

103. Über Umwandlungen von Progesteron und 16 α -Hydroxyprogesteron durch Enzyme tierischer Gewebe¹⁾

Über Steroide, 157. Mitteilung²⁾

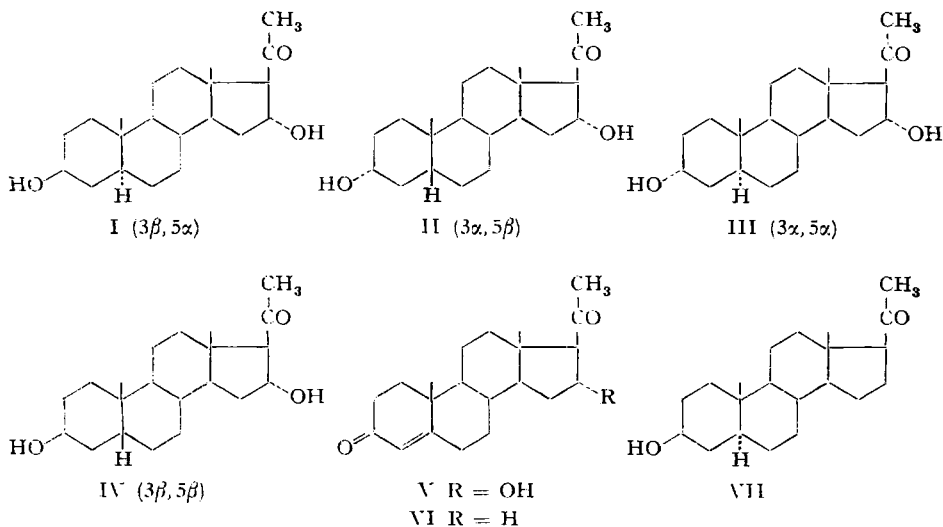
von A. WETTSTEIN, R. NEHER und H. J. URECH

Herrn Prof. Dr. P. KARRER zum 70. Geburtstag gewidmet

(14. III. 59)

Kürzlich wurde über die Isolierung von 3 β ,16 α -Dihydroxy-allopregnan-20-on (I)³⁾ aus Schweine- und Rinder-Nebennieren berichtet. Aus Harn von Patienten mit klinisch kompensiertem, adrenogenitalem Salzverlust-Syndrom konnten zwei weitere 16 α -Hydroxysteroiden, nämlich das 3 α ,16 α -Dihydroxy-pregnan-20-on (II) und das 3 α ,16 α -Dihydroxy-allopregnan-20-on (III), isoliert werden²⁾. Verbindung III liess sich ferner aus Schweine-Nebennieren gewinnen. Die Verbindungen I–III sind auch synthetisch bereitete worden, ebenso das vierte in 3,5-Stellung Stereoisomere, die Substanz IV, welche weder im Harn noch in Nebennieren aufzufinden war²⁾.

Verbindung I, die wir SEF (= Sodium Excreting Factor) nannten, und in geringerem Masse auch die Verbindung II, bewirkten nach DESAULLES³⁾ unter bestimmten biologischen Bedingungen an der nebennierenlosen Ratte eine erhöhte oder beschleunigte Natrium-Ausscheidung.



¹⁾ Auszugsweise vorgetragen von A. WETTSTEIN am IV. Internat. Kongress für Biochemie in Wien, 5. September 1958.

²⁾ 156. Mitteilung: R. NEHER, CH. MEYSTRE & A. WETTSTEIN, *Helv.* **42**, 132 (1959).

³⁾ R. NEHER, P. DESAULLES, E. VISCHER, P. WIELAND & A. WETTSTEIN, *Helv.* **41**, 1667 (1958).

In der vorliegenden Arbeit werden nun Versuche zur Abklärung der Genese der 16 α -Hydroxysterioide I–III mitgeteilt. In Analogie zu den bekannten Metaboliten der genuinen Nebennierenrinden-Hormone könnte man sie als Tetrahydro- bzw. Allostetrahydro-Derivate des entsprechenden Δ^4 -3-Ketosteroids, des 16 α -Hydroxyprogesterons (V) auffassen. Diese Grundsubstanz V war allerdings unseres Wissens bisher noch nicht in Geweben von Warmblütern aufgefunden worden. Ihre jetzt gelungene Isolierung soll hier ebenfalls beschrieben werden.

In einer ersten Versuchsreihe inkubierten wir 16 α -Hydroxyprogesteron (V) mit Vollhomogenaten oder Schnitten von Rattenleber und untersuchten die Umwandlungsprodukte. Eine enzymatische Reduktion von Δ^4 -3-Ketosteroiden zu ringgesättigten 3-Keto-, 3 α -Hydroxy- und 3 β -Hydroxy-Verbindungen mittels Homogenaten oder Schnitten von Lebern oder Nebennieren ist schon verschiedentlich beobachtet worden, so bei Testosteron⁴⁾, Δ^4 -Androsten-3,17-dion⁵⁾⁶⁾, Progesteron⁷⁾ und den genuinen Corticosteroiden⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾. Auch die Perfusion von Rattenlebern¹¹⁾¹²⁾ oder Rinder-Nebennieren¹³⁾ mit verschiedenen Δ^4 -3-Ketonen lieferte vorwiegend im Ring A gesättigte Metaboliten.

Eine zweite Versuchsreihe sollte zur Abklärung der Frage dienen, auf welcher Stufe des Metabolismus zu den Verbindungen I–III das 16 α -Hydroxyl eintritt. Hierzu wurden die Modellsubstanzen Progesteron (VI) sowie Allopregnan-3 β -ol-20-on (VII), ein möglicher 16-Desoxy-Vorläufer von Verbindung I, auf ihre Konvertierbarkeit mit Homogenaten von Rattenlebern oder Rinder-Nebennieren geprüft. Während die 16 α -Hydroxylgruppe mit Hilfe von Mikroorganismen¹⁴⁾¹⁵⁾ verhältnismässig einfach und in guten Ausbeuten eingeführt werden kann, ist diese Reaktion mit Enzymsystemen aus Säugetier-Geweben nur selten und in geringen Ausbeuten beobachtet worden. So erhielten z. B. SCHNEIDER & MASON¹⁶⁾ bei der Inkubation von Dehydroepiandrosteron mit Kaninchenleber-Schnitten Δ^5 -Androsten-3 β ,16 α ,17 α -triol in 2–9% Ausbeute. Nach Perfusion von Testosteron durch Hundeleber isolierten AXELROD und Mitarb.¹⁷⁾ das 16 α -Hydroxy-Derivat neben anderen Produkten.

4) L. T. SAMUELS, C. McCAULEY & D. M. SELLERS, J. biol. Chemistry **168**, 477 (1947).

5) CH. D. KOCHAKIAN & G. STIDWORTHY, J. biol. Chemistry **210**, 933 (1954).

6) B. L. RUBIN, J. biol. Chemistry **227**, 917 (1957).

7) W. TAYLOR, Biochem. J. **56**, 463 (1954); **60**, 380 (1955).

8) a) J. J. SCHNEIDER & P. M. HORSTMANN, J. biol. Chemistry **191**, 327 (1951); b) J. J. SCHNEIDER, *ibid.* **194**, 337 (1952); c) J. J. SCHNEIDER & P. M. HORSTMANN, *ibid.* **196**, 629 (1952); d) J. J. SCHNEIDER, *ibid.* **199**, 235 (1952).

9) E. FORCHIELLI, H. ROSENKRANTZ & R. I. DORFMAN, J. biol. Chemistry **215**, 713 (1955); E. FORCHIELLI & R. I. DORFMAN, *ibid.* **223**, 443 (1956).

10) G. M. TOMKINS & K. J. ISSELBACHER, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3100 (1954); K. J. ISSELBACHER & G. M. TOMKINS, Fed. Proc. **13**, 236 (1954); G. M. TOMKINS, Rec. Progr. Hormone Res. **12**, 125 (1956); G. M. TOMKINS, J. biol. Chemistry **225**, 13 (1957).

11) a) E. Y. CASPI, H. LEVY & O. M. HECHTER, Arch. Biochemistry Biophys. **45**, 169 (1953); b) E. Y. CASPI & O. M. HECHTER, *ibid.* **52**, 478 (1954); c) *ibid.* **61**, 299 (1956).

12) L. L. MILLER & L. R. AXELROD, Metabolism **3**, 438 (1954).

13) A. S. MEYER, J. biol. Chemistry **203**, 469 (1953); A. S. MEYER, O. G. RODGERS & G. PINCUS, Acta endocrinol. **16**, 293 (1954).

14) D. PERLMAN, E. TITUS & J. FRIED, J. Amer. chem. Soc. **74**, 2126 (1952).

15) E. VISCHER, J. SCHMIDLIN & A. WETTSTEIN, Helv. **37**, 321 (1954).

16) J. J. SCHNEIDER & H. L. MASON, J. biol. Chemistry **172**, 771 (1948).

