzol, Äther und Essigester eluiert. Die eingedampften Essigesterlösungen gaben 40 mg Rückstand, aus welchem durch Umkristallisieren aus Aceton-Pentan 3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (III) vom Smp. 209–211° erhalten wurde. Kristallisierte man letzteres aus Aceton allein oder Aceton-Isopropyläther-Gemisch, erhielt man meistens die Modifikation mit dem Smp. 224–228°. Die Substanz sublimierte zum Teil ab ca. 180°. Für die Analyse wurde sie bei 130° im Hochvakuum getrocknet, enthielt aber immer noch etwas Kristall-Lösungsmittel.



16 $\alpha$ -Hydroxy-allopregnan-3,20-dion (XVI)<sup>1)</sup>: Oxydation von 1 mg III in Pyridin mit 4 mg  $CrO_3$  wie für die Oxydation von SEF beschrieben<sup>1)</sup>; Smp. 223–225°, keine Smp.-Depression im Gemisch mit authentischem XVI, identische IR.-Spektren in KBr und  $CH_2Cl_2$ , identisches papierchromatographisches Verhalten.

Allopregnan-3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,20 $\beta$ -triol (XIV)<sup>17)</sup>. – a) 10 mg synthetisches III wurden in 15 ml Eisessig mit 10 mg  $PtO_2$  unter 45 at Druck bei 20° 4 Std. hydriert. Nach Filtrieren und Eindampfen der Lösung kristallisierte das Triol XIV aus Methanol-Aceton in feinen Nadeln mit dem Smp. 234–235°.

b) Aus 15 mg III vom Smp. 227–229°, aus Nebennieren, wie unter a) angegeben; Smp. 234–235°, keine Smp.-Depression im Gemisch.

3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-20-on (XIX): 2 g Pseudosarsapogenin in 10 ml Pyridin liess man 16 Std. bei 20° mit 10 ml Acetanhydrid stehen, rührte das Gemisch mit 70 ml Wasser eine halbe Std. und extrahierte dreimal mit 100 ml Äther. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser, 2-n. HCl, 2-n. Sodalösung und Wasser wurde der Äther abdestilliert und der Rückstand (2,3 g rohes Di-O-acetylpsudosarsapogenin XVII) in je 12,6 ml Äthylenchlorid und 90-proz. Essigsäure mit einer Lösung von 1,1 g  $CrO_3$  in 12,6 ml 80-proz. Essigsäure innerhalb 30 Min. bei 5–8° oxydiert. Das Gemisch goss man in 105 ml Wasser und 2,6 ml  $NaHSO_3$ -Lösung, extrahierte viermal mit je 100 ml Äther und wusch die Äther-Lösung mit je 40 ml Wasser, 2-n. HCl, 2-n. Soda und Wasser. Nach Abdestillieren des Äthers wurde der Rückstand in 10,5 ml Eisessig 2 Std. unter Rückfluss gekocht und die halbe Menge davon nach Eindampfen in 50 ml Methanol gelöst, bei 8° mit 2,6 ml 30-proz.  $H_2O_2$  und 2,6 ml 4-n. NaOH versetzt und 15 Std. bei 20° stehengelassen. Das durch Extraktion der auf 10 ml eingeeengten und mit Wasser verdünnten Lösung mit Äther-Aceton (9:1) erhaltene Produkt (629 mg) stellte rohes 3 $\beta$ -Hydroxy-pregnan-20-on-16,17 $\alpha$ -epoxyd<sup>46)</sup> dar. Zu 60 ml Eisessig gab man zuerst 13,8 ml 10-n. NaOH, dann bei 20° 20 ml einer salzsauren Lösung von 20 mMol  $CrCl_2$ <sup>45)</sup> und schliesslich das oben erhaltene Epoxyd und schüttelte 12 Std. bei 20° im Vakuum. Nach üblicher Aufarbeitung (vgl. bei Verbindung III und in <sup>1)</sup>)

<sup>45)</sup> J. B. CONANT & H. B. CUTTER, J. Amer. chem. Soc. **48**, 1016 (1926); H. HIRSCHMANN & F. B. HIRSCHMANN, J. biol. Chemistry **184**, 259 (1950).

