

## 151. Isolierung und Identifizierung neuer Nebennieren-Steroide; Charakterisierung weiterer Inhaltsstoffe

Über Steroide, 169. Mitteilung.<sup>1)</sup>

von R. NEHER und A. WETTSTEIN

(29. IV. 60)

Aus den zahlreichen Fraktionen, die uns bei der Isolierung von Aldosteron<sup>2)</sup>, 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Dihydroxy-20-keto-allopregnan<sup>3)</sup> und weiteren Pregnanderivaten<sup>4)5)6)</sup> aus *Schweine-Nebennieren* anfielen, gelang es, noch einige andere kristallisierte Verbindungen in meist recht kleiner Ausbeute erstmals zu isolieren und zu identifizieren. Neben Pregnenolon und 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon<sup>7)</sup> handelte es sich um das 20  $\rightarrow$  18-Lacton der 3-Keto-11 $\beta$ ,18-dihydroxy- $\Delta^4$ -ätiensäure und weitere im Zusammenhang mit der Biosynthese des Aldosterons interessierende Pregnenderivate<sup>8)</sup>. Im folgenden berichten wir über die Isolierung und Identifizierung einer Gruppe von 3-Keto-20-hydroxy- $\Delta^4$ -pregnenen sowie von 3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -androgenen und 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Dihydroxy-17-keto-androstan.

Ausserdem wurden mehrere andere Verbindungen abgetrennt, bei denen es sich teilweise wahrscheinlich um Steroide oder steroidartige Stoffe handelt, deren Menge jedoch für eine einwandfreie Identifizierung nicht ausreichte und deren weitere Untersuchung z. Zt. nicht beabsichtigt ist; immerhin wurde versucht, sie durch Angabe verschiedener Eigenschaften so weit als möglich zu charakterisieren.

1. *3-Keto-20 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -pregnen ( $\Delta^4$ -Pregnenolon)*. Dieses Steroid konnte erstmals in sehr kleiner Menge als Begleiter verschiedener oxygenierter Progesteron-derivate nach Schema 1 isoliert werden. Die aus Zone a bzw. b der beiden letzten BUSH-A-Chromatogramme eluierte Verbindung verhielt sich chromatographisch wie 3-Keto-20 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (s. Tab. 1). Nach Kristallisation erwies sie sich auch im Misch-Smp. und IR.-Spektrum als identisch damit. Der Gehalt in der Nebennieren-Charge NN XI betrug nur ca. 2,5–5 mg pro Tonne; die gleiche Verbindung ist kürzlich auch im Nebennieren-Venenblut von Kälbern bis zu einem Alter von 2 Monaten nachgewiesen worden<sup>9)</sup>. Das 20 $\beta$ -Epimere, ein ebenfalls bekannter Metabolit<sup>10)</sup> von Progesteron, wurde in Nebennieren bisher nicht aufgefunden.

<sup>1)</sup> 168. Mitteilung s. J. URECH, E. VISCHER & A. WETTSTEIN, *Helv. 43*, 1077 (1960).

<sup>2)</sup> S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Experientia 9*, 333 (1953); dieselben Autoren mit O. SCHINDLER, *Helv. 37*, 1163 (1954).

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

<sup>4)</sup> R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv. 39*, 2062 (1956).

<sup>5)</sup> R. NEHER, C. MEYSTRE & A. WETTSTEIN, *Helv. 42*, 132 (1959).

<sup>6)</sup> A. WETTSTEIN, R. NEHER & J. URECH, *Helv. 42*, 956 (1959).

<sup>7)</sup> R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Acta endocrinol. 35* (1960), im Druck.

<sup>8)</sup> R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv. 43*, 623 (1960).

<sup>9)</sup> W. E. BALFOUR, R. S. COMLINE & R. V. SHORT, *Nature 183*, 467 (1959).