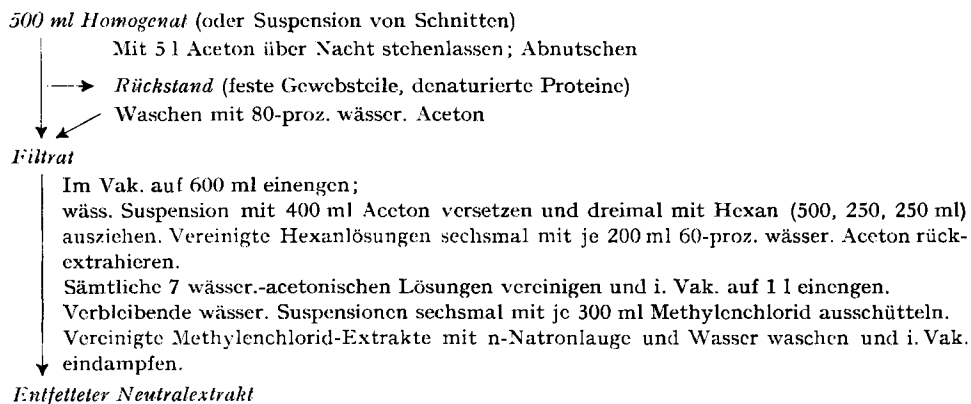
17) L. R. AXELROD, L. L. MILLER & F. HERLING, J. biol. Chemistry **219**, 455 (1956).

Isolierung der Umwandlungsprodukte

Die Extraktion der Gewebsinkubate und die Entfettung der Extrakte erfolgte nach dem Verfahren von CARTLAND & KUIZENGA¹⁸⁾, das wegen des verhältnismässig lipophilen Verhaltens der isolierten Verbindungen I–III etwas modifiziert wurde (vgl. Schema 1). Da eine quantitative Trennung von I, II und III durch Chromatographie an Silicagel aussichtslos war, begnügten wir uns damit, dieses Gemisch zuerst als Ganzes von weniger polaren Steroiden, wie Progesteron, und von nicht-steroidem Begleitmaterial abzutrennen (vgl. Schema 2). Allfällige 3, 16, 20-Trihydroxy-pregnane und -allopregnane, die aus 16 α -Hydroxyprogesteron durch Reduktion im Ring A und in der Seitenkette entstehen können und die sich papierchromatographisch z. T. sehr ähnlich wie die Verbindungen I–III verhalten, wurden hierauf durch Girardierung¹⁹⁾ entfernt.

Schema 1

Extraktion der Umwandlungsprodukte von Progesteron und 16 α -Hydroxyprogesteron aus inkubierten Gewebs-Homogenaten und -Schnitten



Das Prinzip der quantitativen papierchromatographischen Fraktionierung der Verbindungen I–IV gemäss Schema 2 beruht auf ihren bekannten²⁾ relativen Wanderungsgeschwindigkeiten in verschiedenen ZAFFARONI-²⁰⁾ und BUSH-²¹⁾ Systemen. Alle 4 stereoisomeren Steroide geben mit SbCl₃ im UV.-Licht von 360 m μ Wellenlänge eine blaue (bei höherer Konzentration bis gelbe) Fluoreszenz; die Erfassungsgrenze auf einem 1,5 cm breiten Papierstreifen liegt bei ca. 1 μ g nach Chromatographie in BUSH-Systemen. Kleine Eluat-Proben der einzelnen Zonen wurden jeweils in weiteren ZAFFARONI- und BUSH-Systemen mit Antimontrichlorid-Reagens²²⁾ qualitativ auf Einheitlichkeit geprüft. Da in keinem einzigen Inkubations-Versuch 3 β , 16 α -Dihydroxy-pregnan-20-on (IV) qualitativ nachgewiesen werden konnte, reduzierte sich die präparative Auftrennung gemäss Schema 2 in den späteren Ansätzen auf die zwei Systeme Propylenglykol/Toluol und BUSH B₃.

¹⁸⁾ G. F. CARTLAND & M. H. KUIZENGA, J. biol. Chemistry **116**, 57 (1936).

¹⁹⁾ A. GIRARD & G. SANDULESCO, Helv. **19**, 1095 (1936).

²⁰⁾ A. ZAFFARONI, Rec. Progr. Hormone Res. **8**, 51 (1953).

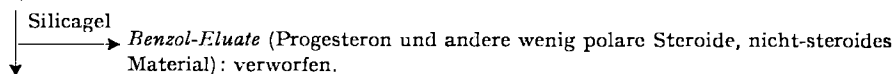
²¹⁾ I. E. BUSH, Biochem. J. **50**, 370 (1952).

²²⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. **34**, 2278 (1951).

Schema 2

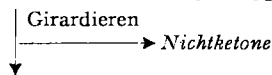
Fraktionierung der Umwandlungsprodukte

Entfetteter Neutral-extrakt

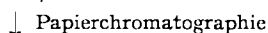


Methylenchlorid-Aceton-Eluate

(SEF + Isomere, Trihydroxypregnan-Verbindungen)



Ketonfraktion



1. System

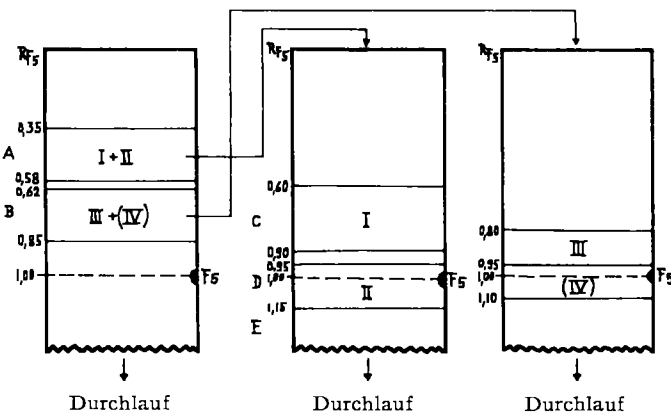
Propylenglykol/Toluol
(2-3 mg pro Blatt)

2. System

BUSH B₃
(1-2 mg pro Blatt)

(3. System)

Formamid/Benzol
(2-3 mg pro Blatt)



Verbindung IV und deshalb 3. System nur bei Modellversuchen, nicht nach Inkubationen. F₅ = roter Leitfarbstoff (vgl.²⁾).

Inkubation von 16 α -Hydroxyprogesteron (V) mit Homogenaten oder Schnitten von Rattenleber

Radioaktives 16 α -Hydroxyprogesteron, das sich aus Progesteron-[4-¹⁴C]²³ durch mikrobiologische Hydroxylierung mit einer nicht weiter definierten *Streptomyces*-Art herstellen liess, wurde unter verschiedenen Bedingungen (siehe Tab. 1) mit Homogenaten oder Schnitten von Rattenleber inkubiert. In allen Fällen entstand ein Gemisch der Isomeren I, II und III, während das 3 β ,5 β -Isomere IV nie auch nur papierchromatographisch nachgewiesen werden konnte. Auffallend sind die durchwegs günstigen Gesamt-Ausbeuten an Tetrahydroprodukten (¹/₃-²/₃) mit Homogenaten bei Zusatz von TPNH, aber auch von DPNH²⁴).

²³ Bezogen vom RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham, Bucks., England.

²⁴ In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen: DPN[⊖] = Diphosphopyridin-nucleotid (oxydierte Form); DPNH = Diphosphopyridin-nucleotid (reduzierte Form); TPN[⊖] = Triphosphopyridin-nucleotid (oxydierte Form); TPNH = Triphosphopyridin-nucleotid (reduzierte Form); ATP = Adenosin-triphosphat.

Tabelle 1. Inkubation von 16 α -Hydroxyprogesteron (V) mit Homogenaten oder Schnitten von Rattenleber

Vers. No.	Eingesetzt		Inkubations-Bedingungen			Isoliert (%)		
	Subst. V mg	Rattenleber g	Puffer	Zusätze	Gasphase	Subst. V l)	3 β , 5 α (I) 3 α , 5 β (II) 3 α , 5 α (III) 3 β , 5 β (IV)	3 ξ , 16 α -Dihydroxy-5 ξ -pregnan-20-on (I-III)
1	0 ^{a)}	80 ^{d)}	160 ml 0,1-m. KREBS-EGGLESTON-Phosphat-Puffer, pH 7,4 f)	Nicotinamid g)	N ₂		0	0
2	16 ^{b)}	16 ^{d)}	32 ml „ „	Nicotinamid g) 1,2 mg TPNH h)/mg Steroid	N ₂	~ 50	3,1 m)	11,9 m) 0 m) 31,2 m)
3	75 ^{b)}	150 ^{d)}	300 ml „ „	Nicotinamid g) 1 mg DPNH i)/mg Steroid	N ₂	< 1	10,9 m)	8,8 m) 13,0 m) 0 m) 32,7 m)
4	100 ^{c)}	200 ^{d)}	400 ml „ „	Nicotinamid g) 1 mg DPNH i)/mg Steroid	N ₂	< 1	11,3 n)	8,3 n) 13,0 n) 0 n) 32,6 n)
5	100 ^{c)}	200 ^{d)}	400 ml „ „	Nicotinamid g) 1 mg TPNH k)/mg Steroid	N ₂	< 1	11,4 n)	15,9 n) 39,3 n) 0 n) 66,6 n)
6	100 ^{b)}	100 ^{e)}	1000 ml KREBS-RINGER-Phosphat-Puffer, pH 7,4	(Glucose (2 g/l))	O ₂	wenige %	2,6 l)	3,6 l) 0 8,6 l)

a) Zur Ermittlung eventueller Blindwerte.