<sup>46)</sup> H. E. KENNY, E. A. WEAVER & M. E. WALL, J. Amer. chem. Soc. **80**, 5568 (1958).

erhielten wir einen ätherlöslichen Rückstand, aus dem sich nach Behandlung mit wenig Kohle Verbindung XIX mit Aceton-Pentan in dünnen, unregelmässigen Blättchen kristallisieren liess, welche aber noch verunreinigt waren. Ein Chromatogramm an 20 g Silicagel (mit 15% Wassergehalt) lieferte die Hauptmenge von XIX durch Elution mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Aceton 8:2; sie erwies sich aber immer noch als etwas verunreinigt, so dass sie in einem Chromatoblock zu 110 Blatt im System Formamid/Benzol- $\text{CHCl}_3$  (1:1) rechromatographiert wurde. Das Eluat der mittleren Zone lieferte nach Filtrieren über Kohle aus Aceton-Pentan reines XIX in dünnen Prismen, Smp. 198–199° (seltener, zweite Modifikation Smp. 212–215°).  $[\alpha]_{\text{D}}^{26,5} = +53^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,393$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$  1:1).

$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$  (334,48) Ber. C 75,40 H 10,25% Gef. C 75,13 H 10,03%

*3 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (XXIV)*: 1 g  $\Delta^{16}$ -3 $\beta$ -Acetoxy-allopregnen-20-on<sup>47)</sup> (XXI) wurde in 20 ml Dioxan gelöst. Die Lösung versetzte man mit 2 ml Wasser, 0,1 ml Perchlorsäure und 1 g N-Bromacetamid, liess 1 Std. bei 20° stehen, fügte Wasser und etwas Natriumhydrogensulfid-Lösung zu und engte im Vakuum ein. Den Rückstand extrahierte man mit Äther, wusch die ätherischen Lösungen mit Wasser, trocknete und dampfte sie ein. Der Rückstand kristallisierte aus Isopropyläther und gab 620 mg *3 $\beta$ -Acetoxy-16 $\beta$ -hydroxy-17 $\alpha$ -brom-allopregnan-20-on (XXII)* vom Smp. 180–185° (u. Zers.). 1 g des Bromids XXII wurde, wie bei der Herstellung von IX beschrieben, hydriert. Nach Aufarbeitung des Reaktions-Gemisches erhielt man, aus Äther-Pentan-Gemisch umkristallisiert, 300 mg *3 $\beta$ -Acetoxy-16 $\beta$ -hydroxy-allopregnan-20-on (XXIII)*. Es schmolz bei 161°, kristallisierte wieder und schmolz definitiv bei 173°. Eine Lösung von 80 mg XXIII in 50 ml Methanol versetzte man mit 100 mg Kaliumhydrogencarbonat, gelöst in 5 ml Wasser, und kochte sie 1 Std. unter Rückfluss. Die mit Wasser versetzte Lösung wurde im Vakuum eingengt und mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterlösungen wusch man mit Wasser, trocknete und dampfte sie im Vakuum ein. Den Rückstand (70 mg) löste man in 50 ml Aceton und engte die Lösung ein, wobei 55 mg *3 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (XXIV)* vom Smp. 255–258° (u. Zers.) auskristallisierten.  $[\alpha]_{\text{D}}^{27,4} = +51,3^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 0,95$ ;  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$  1:1);  $M_{\text{D}} = +172^\circ$ .

$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$  (334,48) Ber. C 75,40 H 10,25% Gef. C 75,44 H 10,43%

Durch Acetylierung von XXIII erhielt man das *3 $\beta$ ,16 $\beta$ -Diacetoxy-allopregnan-20-on (XXIVa)* vom Smp. 174° (Äther-Pentan).  $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = +53,0^\circ \pm 2,8^\circ$  ( $c = 0,55$ ;  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$  1:1);  $M_{\text{D}} = +222^\circ$ .