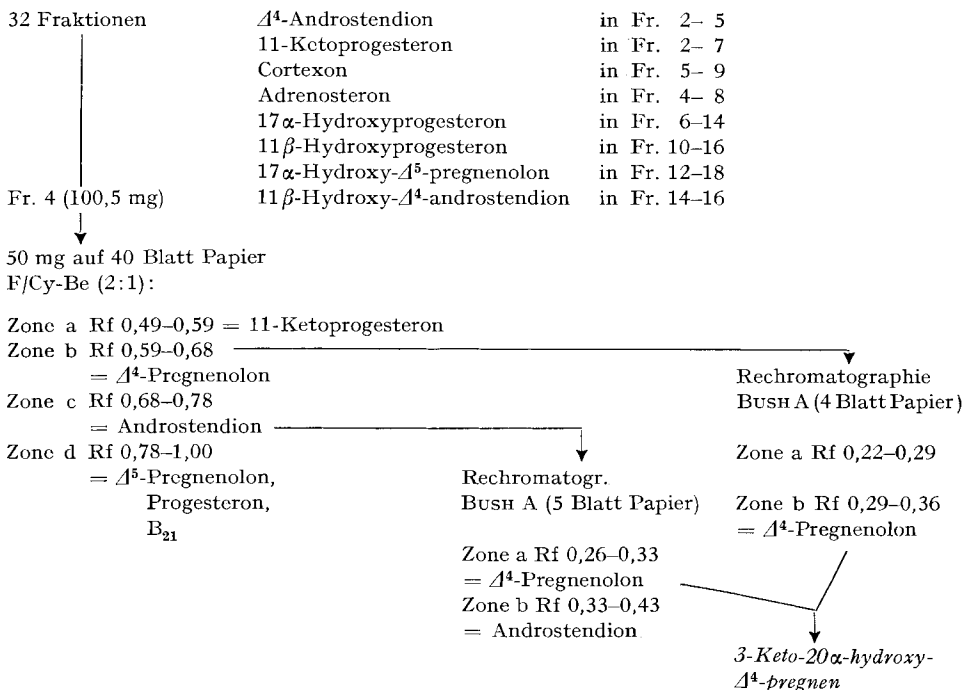
<sup>10)</sup> Vgl. J. ZANDER, T. R. FORBES, A. M. VON MÜNSTERMANN & R. NEHER, *J. clin. Endocrinol. Metabolism 18*, 337 (1958).

2. *3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen* ( $A_{60}$ ). Bei der Isolierung von  $16\alpha$ -Hydroxyprogesteron aus der Charge NN XI<sup>6)</sup> erhielten wir eine neue, intern mit  $A_{60}$  bezeichnete UV.-absorbierende Nebenfraktion aus dem Eluat c des 3. Papierchromatogrammes im System  $BL_1$ <sup>11)</sup>, nach Rechromatographie in F/Be<sup>12)</sup>; sie war mit keinem bekannten Nebennierensteroid identifizierbar. Die reine, kristallisierte Verbindung zeigte die in Tab. 2 angeführten chromatographischen Eigenschaften und

### Schema 1<sup>12)</sup>

*Fraktionierung der Nebennieren-Fractionen B/3+4 aus Diagramm 1 [s. 7]*

Fr. B/3+4 (9,7 g): Rechromatographie an 300 g  $Al_2O_3$  (10% Wassergehalt); Elution mit Petroläther, Benzol, Äther,  $CHCl_3$  und Mischungen davon;



Farbreaktionen, wobei eine nur sehr schwache gelbe Natronlaugefluoreszenz auffiel.  $A_{60}$  enthielt ausser einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketogruppe (IR., UV.) eine leicht und eine nicht oder nur schwer acetylierbare Hydroxygruppe, lieferte mit Perjodsäure 3,17-Diketo- $\Delta^4$ -androsten (PCG)<sup>12)</sup> und mit Chromtrioxyd in Pyridin 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron; letzteres war ausser durch seine  $R_S$ -Werte (s. Tab. 1) besonders wegen seiner abnormen, d. h. nahezu fehlenden gelben Natronlaugefluoreszenz gut im PCG zu erkennen. Es konnte somit kaum ein Zweifel bestehen, dass  $A_{60}$  ein 3-Keto-17 $\alpha$ -20 $\xi$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen darstellen musste.

<sup>11)</sup> S. Schema 3 auf S. 965 in <sup>6)</sup>.

<sup>12)</sup> Für Lösungsmittel-Abkürzungen siehe exp. Teil. PCG = Papierchromatographie, DS = Dünnschichtchromatographie auf Silicagel; Ausführung s. exp. Teil. Bei Identifizierungsschmatogrammen wurden prinzipiell immer mehrere Lösungsmittelsysteme und verschiedene Indikatoren angewandt.