b) Inaktives 16 α -Hydroxyprogesteron.c) Radioaktives 16 α -Hydroxyprogesteron.

d) Rattenleber-Homogenat.

e) Enzymatisch reduziert; von SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis Mo., bezogen.

f) Enzymatisch reduziert; von C. F. BOEHRINGER & SÖHNE, Mannheim, bezogen.

g) Nicht kristallisiert; nur papierchromatographisch nachgewiesen, identifiziert und als einheitlich befunden; quantitative Auswertung durch Vergleich mit Verdünnungsreihen authentischer Substanzen.

h) Materialausbeute.

i) Radioausbeute.

e) Rattenleber-Schnitten

f) H. A. KREBS & L. K. EGGLESTON, Biochem. J. 34, 442 (1940).

g) 3 g/l Puffer.

h) Chemisch reduziert.

i) St. Louis Mo., bezogen.

j) Nicht kristallisiert; nur papierchromatographisch nachgewiesen, identifiziert und als einheitlich befunden; quantitative Auswertung durch Vergleich mit Verdünnungsreihen authentischer Substanzen.

k) Materialausbeute.

l) Radioausbeute.

In allen Versuchen: Temp. 37°, Dauer 3 Std.

In Arbeiten von TOMKINS & ISSELBACHER¹⁰⁾ über die erforderlichen Wasserstoff-Donatoren bei der Reduktion von Cortison zu Tetrahydro-cortison mit partiell gereinigten Enzympräparaten aus Rattenleber war gezeigt worden, dass die Reduktion sehr wahrscheinlich in zwei Stufen erfolgt, von denen die erste (Reduktion der Doppelbindung) irreversibel ist und TPNH benötigt, während im zweiten, reversiblen Schritt (Reduktion der 3-Ketogruppe) sowohl TPNH als DPNH als Co-Faktoren dienen können. Nach diesem Schema wäre für die Gesamtreaktion unbedingt TPNH notwendig. Die Autoren haben jedoch bereits darauf hingewiesen, dass gewisse andere Δ^4 -3-Ketosteroide auch mit DPNH als Co-enzym reduziert werden können, allerdings aber in geringerer Ausbeute als bei Anwesenheit von TPNH.

Da uns zu Anfang der Versuche kein enzymatisch reduziertes TPNH zur Verfügung stand, stellten wir eine kleine Menge durch chemische Reduktion von TPN[⊕] mit Natriumdithionit nach KAPLAN, COLOWICK & NEUFELD²⁵⁾ her. Auf Grund des Verhältnisses der gemessenen Extinktionen im UV.-Spektrum bei 340 m μ ($\epsilon_{\text{theor}} = 6250$ ²⁶⁾, red. Pyridiniumkern) und bei 260 m μ ($\epsilon_{\text{theor}} = 16\ 000$, Adeninkomponente) lag das Nucleotid dann zu 97% in der reduzierten Form vor. Bereits der Inkubationsversuch 2, in welchem eine relativ grosse Menge dieses Nucleotid-Präparates zur Anwendung kam, ergab neben ca. 50% unveränderten Ausgangsmaterials insges. 31,2% Tetrahydro-Produkte, aber nur verhältnismässig wenig Substanz I. Wurde das chemisch reduzierte TPNH durch enzymatisch reduziertes DPNH ersetzt (Versuch 3), so liess sich kein Ausgangsmaterial mehr nachweisen, die totale Ausbeute an den Verbindungen I–III war aber kaum verändert; dabei hat sich jedoch das Verhältnis von isolierter 3 β ,5 α -Verbindung I zu 3 α ,5 β -Verbindung II stark zugunsten der ersteren verschoben. Dieses Resultat konnte im folgenden Versuch 4 mit radioaktivem 16 α -Hydroxyprogesteron quantitativ verifiziert werden.

Inzwischen waren wir in den Besitz von enzymatisch reduziertem TPNH gekommen. Mit diesem wiederholten wir den Versuch 4 unter gleichen Reaktionsbedingungen, aber unter Ersatz von DPNH durch TPNH (Versuch 5). Während dabei Verbindung I in gleicher Menge entstand, stieg die Ausbeute an den Isomeren II und III auf das Doppelte bzw. Dreifache. Diese insgesamt etwa 67-proz. Konversion zu Tetrahydro-Verbindungen stellt ein bemerkenswertes Resultat dar, waren doch bei Verwendung von chemisch reduziertem TPNH (Versuch 2) mehr als dreimal niedrigere Ausbeuten an Substanz I und III gefunden worden.

Das Verhältnis der bei der enzymatischen Reduktion entstehenden Isomeren scheint also durch die Versuchsbedingungen wesentlich beeinflusst zu werden, doch ist beim Fehlen von Mehrfachbestimmungen nicht sichergestellt, ob diese Unterschiede signifikant sind. Speziell der auffallend grosse Anteil an 3 α ,5 α -Verbindung III im Versuch 5 wäre noch nachzuprüfen. In Übereinstimmung mit vielen Beobachtungen bei enzymatischen Umwandlungen von Δ^4 -3-Ketosteroiden mit Rattenleber^{8d)} 11a, b)¹²⁾ überwiegt jedoch auch in unseren Versuchen 3–5 die Summe der Allopregnan-Verbindungen I und III eindeutig über das Pregnan-Derivat II²⁷⁾. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass es VISCHER²⁸⁾ in unseren Laboratorien kürzlich gelungen ist, 16 α -

²⁵⁾ N. O. KAPLAN, S. P. COLOWICK & E. F. NEUFELD, J. biol. Chemistry **195**, 107 (1952).

²⁶⁾ P. OHLMEYER, Biochem. Z. **297**, 66 (1938); B. L. HORECKER & A. KORNBERG, J. biol. Chemistry **175**, 385 (1948).

²⁷⁾ Über Fraktionierung von Rattenleber-Homogenat in Δ^4 -5 α - und Δ^4 -5 β -Hydrogenasen siehe E. FORCHIELLI & R. I. DORFMAN, J. biol. Chemistry **223**, 443 (1956); The Endocrine Society, Program 39th Meeting, May 30–June 1, 1957, No. 15.

²⁸⁾ E. VISCHER, unveröffentlichte Versuche.

Hydroxyprogesteron mit einem Stamm von *Streptomyces griseus* teilweise in $3\beta, 16\alpha$ -Dihydroxy-allopregnan-20-on (I) überzuführen.

Zur Charakterisierung wurden die einzelnen, aus den präparativen Papierchromatogrammen gewonnenen Verbindungen, sobald sie sich als chromatographisch einheitlich erwiesen, bis zur Smp.- bzw. Radioaktivitäts-Konstanz umkristallisiert und durch Misch-Smp. und Infrarot-Spektren mit authentischen Präparaten verglichen.

In den Versuchen 3, 4 und 5 wurde schliesslich auch der nichtketonische Anteil näher untersucht. Alle drei Nichtketon-Fractionen enthielten sehr kleine Mengen zweier Substanzen A und B. Diese zeigten keine UV.-Absorption bei $240\text{ m}\mu$, gaben aber nach Antimontrichlorid-Behandlung eine ockerfarbige UV.-Fluoreszenz. Ihre präparative Trennung gelang im System BUSH B₃ ($R_{F5}^A = 0,83$; $R_{F5}^B = 1,27$), wobei z. B. Versuch 5 Material- und Radioaktivitäts-Ausbeuten von etwa 0,2% A und 0,7% B lieferte. Von den 8 theoretisch möglichen $3\beta, 16\alpha, 20\beta$ -Trihydroxypregnanen bzw. -allopregnanen, welche durch Reduktion sowohl im Ring A als auch in der Seitenkette entstehen können, standen uns das $3\beta, 5\alpha, 20\beta$ -Isomere (MARRIAN'S Triol²⁹⁾) sowie das $3\alpha, 5\alpha, 20\beta$ -Isomere^{29c)} zur Verfügung. Sie erwiesen sich weder mit A noch B als identisch. Eine weitere Aufklärung der letzteren Verbindungen musste wegen ihren geringen zur Verfügung stehenden Mengen unterbleiben.