*3 $\beta$ -Acetoxy-16,17 $\beta$ -epoxy-17-iso-allopregnan-20-on (XXXI)*. – a) *Aus XXII*: 1 g Bromid XXII wurde in 20 ml Äthanol und 5 ml Wasser gelöst. Die Lösung kochte man mit 500 mg Kaliumhydroxyd 1 Std. unter Rückfluss, versetzte sie mit Wasser, engte im Vakuum ein und extrahierte den Rückstand mit Äther. Die ätherischen Lösungen wurden mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Den Rückstand (Epoxyd XXX) löste man in 1 ml Pyridin und 2 ml Acetanhydrid und erwärmte die Lösung 1 Std. auf 100°. Nach Einengen der mit Wasser versetzten Lösung im Vakuum extrahierte man den Rückstand mit Äther, wusch die ätherischen Lösungen mit verd. Salzsäure, Wasser, verd. Soda-Lösung und Wasser, trocknete und dampfte sie ein. Das zurückbleibende *3 $\beta$ -Acetoxy-16,17 $\beta$ -epoxy-17-iso-allopregnan-20-on (XXXI)* gab aus Methanol Nadeln vom Smp. 159–161°.

$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4$  (374,50) Ber. C 73,76 H 9,15% Gef. C 73,68 H 9,18%

b) *Aus XX über XXIX*: 1 g XX wurde in 20 ml Eisessig bei 20° gelöst. Die Lösung versetzte man langsam mit einer Lösung von 0,105 ml Brom in 10 ml Eisessig, wobei bald Entfärbung eintrat. Die Lösung wurde nach Wasserzusatz bei 30° im Vakuum eingengt. Den Rückstand schüttelte man mit Äther aus, wusch die ätherischen Lösungen mit Wasser, trocknete und dampfte sie im Vakuum ein. Das zurückbleibende amorphe Bromid XXIX wurde in 50 ml Methanol gelöst. Man versetzte die Lösung mit 2 g Kaliumhydroxyd und 5 ml Wasser, kochte sie 1 Std. unter Rückfluss und engte sie im Vakuum ein. Der Rückstand wurde mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherischen Lösungen wusch man mit Wasser, trocknete und dampfte sie im Vakuum ein. Die Chromatographie des Rückstandes (570 mg) an 15 g Aluminiumoxyd lieferte 300 mg Benzol-Pentan-(3:1)-Fraktionen, die aus Äther-Pentan-Gemisch 200 mg Kristalle des

<sup>47)</sup> R. E. MARKER, H. M. CROOKS, JR., R. B. WAGNER & E. L. WITTBECKER, J. Amer. chem. Soc. **64**, 2089 (1942).

*Epoxyds XXX* gaben. Sie schmolzen bei 90°, kristallisierten dann wieder und schmolzen definitiv bis 124°. Zur Charakterisierung wurde XXX wie oben beschrieben acetyliert. Das aus Methanol umkristallisierte 3 $\beta$ -Acetoxy-16,17 $\beta$ -epoxy-17-iso-allopregnan-20-on (XXXI) war völlig identisch mit dem nach a) erhaltenen Acetat.

*Überführung von XXIII in das bekannte 3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20 $\beta$ -Triacetoxo-allopregnan (XXVII)<sup>22</sup> über das Triol-monoacetat XXV und das Triol XXVI:* Eine Lösung von 100 mg XXIII in 50 ml Eisessig hydrierte man 5 Std. bei 25° und 45–50 at in Gegenwart von 50 mg Platin. Die filtrierte Lösung dampfte man im Vakuum ein. Der mit Aceton und Äther gewaschene Rückstand schmolz bei 238–245° (schwitze vorher). Das so gewonnene, noch nicht reine Monoacetat XXV wurde in einem Wasser-Methanol-Gemisch gelöst und mit 100 mg Kaliumhydroxyd versetzt. Man kochte die Lösung 1 Std. unter Rückfluss, engte sie im Vakuum ein und versetzte sie mit etwas Wasser. Die Kristalle wurden abgesaugt, mit Wasser-Methanol-Gemisch gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert. Das so gewonnene 3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,20 $\beta$ -Trihydroxy-allopregnan (XXVI) schmolz bei 260–280°. Um ein reines Derivat zu erhalten, wurden das kristallisierte Triol sowie die eingedampften Mutterlaugen davon in einem Gemisch von 0,3 ml Pyridin und 0,6 ml Acetanhydrid 1 Std. bei 100° acetyliert. Die Lösung wurde nach Wasserzusatz im Vakuum eingeeengt. Den Rückstand schüttelte man mit Äther aus, wusch die ätherischen Lösungen mit verd. Salzsäure, Wasser, verd. Sodalösung und Wasser, trocknete und dampfte sie ein. Der Rückstand kristallisierte aus Pentan und gab 16,5 mg des reinen Triacetats XXVII vom Smp. 161–163°. Im Gemisch mit dem aus XX erhaltenen Triacetat (siehe unten) gab es keine Smp.-Depression, wohl aber eine solche im Gemisch mit dem 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Triacetoxo-allopregnan<sup>22</sup>).