Tabelle 1. *R<sub>S</sub>-Werte von relativ schwach polaren Steroiden* (S: Cortexon bzw. Progesteron = 1,00)<sup>a)</sup>

Substanzen <sup>f)</sup>	P/Cy-Be 1:1	P/T	F/Cy-Be 1:1	F/Be	B <sub>3</sub>	A	UV.	NaOH <sup>b)</sup>	SbCl <sub>3</sub> <sup>b)</sup>
Cortexon . . . . .	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,28	+	gelb	—
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron . . . . .	0,64		0,93	1,01	0,90	0,17	+	— <sup>c)</sup>	—
11 $\beta$ -Hydroxyprogesteron . . . . .	0,52	0,81	0,74	0,95	0,80	0,13	+	gelb	—
11-Ketoprogesteron . . . . .	1,00		1,35		1,15	0,29	+	gelb	—
Progesteron . . . . .	1,50	1,28	1,86		1,70	1,00	+	gelb <sup>d)</sup>	—
3 $\beta$ -Hydroxy-20-keto- $\Delta^5$ -pregnen ( $\Delta^5$ -Pregnenolon) . . . . .		1,04			1,65	0,79	—	—	rötliche <sup>e)</sup>
3 $\beta$ -Hydroxy-20-keto-allopregnan		1,05			1,79	0,90	—	—	—
3-Keto-20 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -pregnen		0,88	1,50		1,25	0,50	+	gelb <sup>d)</sup>	gelb
3-Keto-20 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^4$ -pregnen		0,99	1,59		1,35	0,68	+	gelb <sup>d)</sup>	gelb
3,17-Diketo-11 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^4$ -androsten . . . . .	0,35	0,60	0,35	0,67	0,50		+	gelb	—
3,11,17-Triketo- $\Delta^4$ -androsten (Adrenosteron) . . . . .	1,20	1,07	0,89	1,01	0,80		+	gelb	—
3,17-Diketo- $\Delta^4$ -androsten . . . . .	1,32		1,72		1,45	0,62	+	gelb <sup>d)</sup>	—
3 $\beta$ -Hydroxy-17-keto- $\Delta^5$ -androsten (Androstenolon) . . . . .	0,87	0,84	1,50		0,90		—	—	rötliche <sup>e)</sup>
Testosteron . . . . .	0,50	0,70	1,03	0,96	0,95	0,29	+	gelb	—
<i>epi</i> -Testosteron . . . . .		0,81	1,13		1,07	0,33	+	gelb	rot <sup>e)</sup>
B <sub>22</sub> . . . . .					F/Cy 0,39	0,43	+	gelb <sup>d)</sup>	gelb

a) Lösungsmittelsysteme, Indikatoren und Ausführung s. exp. Teil d) Bedeutend schwächer als normal  
 b) UV.-Fluoreszenzen e) Auch bei Tageslicht  
 c) Praktisch negativ! f) Alle geben eine Farbreaktion mit Dimnitrophenylhydrazin

Tabelle 2. *R<sub>S</sub>-Werte von Nebennierensteroiden, epimeren Verbindungen und weiteren Inhaltsstoffen mittlerer Polarität (S: Corticosteron = 1,00)<sup>a)</sup>*

Substanzen <sup>d)</sup>	P/T	F/Be	F/Be- CHCl <sub>3</sub> 1:1	BL <sub>1</sub>	UV.	Blau- tetrazolium	NaOH	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>b)</sup>	SbCl <sub>3</sub> <sup>b)</sup>
3, 20-Diketo-17 $\alpha$ , 21-dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (REICHSTEIN'S S) . . . . .	0,77		0,98	1,08	+	+	gelb	rotorange	
3, 11, 20-Triketo-21-hydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (KENDALL'S A) . . . . .	2,30		1,36	1,25	+	+	gelb	(blau)	
3, 11-Diketo-20 $\beta$ , 21-dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (REICHSTEIN'S T) . . . . .	0,16		0,47	0,31	+	-	gelb	-	-
3, 20-Diketo-16 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -pregnen . . . . .	1,30	1,90	1,49	1,25	+	-	gelb <sup>e)</sup>	-	-
3-Keto-11 $\beta$ , 18-dihydroxy- $\Delta^4$ -ätiensäurelacton (20 $\rightarrow$ 18) (A <sub>39</sub> = B <sub>3</sub> ) . . . . .	1,08 <sup>e)</sup>	1,17	1,17	1,16	+	-	gelb	-	-
3, 20-Diketo-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (21-Desoxycortisol) . . . . .	0,60	1,04	0,99	0,92	+	-	gelb <sup>c)</sup>	-	-
3, 11-Diketo-17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (B <sub>27</sub> ) . . . . .	0,62	0,97	1,07	0,93	+	-	gelb	schwach blau	blau
3, 11-Diketo-17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (B <sub>33</sub> ) . . . . .	0,58	0,75	0,92	0,81	+	-	gelb	-	blau
3-Keto-17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen . . . . .	1,37	2,15	1,34	1,20	+	-	gelb <sup>c)</sup>	rotorange	gelborange
3-Keto-17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (A <sub>60</sub> ) . . . . .	0,70	1,58	1,32	1,20	+	-	gelb <sup>c)</sup>	rotorange	gelborange
3-Keto-11 $\beta$ , 20 $\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen . . . . .	1,37	2,15	1,34	1,20	+	-	gelb <sup>c)</sup>	rotorange	gelb
3-Keto-11 $\beta$ , 20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (B <sub>6</sub> ) . . . . .	0,70	1,58	1,32	1,20	+	-	gelb	grün	gelbgrün
3-Keto-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -androsten (B <sub>35</sub> ) . . . . .	0,47	1,14	1,04	0,89	+	-	gelb	rötlich	rotorange(auch bei Tageslicht)
11 $\beta$ -Hydroxytestosteron . . . . .	0,37	0,73	0,83	0,73	+	-	gelb	gelb	gelborange
3 $\alpha$ , 11 $\beta$ -Dihydroxy-17-keto-androstan (B <sub>25</sub> ) . . . . .	1,02	2,12	1,40	1,28	-	-	-	[DNB+]	