Von verschiedenen Autoren ist beobachtet worden, dass mit zunehmendem Zerkleinerungsgrad der tierischen Gewebe, d.h. beim Übergang von der Schnitt- zur Homogenat-Technik, das Reduktionsvermögen für die Δ^4 -3-Ketogruppe teilweise verloren ging^{4) 7) 8)}. Wir führten deshalb auch Inkubationen mit Schnitten von Rattenleber in KREBS-RINGER-Phosphatpuffer unter Bespülen mit Medizinal-Sauerstoff durch, in der Hoffnung, noch bessere Umwandlungen zu erzielen. Wie der beispielsweise angeführte Versuch 6 zeigt, reichten aber die Ausbeuten an Substanz I-III mit 2,4-3,6% bei weitem nicht an die besten Resultate unter Verwendung von Homogenat und DPNH oder TPNH heran. Hiezu ist allerdings zu bemerken, dass diese Inkubationen wahrscheinlich unter schlechteren Belüftungsbedingungen ausgeführt wurden als bei den sonst üblichen Versuchen in WARBURG-Apparaturen.

Inkubation von Progesteron-[4-¹⁴C] mit Homogenaten von Rattenleber oder Rinder-Nebennieren

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, liess sich auch Progesteron (VI) mit Homogenaten von Rattenleber unter Hydroxylierung in Stellung 16α und Reduktion der Δ^4 -3-Ketogruppe in die Verbindungen I-III überführen, jedoch mit viel schlechteren Ausbeuten als das 16α -Hydroxyprogesteron. Im Gegensatz zu den Versuchen 3-5 von Tab. 1, bei welchen praktisch keine UV.-absorbierenden Verbindungen im Ketonanteil nachgewiesen werden konnten, entstand bei der Inkubation von Progesteron eine Vielzahl noch UV.-absorbierender Verbindungen. Die hier interessierenden Umwandlungsprodukte I-III liessen sich nach Schema 2 zwar isomerenfrei auftrennen (Kontrolle durch Antimontrichlorid-Reaktion), sie waren aber immer noch relativ stark mit UV.-positiven Begleitstoffen vermischt. Durch mehrmaliges Umkristallisieren zusammen mit grösseren Mengen der entsprechenden reinen nicht markierten Steroide gewannen wir schliesslich Kristallisate, welche frei waren von

²⁹⁾ a) G. A. D. HASLEWOOD, G. F. MARRIAN & E. R. SMITH, *Biochem. J.* **28**, 1316 (1934); b) R. E. MARKER & E. L. WITTLE, *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 855 (1939); c) H. HIRSCHMANN, F. B. HIRSCHMANN & M. A. DAUS, *J. biol. Chemistry* **178**, 751 (1949).

Tabelle 2. Inkubation von Progesteron-[4-14C] mit Rattenleber-Homogenat

Vers. No.	Eingesetzt		Inkubations-Bedingungen			Isoliert (%)			
	Progesteron mg	Rattenleber g	Puffer	Zusätze	Gasphase	Progesteron (VI)	3 β ,5 α (I)	3 α ,5 β (II)	3 α ,5 α (III)
7	100	100	200 ml KREBS-EGGLESTON-Phosphat-Puffer, pH 7,4	Nicotinamid a)	Luft	~ 57 b)	0,34 c)	0,44 c)	0,42 c)
8	100	100	200 ml „ „	Nicotinamid a) 1 mg ATP + 0,2 mg DPN \oplus + 0,2 mg TPN \oplus /mg Steroid	O ₂	~ 62 b)	0,94 c)	0,86 c)	0,72 c)

a) 3 g/l Puffer. b) Papierchromatographisch ermittelt durch Vergleich mit Verdünnungsreihen von reinem Progesteron.
c) Durch Cokristallisation bestimmt.

In allen Versuchen: Temp. 37°, Dauer 3 Std.

Tabelle 3. Inkubation von Progesteron-[4-14C] mit Homogenat aus Rinder-Nebennieren

Vers. Nr.	Eingesetzt		Inkubations-Bedingungen			Isolierte (bzw. nachgewiesene) Steroide (%) d)				
	Progesteron mg	NN g	Puffer	Zusätze	Progesteron (VI)	16 α -Hydroxyprogesteron (V)	Verbindung I	Hydrocortison	Corticosteron	REICHSTEIN'S Substanz S
9	50	250	500 ml 0,1-m. Saccharose-Phosphat-Puffer, pH 7,4 b)	Nicotinamid c) 1 mg ATP + 0,1 mg DPN \oplus + 0,01 mg TPN \oplus /mg Steroid Fumarat	(3,6)	0,04 (0,038)	(0,004) e)	5,0 (1,36)	55 (35,5)	
10	50	250	„ „	„ „	(2,36)	0,1 (0,06)	(0,025) e)	7,0 (2,15)	74 (28,3)	
11	50 a)	250	„ „	„ „	(3,93)	0,13 (0,096)	5,3 mg (0,044) f)	5,6 (2,36)	67 (46,5)	
12	50	250	„ „	Nicotinamid c), kein Fumarat kein ATP, DPN \oplus , TPN \oplus		0,048 (0,043)	(0,007) e)	8,0 (2,53)	15,6 (8,4)	4,1 (0,67)

a) Bedingungen wie in Vers. 9 und 10, aber 10 mg I als «trapping agent» vor der Inkubation zugeben.
b) Siehe exp. Teil. c) 3 g/l Puffer. d) Materialausbeuten ohne Klammern; Radioausbeuten in Klammern.
e) Nicht kristallisiert; Ausbeute auf Grund der Radioaktivität des Papierchromatogramm-Eluats berechnet.
f) In kristalliner Form erhalten.

Reaktionsbedingungen in allen Versuchen: Temp. 37°; Dauer 3 Std.; 2 l Luft pro Min.

UV.-absorbierenden Beimengungen; aus ihrer spezifischen Radioaktivität konnten dann, unter Berücksichtigung der Isotopenverdünnung, die effektiven Ausbeuten berechnet werden.

Die entsprechenden Umwandlungsversuche von Progesteron mit *Rinder-Nebennieren*-Homogenat zeitigten durchwegs schlechte Resultate (vgl. Tab. 3). Verbindung I entstand in so kleinen Mengen, dass sie nur papierchromatographisch nachgewiesen und die Ausbeuten auf Grund der Radioaktivität in den entsprechenden Zonen abgeschätzt werden konnten. Der relativ beste Wert ergab sich, wenn dem Homogenat ausser Progesteron-[4-¹⁴C] noch inaktives I, gewissermassen als «trapping agent», beigegeben wurde (Versuch 11).

Der grösste Teil der Radioaktivität befand sich bei allen Versuchen in Corticosteron und andern UV.-absorbierenden Corticosteroiden, von welchen einzelne papierchromatographisch isoliert und auf Radioaktivität geprüft wurden. So konnten u. a. kleine Mengen von 16 α -Hydroxyprogesteron (V) isoliert werden, welches radioaktiv war und demnach aus dem eingesetzten Progesteron (VI) entstanden sein muss. Wie bei den übrigen untersuchten Corticosteroiden war auch beim 16 α -Hydroxyprogesteron die Ausbeute an Radioaktivität etwas kleiner als diejenige an Substanz. Diese Tatsache kann erstens damit erklärt werden, dass das nicht aktive, in den Nebennieren vorhandene Progesteron oder andere Vorläufer von 16 α -Hydroxyprogesteron (V) unter den angewandten Bedingungen in letzteres umgewandelt wurden; eine zweite Erklärung liegt in der Annahme, dass die Nebennieren als solche kleine Mengen von V enthalten.

Wir arbeiteten nun ein Homogenat von 250 g Rinder-Nebennieren ohne Inkubation auf und bestimmten papierchromatographisch den Gehalt an Progesteron und 16 α -Hydroxyprogesteron. Die gefundenen Werte von 24–32 μ g/kg bzw. 240–300 μ g/kg erklären annähernd die Diskrepanz zwischen Material- und Radioausbeute bei den Inkubationsversuchen; es darf dabei angenommen werden, dass das genuine inaktive Progesteron in gleichem Masse 16 α -hydroxyliert wird wie die zugesetzte radioaktive Verbindung, und dass in den Nebennieren vorhandenes inaktives 16 α -Hydroxyprogesteron ebenfalls teilweise weiter verwandelt wird.

Bei der Inkubation von 3 β -Hydroxy-allopregnan-20-on (VII) mit Rinder-Nebennieren-Homogenat konnte keine Spur von Substanz I nachgewiesen werden.