*Überführung von XX in das bekannte XXVII<sup>22</sup> über XXVIII und XXVI:* 100 mg 3 $\beta$ -Acetoxy-16 $\beta$ -( $\delta$ -acetoxy-isocaproxyloxy)-allopregnan-20-on (XX) wurden analog zu XXIII unter Druck in Eisessig mit Platin hydriert. Nach Aufarbeitung wurde das rohe 3 $\beta$ -Acetoxy-16 $\beta$ -( $\delta$ -acetoxy-isocaproxyloxy)-20 $\beta$ -hydroxy-allopregnan (XXVIII), ähnlich wie XXV, mit Kaliumhydroxyd hydrolysiert und das so erhaltene rohe Triol XXVI wie schon angegeben acetyliert. Das Triacetat XXVII wurde an Aluminiumoxyd (Aktivität III) gereinigt. Die Pentan- und Benzol-Pentan-(1:1)-Fraktionen gaben aus Pentan Kristalle vom Smp. 161–163°. Diese waren identisch mit dem oben erhaltenen Triacetat XXVII.

*$\Delta^5$ -3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnen-20-on (XXXII)<sup>25</sup>:*  $[\alpha]_D^{27} = -9,7^\circ \pm 0,9^\circ$  ( $c = 1,04$ ; CH<sub>3</sub>OH-CHCl<sub>3</sub> 1:1);  $M_D = -32^\circ$ .

*$\Delta^5$ -3 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dihydroxy-pregnen-20-on (XXXIII):* 230 mg  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-16 $\beta$ -hydroxy-pregnen-20-on<sup>26</sup>) wurden in 60 ml Methanol gelöst. Die Lösung versetzte man mit 15 ml 0,075-n. Kaliumhydrogencarbonat und liess 15 Std. bei 20° stehen. Nach Versetzen mit Wasser engte man das Gemisch im Vakuum bei 20° ein und nahm den Rückstand mit Essigester auf. Die Essigesterlösungen wurden mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Den Rückstand (220 mg) kristallisierte man einige Male aus Aceton-Äther- oder Aceton-Isopropyläther-Gemisch um, wobei 40 mg des  $\Delta^5$ -3 $\beta$ ,16 $\beta$ -Dihydroxy-pregnen-20-ons (XXXIII) in Form von Nadeln mit dem Smp. 220–236° (u. Zers.) erhalten wurden. Aus den Mutterlaugen kristallisierten noch 23 mg der gleichen Verbindung vom Smp. 210–220° (u. Zers.).  $[\alpha]_D^{27} = -13,8^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,01$ ; CH<sub>3</sub>OH-CHCl<sub>3</sub> 1:1);  $M_D = -46^\circ$ .

C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub> (332,47) Ber. C 75,86 H 9,70% Gef. C 75,60 H 9,45%

*Charakterisierung von Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol<sup>14</sup>)* aus Harn: Smp. 254–256°, keine Smp.-Depression im Gemisch mit authentischem Material<sup>48</sup>), identisch damit nach IR.-Spektrum in KBr, nach UV.-Absorption in konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $\lambda_{\max}$  300:  $\epsilon = 3800$ ;  $\lambda_{\max}$  432:  $\epsilon = 22400$ ) und nach Papierchromatographie.

*3 $\alpha$ -Hydroxy-allopregnan-20-on:*  $[\alpha]_D^{28} = +105^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 0,95$ ; CH<sub>3</sub>OH-CHCl<sub>3</sub> 1:1);  $M_D = +337^\circ$ .

*3 $\beta$ -Acetoxy-allopregnan-20-on:*  $[\alpha]_D^{28} = +75,7^\circ \pm 0,8^\circ$  ( $c = 1,12$ ; CH<sub>3</sub>OH-CHCl<sub>3</sub> 1:1);  $M_D = +273^\circ$ .