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Substanzen <sup>d)</sup>	P/T	F/Bc	F/Be-CHCl <sub>3</sub> 1:1	BL <sub>1</sub>	UV.	Blau- tetrazolium	NaOH	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>b)</sup>	SbCl <sub>3</sub> <sup>b)</sup>
A <sub>12</sub> (N-haltig)	1,05		1,15	0,84–1,03 <sup>e)</sup>	+	–	gelb	–	–
A <sub>38</sub>	1,08	1,23	1,13	1,00	+	–	gelb	–	–
A <sub>36</sub>	0,80		0,76	0,88–0,97 <sup>e)</sup>	+	+	gelb	–	–
B <sub>4</sub>	0,45–0,50 <sup>e)</sup>	0,95–1,05 <sup>e)</sup>	0,29–0,35 <sup>e)</sup>	0,90–1,00 <sup>e)</sup>	+	–	gelb	–	–
B <sub>10</sub>	0,41	0,72	0,24	0,70–0,75 <sup>e)</sup>	+	–	gelb	–	–
B <sub>23</sub>	0,33 <sup>e)</sup>	0,68		0,61	+	–	gelb	–	–
B <sub>26</sub>	1,53	1,77	1,31	1,36	–	+	–	–	–
B <sub>28</sub>	0,22	0,87	0,10	1,23	+	–	gelb	–	–
B <sub>30d</sub>	0,21	0,26		0,72	+	–	gelb	–	–
B <sub>34</sub>	0,13	0,34	0,15	0,51	+	–	gelb	gelbgrün	gelborange
B <sub>30</sub>	0,14	1,01	1,02	0,97	–	–	–	–	blau- gelborange
B <sub>31a</sub>	0,55	0,60	0,59	0,76	+	–	gelb <sup>e)</sup>	–	–
B <sub>31b</sub>	0,53	0,58	0,87	0,67	+	–	gelb <sup>e)</sup>	gelbgrün	–
B <sub>31d</sub>	0,48	0,48	0,63	0,76	+	–	gelb	grün	(orange)
B <sub>31e</sub>	0,33	0,37	0,63	0,67	+	–	gelb	grün	grün
B <sub>31f</sub>	1,05	0,93	0,96	0,79	+	–	gelb	orange	rötlich
B <sub>33a</sub>	0,50	0,54	0,83	0,87	+	–	gelb	grün	–
B <sub>33b</sub>	0,64	0,76	0,96	0,77	+	–	gelb	gelbgrün	violett
B <sub>33d</sub>	0,49	0,54	0,80	0,86	+	–	gelb	hellblau	rötlich (Tages- licht violett)

a) Lösungsmittelsysteme, Farbreaktionen und Ausführung s. exp. Teil

b) UV.-Fluoreszenzen

c) Schwächer als normal

d) Alle geben eine positive Farbreaktion mit Dinitrophenylhydrazin (A<sub>39</sub> aber nur sehr schwach!), aber keine mit alkal. m-Dinitrobenzol (DNB)

e) Lange Flecke wegen geringer Löslichkeit

Der Vergleich mit dem  $20\beta$ -Epimeren<sup>13)</sup> erwies jedoch, dass es sich bei  $A_{60}$  um das  $20\alpha$ -Epimere handeln muss. Für letzteres sprach auch der Unterschied in der molekularen Drehung von freier und acetylierter Verbindung<sup>4)</sup>. Es wurde daher aus 3,3-Äthylendioxy- $16\alpha,17$ -oxido- $20$ -keto- $\Delta^5$ -pregnen<sup>14a)</sup> durch  $\text{LiAlH}_4$ -Reduktion und Ketalspaltung synthetisiert. Das dabei in etwa der doppelten Menge entstandene  $20\beta$ -Epimere wurde im präparativen PCG abgetrennt. Der Vergleich von  $A_{60}$  mit unserem synthetischen 3-Keto- $17\alpha$ - $20\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen<sup>14b)</sup> sprach in jeder Hinsicht für Identität. Der Gehalt dieses vermutlich aus  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron stammenden  $20$ -Dihydro-Metaboliten belief sich auf ca. 75 mg pro Tonne Schweine-Nebennieren.