Isolierung von 16 α -Hydroxyprogesteron (V) aus Schweine-Nebennieren

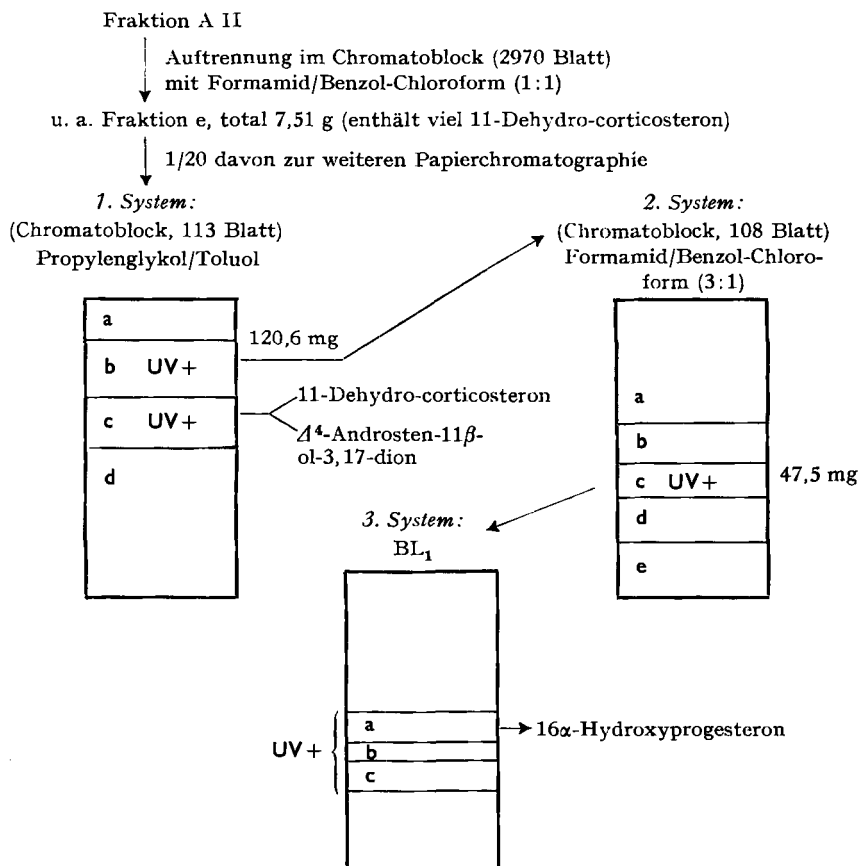
Auf Grund der beschriebenen Versuche wurden nun verschiedene früher beiseite gestellte Fraktionen aus 2 Tonnen Schweine-Nebennieren³⁰⁾ auf Anwesenheit von 16 α -Hydroxyprogesteron geprüft. Die qualitative papierchromatographische Analyse zeigte, dass das gesuchte Steroid vor allem in Fraktion e der ersten präparativen Papierchromatographie von AII³⁰⁾ vorhanden sein musste. Die im experimentellen Teil beschriebene papierchromatographische Auftrennung (s. Schema 3) führte dann zur Isolierung des reinen kristallinen 16 α -Hydroxyprogesterons (V) vom Smp. 223–226°. Der Gehalt betrug ca. 150 mg pro Tonne Schweine-Nebennieren. Verbindung V ist das dritte aus Nebennieren isolierte 16 α -Hydroxysteroid (nach Verbindungen I und III).

³⁰⁾ Vgl. bei ³⁾, S. 1669 ff.; Benennungen von dort übernommen.

Schema 3

Isolierung von 16 α -Hydroxyprogesteron (V) aus Schweine-Nebennieren

Ausgangsmaterial: s. Publikation³⁾, S. 1671.



Die erhaltenen *Resultate* weisen darauf hin, dass 16-Hydroxyprogesteron als Vorläufer in der Biogenese der Verbindungen I-III dienen kann. Die reduktive Umwandlung tritt unter unseren *in vitro*-Bedingungen vor allem in der Leber ein. Vorläufer und Reduktionsprodukte I und III werden *in vivo* offensichtlich in den Nebennieren gespeichert, da sie daraus isoliert werden konnten.

Die hier nachgewiesene 16 α -Hydroxylierung in Nebennieren-^{30a)} und Lebergewebe ist unter den angewandten Versuchsbedingungen zu geringfügig, um über den *bevorzugten* Produktionsort und Vorläufer von 16 α -Hydroxyprogesteron etwas signifikantes aussagen zu können. Progesteron stellt zweifellos einen der möglichen Vorläufer dar. Die geringen Ausbeuten an I-III ausgehend von Progesteron sind unter *in vitro*-Bedingungen nicht überraschend, haben doch in einem Ansatz oxydierende und reduzierende Reaktionen an der gleichen Molekel zu erfolgen.

^{30a)} Vgl. hierzu B. G. Rao & R. D. H. Heard, Arch. Biochemistry Biophys. 66, 504 (1957).

Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden in einem BÜCHI-Schmelzpunktsapparat (nach Dr. TOTTOLI) bestimmt und sind korrigiert. Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER double beam Spektrograph, Mod. 21, aufgenommen.

Die radioaktiven Proben wurden in «unendlich dünner» Schicht ($< 0,15 \text{ mg/cm}^2$) auf Teflon-Schälchen unter einer Endfenster-GM-Röhre mit einem «Tracerlab»-Gerät (Mod. Superscaler SC-18 A) ausgezählt. Alle Radioaktivitäten sind auf ein ^{14}C -Standardpräparat bezogen.

Die verwendeten Co-Faktoren waren Handelsprodukte, und zwar DPN[®] von PABST LABORATORIES, Milwaukee, Wis.; DPNH, TPN[®] und ATP von SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, Mo., und TPNH von C. F. BOEHRINGER & SÖHNE, Mannheim.

Papierchromatographie. – Qualitative Testierungen und präparative Trennungen wurden durchwegs nach dem absteigenden Verfahren auf gewaschenem WHATMAN-Papier Nr. 1, grössere Trennungen auf mehr als 50 Blättern im Chromatoblock³¹⁾ auf ungewaschenem Papier vorgenommen. Die Chromatogramme in ZAFFARONI-Systemen²⁰⁾ (F/Be = Formamid/Benzol, F/Be- CHCl_3 = Formamid/Benzol-Chloroform, F/Cy = Formamid/Cyclohexan, P/Tol = Propylenglykol/Toluol) wurden bei 22°, diejenigen in BUSH-Systemen²¹⁾ [B_3 = Petroläther-Benzol-Methanol-Wasser (17:33:40:10), BL_1 = Petroläther-Benzol-Methanol-Wasser (3:7:5:5)] bei 38° in Metalltrögen ausgeführt. Die Elution der Substanzen erfolgte nach NEHER & WETTSTEIN³²⁾ gemäss dem dort beschriebenen Modus a. Zur Lokalisierung von nicht UV.-Licht absorbierenden Substanzen wurden ein bis zwei $\frac{1}{2}$ cm breite Streifen von jedem Blatt mit Antimontrichlorid entwickelt, die blau bis gelb fluoreszierenden Stellen markiert und auf die Blätter übertragen. In den angegebenen Ausbeuten sind die in den papierchromatographischen Kontrollstreifen abgezweigten kleinen Substanzmengen berücksichtigt.

16 α -Hydroxyprogesteron-[4- ^{14}C]. – Vier 500 ml ERLLENMEYER-Kolben mit je 100 ml sterilisierter Nährlösung, enthaltend 3 g Fleischextrakt, 5 g Pepton, 10 g Rohglucose, 5 g NaCl und 10 g CaCO_3 in 1 l Leitungswasser, wurden mit der *Streptomyces*-Art A 7894 beimpft. Nach dreitägigem Schütteln bei 25–28° gab man zu der gut entwickelten Kultur unter sterilen Bedingungen 120 mg Progesteron-[4- ^{14}C], gelöst in 6 ml Aceton, und inkubierte dieses während zwei Tagen bei der angegebenen Temperatur. Die Aktivität des eingesetzten Progesterons (1 mc) betrug $11,88 \times 10^6$ ipm (= Impulse pro Min.).

Unter Zugabe von wenig Celite wurde nun vom Mycel abfiltriert und dieses gründlich mit Essigester ausgezogen. Die organischen Auszüge fanden Verwendung zur Extraktion des wässrigen Kulturfiltrats. Nach Waschen der Essigester-Extrakte mit 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser und Eindampfen im Vakuum verblieben 150 mg eines amorphen, teilweise öligen Rückstandes, der auf 60 Blatt Papier im F/Be-System präparativ chromatographiert wurde. Die UV.-absorbierende Zone vom Rf 0,41–0,52, in welcher sich das 16 α -Hydroxyprogesteron befand, wurde eluiert und das Eluat durch eine Säule von 3,5 g desaktiviertem Silicagel (24 Std. bei 140° aktiviert, dann mit 15 Gew.-% H_2O desaktiviert) filtriert. Mit 150 ml Methylenchlorid/Aceton (4:1) liessen sich 71 mg Material eluieren, die beim Umkristallisieren aus Aceton 54,8 mg radioaktives 16 α -Hydroxyprogesteron vom Smp. 225,5–227° und der Aktivität $5,13 \times 10^6$ ipm ergaben. Die Mutterlaugen lieferten durch Umkristallisieren zusammen mit 25 mg inaktivem V weitere 24 mg vom Smp. 225–227° und der Aktivität $0,564 \times 10^6$ ipm.