Die Mikroanalysen verdanken wir Herrn Dr. H. GYSEL, die Aufnahmen der IR.-Spektren Herrn Dr. E. GANZ. Für Hilfe bei der Papierchromatographie sind wir Herrn E. VON ARX dankbar.

<sup>48</sup>) Für die freundliche Überlassung einer Probe von Pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triol sind wir Herrn Dr. M. FINKELSTEIN zu Dank verpflichtet.

## SUMMARY

Some new compounds, including  $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy-pregnan-20-one (I) and  $3\alpha,16\alpha$ -dihydroxy-allopregnan-20-one (III), have been isolated from urine of patients with clinically compensated adrenogenital salt-losing syndrome. Compound I seems to be responsible for the original salt loss. This effect could be demonstrated under certain conditions in male adrenalectomized rats. Compound III was also isolated from hog adrenals. The synthesis of these steroids and of a few others, stereoisomeric in positions 3, 5 and 16, and of a 5,6-dehydro analog is described. There is some preliminary evidence for the presence of compound I and III in urines of origin other than patients with adrenogenital syndrome.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung

## 11. Die enzymatische Dehydrirung der Stearinsäure zu Ölsäure<sup>1)</sup>

von **Karl Bernhard, J. von Bülow-Köster** und **H. Wagner**

(1. XII. 58)

Wir zeigten kürzlich<sup>2)</sup>, dass Linolsäure und  $\gamma$ -Linolensäure im Tierkörper nicht zu gesättigten Säuren hydriert werden und entgegen der allgemeinen Annahme auch die Ölsäure nicht in Stearin- bzw. Palmitinsäure, Stearinsäure aber in Bestätigung der Befunde von SCHÖNHEIMER & RITTENBERG<sup>3)</sup> in Ölsäure übergeht. Nach Fütterung <sup>14</sup>C-signierter Stearinsäure an Ratten betrug der Anteil der Ölsäure an der Gesamtaktivität der Leberfettsäuren z. B. 27,5%.

Der Nachweis eines die Stearinsäure in Stellung 9,10 dehydrierenden Enzymes wurde von verschiedenen Autoren versucht<sup>4)</sup>. LANG & ADICKES<sup>5)</sup> fügten Leber- bzw. Muskelextrakten Kaliumstearat zu und schlossen aus dem Nachweis von Azelainsäurealdehyd, nach erfolgter Oxydation des Reaktionsgemisches, auf eine Bildung von Ölsäure. Analoge Extrakte entfärbten in Gegenwart anderer Fettsäuren (Palmitin-, Laurin-, Undecyl-, Caprylsäure usw.) Methylenblau bedeutend rascher als Kontrollen ohne Fettsäurezugabe<sup>6)</sup>.

LE BRETON und Mitarbeiter versuchten in der Folge zu stärker wirksamen Dehydrase-Präparaten aus Leber zu gelangen und beobachteten sehr kurze Entfärbungszeiten des Methylenblaus, wenn Nicotinsäureamid, Pyridoxin oder Pantothenensäure zugefügt wurden<sup>7)</sup>. Diese Ergebnisse wurden mit dem Bodensatz erzielt, während das Überstehende verworfen wurde. Wir stellten fest, dass solche Fermentextrakte,

<sup>1)</sup> Vorgetragen am IV. Internat. Kongress für Biochemie, Wien 1958.

<sup>2)</sup> K. BERNHARD, M. ROTHLIN & H. WAGNER, *Helv.* **41**, 1155 (1958).

<sup>3)</sup> R. SCHÖNHEIMER & D. RITTENBERG, *J. biol. Chemistry* **113**, 505 (1936).

<sup>4)</sup> B. SHAPIRO & E. WERTHEIMER, *Biochem. J.* **37**, 102 (1943); K. LANG, *Z. physiol. Chem.* **261**, 241 (1939).

<sup>5)</sup> K. LANG & F. ADICKES, *Z. physiol. Chem.* **262**, 123 (1939/40).

<sup>6)</sup> K. LANG & H. MAYER, *Z. physiol. Chem.* **261**, 249 (1939).

<sup>7)</sup> J. CHAMPOUGNY & E. LE BRETON, *Compt. rend. Soc. biol.* **139**, 919 (1945).