Elution der UV.-absorbierenden Frontzone mit 20-proz. Methanol ergab 404 mg eines öligen Eluates, das bei der präparativen Chromatographie an 35 Blatt Papier (aus der Zone vom Rf 0,60–0,73) 29 mg rohes Progesteron der Aktivität $2,4 \times 10^6$ ipm lieferte. Zur Ausnützung der ^{14}C -Aktivität hydroxylierten wir dieses ohne weitere Reinigung nochmals mikrobiologisch wie oben beschrieben.

Die totale Aktivitätsausbeute an isoliertem reinem 16 α -Hydroxyprogesteron betrug 51%.

Inkubation von 16 α -Hydroxyprogesteron-[4- ^{14}C] (V) mit Rattenleber-Homogenat³³⁾. – Als Beispiel sei hier Versuch Nr. 5 von Tab. 1 wiedergegeben: 18 ca. 250 g schwere männliche Ratten (Stamm Ivanovas) wurden durch Genickschlag getötet, sofort decapitiert und

³¹⁾ E. VON ARX & R. NEHER, Helv. **39**, 1664 (1956).

³²⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, J. clin. Invest. **35**, 800 (1956).

³³⁾ Herrn Dr. F. W. KAHNT sind wir für methodische Angaben zur Durchführung der Homogenat-Inkubationen dankbar.

ca. $\frac{1}{2}$ Min. bluten gelassen. Die innerhalb einer Min. herausgeschnittenen Lebern (total 200 g) wurden in 200 ml 0,1-m. KREBS-EGGLESTON-Phosphatpuffer, pH 7,4³⁴), enthaltend 3 g Nicotinamid pro l, während total 3 Min. bei 0° im CUISTRO-Homogenisator homogenisiert. Zur Aufrechterhaltung des pH während des Homogenisierens war die Zugabe von 4 ml n. Natronlauge notwendig. Das Homogenat wurde mit weiteren 200 ml Puffer in einen 3-l-Rundkolben gespült und mit 100 mg radioaktivem 16 α -Hydroxyprogesteron der Aktivität $2,05 \times 10^6$ ipm, gelöst in 4,2 ml Feinsprit, versetzt. Nach 3-minütigem Spülen des Kolbens mit Stickstoff fügte man 100 mg enzymatisch reduziertes TPNH zu, spülte abermals mit Stickstoff und inkubierte 3 Std. unter Schütteln bei 37°. Das pH betrug am Schluss 6,95.

Nun wurde das Inkubat mit 5 l Aceton versetzt und über Nacht mechanisch gerührt. Am nächsten Tag nutschte man vom Gewebekuchen ab, rührte den Nutschenrückstand noch viermal mit je 400 ml 80-proz. wässer. Aceton bei 35° ca. 7 Min. auf und nutschte wieder ab. Die vereinigten wässer.-acetonischen Lösungen wurden i. Vak. auf ca. 600 ml eingengt. Die verbleibende Suspension versetzte man mit 400 ml Aceton und schüttelte sie dreimal mit je 250 ml Hexan aus. Die Hexan-Lösungen ihrerseits wurden in Serie sechsmal mit je 200 ml 60-proz. wässer. Aceton rückextrahiert. Die sieben vereinigten wässer.-acetonischen Lösungen wurden i. Vak. auf 1 l eingengt, dann sechsmal mit je 300 ml Methylenchlorid extrahiert und die Extrakte mit n.-Natronlauge und Wasser gewaschen. Man erhielt 1,1 g *entfetteten Neutralextrakt*, welcher an 36 g desaktiviertem Silicagel chromatographiert wurde:

	<i>Aktivität (ipm)</i>
Fr. 1 in 200 ml Benzol	31 mg, ölig < 900
Fr. 2 in 700 ml CH ₂ Cl ₂ -Aceton 4:1	124 mg, krist. 1 855 000
Fr. 3 in 200 ml CH ₂ Cl ₂ -Aceton 4:1	8 mg, teilw. krist. 27000

Girardierung: Fr. 2 und 3 wurden in 13 ml abs. Äthanol gelöst und mit 260 mg GIRARD-T-Reagens unter Zugabe von 1,3 ml Eisessig über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nun gab man ca. 150 ml Eiswasser und Eis zu, enthaltend 22,4 ml n. Natronlauge, und trennte die nichtketonischen Anteile durch sofortige Extraktion mit Methylenchlorid in der Kälte ab. Hierauf säuerte man die wässrige Schicht mit 20 ml konz. Salzsäure an, gab Methylenchlorid zu und liess vor dem Extrahieren unter gelegentlichem Umschütteln 20 Min. stehen. Die Methylenchlorid-Auszüge wurden mit 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und i. Vak. eingedampft. Man erhielt: 23,5 mg Nichtketon-Anteil mit einer Aktivität von $0,064 \times 10^6$ ipm sowie 99,5 mg Keton-Anteil mit $1,81 \times 10^6$ ipm.

Keton-Anteil: Die qualitative papierchromatographische Kontrolle des Keton-Anteils in F/Be-CHCl₃(1:1) ergab nur minime Mengen von UV.-absorbierenden Substanzen, insbesondere weniger als 1% 16 α -Hydroxyprogesteron. Hingegen traten beim Behandeln mit Antimontrichlorid zwei blau bis gelb fluoreszierende Flecke mit R_f 0,58 bzw. 0,74 auf.

Die verbleibenden 99,4 mg Keton-Fraktion wurden an 50 Blatt Papier in P/Tol chromatographiert (bis Leitfarbstoff F 5 ca. $\frac{3}{4}$ unten). Eluiert wurden:

Zone A: R_{F5} 0,35–0,58, SbCl₃-Reaktion blau bis gelb (64 mg)

Zone B: R_{F5} 0,62–0,85, SbCl₃-Reaktion gelb (98 mg)

Zone A erfuhr im BUSH-System B₃ eine deutliche Aufspaltung in mindestens zwei SbCl₃-positive Substanzen. Die Rechromatographie dieses Eluates (64 mg) an 32 Blatt Papier im System B₃ (entwickelt bis F 5 $\sim \frac{1}{3}$ unten) gab folgende Eluate:

Zone C: R_{F5} 0,60–0,90, SbCl₃-Reaktion blau bis gelb (17,5 mg)

Zone D: R_{F5} 0,95–1,15, SbCl₃-Reaktion gelb (21,5 mg)

Zone E: R_{F5} 1,16–1,28, SbCl₃-Reaktion gelb (11,0 mg)

Das Eluat der Zone C erwies sich in den Systemen F/Be, F/Be-CHCl₃(1:1) und P/Tol als einheitlich und wanderte gleich wie Substanz I. Das Eluat aus der Zone D zeigte R_{F5}-Werte, die mit denjenigen von Verbindung II gut übereinstimmten. Es war aber mit kleinen Mengen einer anderen SbCl₃-positiven Substanz behaftet, welche sich papierchromatographisch wie Verbindung III verhielt. Umgekehrt enthielt das Eluat der Zone E, welches sich als identisch mit demjenigen von Zone B erwies, neben dem Hauptprodukt III minime Beimengungen von Substanz II.

³⁴) S. Tab. 1, Fussnote f).

Zone C: Die 17,5 mg Eluat aus der C-Zone wurden an 700 mg desaktiviertem Silicagel chromatographiert:

	<i>Aktivität</i> (ipm)
Fr. 1 in 10 ml Benzol	2,3 mg Öl 0
Fr. 2 in 50 ml CH ₂ Cl ₂ -Aceton 4:1	12,2 mg Krist. 2,045 × 10 ⁶
Fr. 3 in 25 ml CH ₂ Cl ₂ -Aceton 4:1	0,4 mg Krist. 0,003 × 10 ⁶

Die 12,6 mg aktiven, kristallinen Materials wurden mit Aceton bis zur Smp.- und Radioaktivitäts-Konstanz umkristallisiert:

	<i>Totale Aktivität</i> (ipm)	<i>Spezif. Aktivität</i> (ipm/mg)
12,6 mg Kristallinat 1, Smp. 226–235° . . .	20,46 × 10 ⁴	1,629 × 10 ⁴
↓ 7,0 mg Kristallinat 2, Smp. 244–246° . . .	13,20 × 10 ⁴	1,884 × 10 ⁴
↓ 4,1 mg Kristallinat 3, Smp. 252–254° . . .	8,04 × 10 ⁴	1,962 × 10 ⁴
↓ 1,1 mg Kristallinat 4, Smp. 252–254,5° . . .	2,17 × 10 ⁴	1,974 × 10 ⁴

Misch-Smp. mit authentischer Verbindung I: 252–255°. Das IR.-Spektrum stimmte mit demjenigen von synthetischem I völlig überein.

Unter Berücksichtigung der gefundenen spezifischen Aktivitäten und eines Verlustfaktors von 1,1 für entwickelte Papierstreifen berechnet sich die Ausbeute an I bezogen auf V bei der Inkubation zu: $1,1 \times 12,6 \times 1,629 / 1,974 = 11,4\%$.

Zone D: Das Eluat der Zone D wurde an 800 mg desakt. Silicagel chromatographiert. Die mit CH₂Cl₂-Aceton (4:1) gewonnenen 16,6 mg kristallines Eluat wurden aus Aceton umkristallisiert, wobei folgende spezifische Aktivitäten in den Kristallisaten gemessen wurden:

	<i>Totale Aktivität</i> (ipm)	<i>Spezif. Aktivität</i> (ipm/mg)
16,6 mg Kristallinat 1, Smp. 194–200,5° . .	28,68 × 10 ⁴	1,73 × 10 ⁴
↓ 8,0 mg Kristallinat 2, Smp. 202–205,5° . .	15,15 × 10 ⁴	1,89 × 10 ⁴
↓ 3,8 mg Kristallinat 3, Smp. 206–208° . . .	7,49 × 10 ⁴	1,97 × 10 ⁴
↓ 1,4 mg Kristallinat 4, Smp. 207–208° . . .	2,79 × 10 ⁴	1,99 × 10 ⁴

Misch-Smp. mit authentischer Verbindung II: 206,5–207°. Das IR.-Spektrum erwies sich mit demjenigen von Verbindung II als identisch. Die Ausbeute berechnet sich zu 15,9%.

Zone B + E: Bei der Umkristallisation aus Aceton der vereinigten Zonen B und E, die sich identisch verhielten und weitgehend einheitlich schienen, ergaben sich folgende Daten:

	<i>Totale Aktivität</i> (ipm)	<i>Spezif. Aktivität</i> (ipm/mg)
46 mg Kristallinat 1, Smp. 194–202°	72,42 × 10 ⁴	1,57 × 10 ⁴
↓ 22 mg Kristallinat 2, Smp. 203–205°	41,40 × 10 ⁴	1,88 × 10 ⁴
↓ 11,6 mg Kristallinat 3, Smp. 206–208° . . .	22,70 × 10 ⁴	1,96 × 10 ⁴
↓ 4,4 mg Kristallinat 4, Smp. 207–209,5° . . .	8,74 × 10 ⁴	1,98 × 10 ⁴

Kristallinat 4 gab mit der niedriger schmelzenden Modifikation²⁾ von Verbindung III keine Smp.-Depression und stimmte auch im IR.-Spektrum mit derselben überein. Ausbeute 39,3%.

Nichtketon-Anteil: 23 mg vom nichtketonischen Anteil wurden an 10 Blatt Papier im System BUSH B₃ chromatographiert (F 5 als Leitfarbstoff bis 1/2 unten); es konnten zwei SbCl₃-positive, UV.-negative Zonen vom R_{F5} 0,75–0,95 bzw. R_{F5} 1,15–1,35 eluiert werden. Nach Filtration durch Silicagel in CH₂Cl₂-Aceton (4:1) wurden erhalten:

	<i>SbCl₃-Fluoreszenz</i>	<i>Aktivität (ipm)</i>
0,2 mg A . . .	ockerfarbig	~ 3400
0,7 mg B . . .	ockerfarbig	~ 13850

Der papierchromatographische Vergleich mit MARRIAN's Triol und mit 3 α ,16 α ,20 β -Trihydroxy-pregnan fiel sowohl für A wie für B negativ aus.

Chemische Reduktion von TPN[⊕]. – Für Versuch 2 von Tab. 1 wurden 20 mg TPN[⊕], «SIGMA», nach KAPLAN und Mitarb.²⁵⁾ in 8 ml dest. Wasser gelöst und nach Zugabe von 0,5 ml 0,5-m. Natriumhydrogencarbonat-Lösung mit 15 mg Natriumdithionit-bishydrat (MERCK) versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde sofort evakuiert und 30 Min. bei 37° belassen. Nach Abkühlen auf Eistemperatur wurde das Kölbchen dann geöffnet, 0,2 ml n. Natronlauge zugegeben, die Lösung auf Zimmertemperatur gebracht und 5 Min. mit Sauerstoff durchspült. UV.-Spektrum: $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 260 m μ , $\epsilon_1 = 14150$ (theor. 16000), sowie 334 m μ , $\epsilon_2 = 5370$ (theor. 6250).

Die wasserklare farblose Lösung, welche auf Grund des Verhältnisses der Extinktionen beider Banden 97% reduziertes Nucleotid enthielt, wurde unmittelbar für den Inkubationsversuch 2 verwendet. Ausführung und Aufarbeitung analog Versuch 5.

Inkubation von 16 α -Hydroxyprogesteron (V) mit Schnitten von Rattenleber²⁶⁾. – 5 mg 16 α -Hydroxyprogesteron wurden in einem 300 ml ERLLENMEYER-Kolben mit Schliff in 0,5 ml Feinsprit unter Erwärmen vorsichtig gelöst. Unter kräftigem Umschwenken gab man 49,4 ml heissen, calciumfreien, KREBS-RINGER-Phosphatpuffer vom pH 7,4 zu [1000 Teile 0,9-proz. NaCl (0,154-m.), 40 Teile 1,15-proz. KCl (0,154-m.), 15 Teile 2,42-proz. CaCl₂, 6H₂O (0,11-m.), 10 Teile 3,82-proz. MgSO₄·7H₂O (0,154-m.) und 210 Teile 0,1-m. Phosphatpuffer, pH 7,4]. Dann liess man auf 35° abkühlen und versetzte mit 5 g frisch bereiteten 0,3 bis 0,5 mm dicken Schnitten von Rattenleber. Schliesslich gab man 0,5 ml 20-proz. sterile Glucoselösung sowie die fehlenden 0,6 ml Standard-Lösung von CaCl₂ zu, wobei stets eine Trübung eintrat. Man spülte den Kolben mit Medizinal-Sauerstoff und inkubierte 3 Std. bei 37° auf der Schüttelmaschine. Die Reaktion wurde gestoppt durch Versetzen der Suspension mit 10 Volumenteilen Aceton. Die Isolierung der Reaktionsprodukte erfolgte analog den Versuchen mit Homogenat. 20 solcher 5-mg-Ansätze wurden gemeinsam aufgearbeitet (Versuch 6, Tab. 1).

Inkubation von Progesteron-[4-¹⁴C] (VI) mit Rattenleber-Homogenat (Tab. 2, Versuche 7 und 8). – 100 mg Progesteron, enthaltend 10 μc Radioaktivität (gemessen 1,83 $\times 10^6$ ipm), wurden analog wie vorne beschrieben, unter Verwendung der in Tab. 2 aufgeführten Zusätze mit Homogenat aus 100 g Rattenleber in 0,1-m. KREBS-EGGLESTON-Phosphatpuffer vom pH 7,4 inkubiert. Die Entfettung und die papierchromatographische Trennung der Umwandlungsprodukte erfolgten ebenfalls wie früher. Die Eluate der Verbindungen I–III enthielten aber durchwegs noch kleinere Mengen von UV.-absorbierenden Begleitsubstanzen, welche die Kristallisation erschwerten. Die weitere Reinigung gelang durch Cokristallisation. Diese verlief bei Versuch 7 folgendermassen: 1,3 mg Eluat der Verbindung II enthaltenden Zone wurden zusammen mit 3 mg inaktivem reinem II umkristallisiert. Man erhielt:

	<i>Totale Aktivität (ipm)</i>	<i>Spezif. Aktivität (ipm/mg)</i>
1,7 mg Kristallisat 1, Smp. 192,5–196° . .	2640	1554
↓ + 2,5 mg Mutterlaugen 1	5250	2100
0,45 mg Kristallisat 2, Smp. 206–208,5° . .	684	1527
+ 1,15 mg Mutterlaugen 2	1821	1581

²⁶⁾ Wir danken den Herren Prof. Dr. LEUTHARDT, Zürich, und Prof. Dr. SCHULER, Basel, für wertvolle Ratschläge zur Herstellung von Gewebeschnitten.

Aus der spezifischen Aktivität von 1527 ipm/mg im Kristallinat 2 lässt sich, unter Berücksichtigung eines Substanz-Verlustfaktors von 1,22, eine Ausbeute von 0,44% berechnen.

Die analoge zweimalige Cokristallisation von 0,85 mg Eluat aus der Zone von Verbindung I zusammen mit 3,5 mg inaktiver reiner Substanz I gab 0,8 mg eines Kristallisates vom Smp. 248,5–249,5° mit einer spezif. Aktivität von 1263 ipm/mg. Die spezif. Aktivität der dazugehörigen Mutterlaugen betrug 1311 ipm/mg. Ausbeute: 0,34%.

Verbindung III liess sich aus 1,3 mg des entsprechenden Eluats durch Cokristallisation mit 3 mg inaktivem III isolieren und enthielt am Schluss eine spezif. Aktivität von 1527 ipm/mg, während die letzten Mutterlaugen 1587 ipm/mg aufwiesen. Ausbeute: 0,42%.

Der grösste Teil der eingesetzten Aktivität befand sich in den Hexan-Lösungen der Lipoide $[1,233 \times 10^6$ ipm (67,5%) in Vers. 7 bzw. $1,14 \times 10^6$ ipm (62,4%) in Vers. 8]. Die papierchromatographische Untersuchung aliquoter Mengen im System F/Cy zeigte, dass die Lösungen in ungefähr den erwähnten Prozentsätzen Progesteron enthielten (Abschätzung durch Vergleich mit Verdünnungsreihen von reinem Progesteron).

Inkubation von Progesteron-[4- 14 C] mit Rinder-Nebennieren-Homogenat (Tab. 3: Versuche 9–12). – Verwendete Puffer: Saccharose-Phosphatpuffer: 68,4 g Saccharose, 3,62 g NaCl, 1,86 g KCl, 3,56 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pro Liter. Fumarat-Phosphatpuffer: 3,62 g NaCl, 1,86 g KCl, 3,56 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 4,64 g Fumarsäure pro Liter, mit n. Natronlauge auf pH 7,6 eingestellt.

Der optimale unserer Versuche, Nr. 11, verlief folgendermassen: 250 g vom Fettpolster befreite Nebennieren von 8 frisch geschlachteten Kühen und Rindern wurden bei 0° fein zerhackt und mit 250 ml Saccharose-Phosphatpuffer vom pH 8,55, enthaltend 3 g Nicotinsäureamid pro Liter, homogenisiert. Durch Neutralisieren mit insgesamt 6,0 ml n. Natronlauge konnte das rasch fallende pH auf 7,5 gehalten werden. Das Homogenat wurde mit 250 ml Fumarat-Phosphatpuffer vom pH 7,6 und 50 ml 1-proz. Magnesiumsulfat-Lösung in einen 3-l-Rundkolben gespült. Dann versetzte man mit 50 mg radioaktivem Progesteron ($1,686 \times 10^6$ ipm), gelöst in 1 ml Feinsprit, sowie mit 10 mg inaktiver Verbindung I, gelöst in 1 ml Propylenglykol. Nach Zugabe von 250 mg ATP, 25 mg DPN $^{\oplus}$ und 2,5 mg TPN $^{\oplus}$ wurde das Homogenat bei $37 \pm 1^\circ$ 3 Std. mechanisch gerührt, unter Einleiten von ca. 2 l Luft pro Min. durch eine Glasfritte. Die Schaumbildung liess sich mit wenigen Tropfen 2-Octanol weitgehend verhindern. Extraktion, Entfettung, Chromatographie an Silicagel und Girardierung erfolgten analog wie vorne beschrieben. Es fielen 78 mg ketonisches Material an, welches im System F/Be- CHCl_3 (1:1) an 39 Blatt Papier chromatographiert wurde.

Progesteron: Die Front-Zone wurde eluiert und an 5 Blatt Papier im System F/Cy rechromatographiert. Die mit authentischem Progesteron wandernde Zone gab 4,5 mg eines amorphen Eluats, das eine Aktivität von 66450 ipm aufwies.

Corticosteron: 38 mg Eluat; Rechromatographie an 19 Blatt Papier im System P/Tol (bis Farbstoff F5 $\frac{1}{3}$ unten). Das Eluat der Corticosteron-Zone gab beim Kristallisieren aus Aceton-Äther 33,5 mg Corticosteron vom Smp. 181–184° und einer totalen Aktivität von $7,85 \times 10^5$ ipm (46,5% der eingesetzten Aktivität).

Hydrocortison: 5 mg Eluat; Rechromatographie an $2\frac{1}{2}$ Blatt Papier im System P/Tol (bis Farbstoff F5 unten). Die eluierte Hydrocortison-Zone wies eine Aktivität von 39750 ipm auf (2,36%).

Verbindung I: Die dem Corticosteron knapp voranwandernde Zone wurde eluiert und im System P/Tol (bis Farbstoff F5 $\frac{3}{4}$ unten) an 10 Blatt Papier rechromatographiert. Die Elution der UV.-negativen Zone mit R_{F5} 0,4–0,6 gab 5,3 mg kristallines I mit einer Aktivität von 750 ipm. Die spezifische Aktivität blieb beim Umkristallisieren aus Aceton praktisch unverändert; Smp. 246–248°, Misch-Smp. mit authentischem I 247–250°. Radioausbeute: 0,044%.

16 α -Hydroxyprogesteron (V): Die Zone mit R_f 0,73–0,87 (enthaltend neben 16 α -Hydroxyprogesteron das 11-Dehydro-corticosteron) wurde eluiert (8 mg) und das Eluat zuerst an $2\frac{1}{2}$ Blatt Papier im System P/Tol (bis Front unten) dann an $2\frac{1}{2}$ Blatt Papier im System F/Be (bis Front unten) rechromatographiert, unter Verwendung von reinem V als Leitsubstanz in beiden Systemen. Man erhielt 1,6 mg Eluat mit einer Aktivität von 1617 ipm (0,096% Radioausbeute). Ein Viertel davon wurde im System F/Be zusammen mit Verdünnungsreihen von reinem inaktivem V chromatographiert (Doppelbestimmung). Durch Vergleich der Intensitäten der UV.-Absorption bei 240 $\mu\mu$ liess sich eine Materialausbeute von 60–70 μg , d. h. ca. 0,13%, abschätzen.

Cokristallisation:

	<i>Totale Aktivität (ipm)</i>	<i>Spezif. Aktivität (ipm/mg)</i>
0,8 mg (restl.) Eluat	808	1010
↓ Cokrist. mit 2 mg inaktivem V . .		
1,2 mg Kristallisat 1, Smp. 219,5–222° . .	348	290
↓ + 1,6 mg Mutterlaugen 1	444	277
0,50 mg Kristallisat 2, Smp. 222,5–224° . .	142	284
+ 0,55 mg Mutterlaugen 2	160	292

Isolierung von 16 α -Hydroxyprogesteron (V) aus Schweine-Nebennieren³⁶⁾. – Ein Zwanzigstel der Fraktion e von A II³⁰⁾, d. h. 385 mg, wurde zunächst an 113 Blatt Papier im Blockverfahren mit dem System P/Tol aufgetrennt (vgl. Schema 3). Fraktion b wurde im System F/Be-CHCl₃ (3:1), die dabei gewonnene Fraktion c dann im System BL₁ rechromatographiert, unter ständiger Kontrolle durch UV.-Absorption und Natronlaugenfluoreszenz im Vergleich zu 16 α -Hydroxyprogesteron. Die aus dem letzten System gewonnene Fraktion a kristallisierte mit Aceton-Äther und erwies sich nach Misch-Smp., ihrem IR.-Spektrum und dem papierchromatographischen Verhalten als identisch mit 16 α -Hydroxyprogesteron.

R_g-Werte von 16 α -Hydroxyprogesteron (S = Corticosteron): P/Tol 1,34; F/Be 1,90; F/Be-CHCl₃(1:1) 1,49; BL₁ 1,30.

Farbreaktionen: mit Blautetrazolium schwach grau; mit Dinitrophenylhydrazin orangegeb. Natronlaugenfluoreszenz schwach gelb.

C₂₁H₃₀O₃ (330,45) Ber. C 76,32 H 9,15% Gef. C 76,44 H 8,98%

Die zu Isotopenverdünnungs- und Vergleichsversuchen benötigten Mengen von 3 α ,16 α -Dihydroxy-pregnan-20-on (II), 3 α ,16 α -Dihydroxy-allopregnan-20-on (III), 3 β ,16 α ,20 β -Trihydroxy-allopregnan und 3 α ,16 α ,20 β -Trihydroxy-allopregnan sind von Herrn Dr. CH. MEYSTRE hergestellt worden.

Herrn Dr. E. VISCHER danken wir für seine Ratschläge zur Ausführung der mikrobiologischen Hydroxylierung. Die Mikroanalyse verdanken wir Herrn Dr. W. PADOWETZ, die Aufnahme der IR.-Spektren den Herren Dr. F. GANZ und Dr. R. ZÜRCHER. Für Hilfe bei der Papierchromatographie sind wir Herrn E. VON ARX dankbar.

SUMMARY

(1) Radioactive 16 α -hydroxyprogesterone (V) on incubation with homogenates or slices of rat liver, using in the first instance TPNH or DPNH as hydrogen-carrier, is converted into 3 β ,16 α -dihydroxy-allopregnan-20-one (I), 3 α ,16 α -dihydroxy-pregnan-20-one (II) and 3 α ,16 α -dihydroxy-allopregnan-20-one (III) in maximum yields of 11.4, 15.9, and 39.3%, respectively. This shows that V may be a precursor of the genuine, reduced compounds I–III.

(2) Radioactive progesterone is converted into the same three 16 α -hydroxysteroids by rat liver homogenate in yields of only 0.94, 0.86, and 0.72%, respectively.

(3) With bovine adrenal homogenate an extremely low conversion of progesterone into 16 α -hydroxyprogesterone (0.096%) and substance I (0.044%) is observed.

(4) Crystalline 16 α -hydroxyprogesterone can be isolated from hog adrenals in a yield of approx. 150 mg per ton of tissue.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

³⁶⁾ Die Isolierung wurde von R. NEHER ausgeführt.