3. *3-Keto- $11\beta,20\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen ( $B_6$ )*. Dieses Steroid erhielten wir in einer Nebenfraktion bei der Isolierung von  $3\beta,16\alpha$ -Dihydroxy- $20$ -keto-allopregnan aus der Nebennieren-Charge NN XI<sup>3)</sup>. Das nach zweifacher Chromatographie von A II aus der mit dem Farbstoff  $F_5$  wandernden Zone d<sup>15)</sup> erhaltene Eluat enthielt neben etwas  $17\alpha$ -Hydroxycortexon noch den UV.-absorbierenden, aber nicht reduzierenden Stoff  $B_6$ . Nach Rechromatographie liess er sich rein abtrennen und kristallisieren. Die chromatographischen und physikalischen Eigenschaften (s. Tab. 2) sprachen für ein Steroid, welches allerdings mit keinem der bekannten Nebennierensteroiden identifizierbar war. Die Acetylierung führte offensichtlich zu einer Monohydroxy-mono-acetoxy-Verbindung. Gegen Perjodsäure verhielt sich  $B_6$  indifferent, mit Chromtrioxyd in Pyridin war es aber zu  $11$ -Ketoprogesteron (PCG Tab. 1) oxydierbar. Dieses Ergebnis sprach für ein 3-Keto- $11\beta,20\xi$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen.

Die beiden Epimeren sind unseres Wissens bisher nicht beschrieben worden. Wir versuchten sie daher ausgehend von 3,3-Äthylendioxy- $11\alpha$ -acetoxy- $20\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -pregnen<sup>16)</sup> herzustellen. Alkalische Verseifung und Chromsäureoxydation führte zu dem  $11,20$ -Diketon, das durch  $\text{LiAlH}_4$ -Reduktion und Ketalspaltung ein Gemisch der  $20\alpha$ - (ca. 25%) und  $20\beta$ - (ca. 75%) Epimeren von 3-Keto- $11\beta,20$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen lieferte. Durch präparative PCG waren die reinen Verbindungen leicht erhältlich. In der Folge erwies sich das u. a. durch den molekularen Drehungsbeitrag charakterisierte synthetische  $20\alpha$ -Epimere als identisch mit dem isolierten  $B_6$ . Nach analytischer Schätzung betrug der Gehalt insgesamt ca. 15 mg pro Tonne Schweine-nebennieren-Charge NN XI. Es handelt sich offensichtlich um einen  $20$ -Dihydro-Metaboliten von  $11\beta$ -Hydroxyprogesteron. Die Mengenrelation von  $A_{60}$  zu  $B_6$  stimmte recht gut mit derjenigen ihrer Stammsubstanzen, dem  $17\alpha$ - und  $11\beta$ -Hydroxyprogesteron überein.

4. *3-Keto- $11\beta,17\alpha,20\beta$ -trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen ( $B_7$ )*. Anschliessend an die früher erfolgte Isolierung von  $3\beta,16\alpha$ -Dihydroxy- $20$ -keto-allopregnan aus der Nebennieren-Charge NN XI (2 Tonnen)<sup>3)</sup> unternahmen wir es, das in den höheren Fraktionen enthaltene Aldosteron ebenfalls zu gewinnen. Als geeignet erwiesen sich die Unter-

<sup>13)</sup> J. ROMO, M. ROMERO, C. DJERASSI & G. ROSENKRANZ, J. Amer. chem. Soc. 73, 1528 (1951). – Für die freundliche Überlassung einer Probe von 3-Keto- $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen danken wir Herrn Prof. DJERASSI bestens.

<sup>14)</sup> a) Dieses Ausgangsmaterial hat uns Herr Dr. UEBERWASSER zur Verfügung gestellt. – b) Dieses  $20\alpha$ -Epimere ist nach einer Literaturangabe<sup>28a)</sup> bereits früher von T. F. GALLAGHER & I. SALAMON synthetisiert worden.

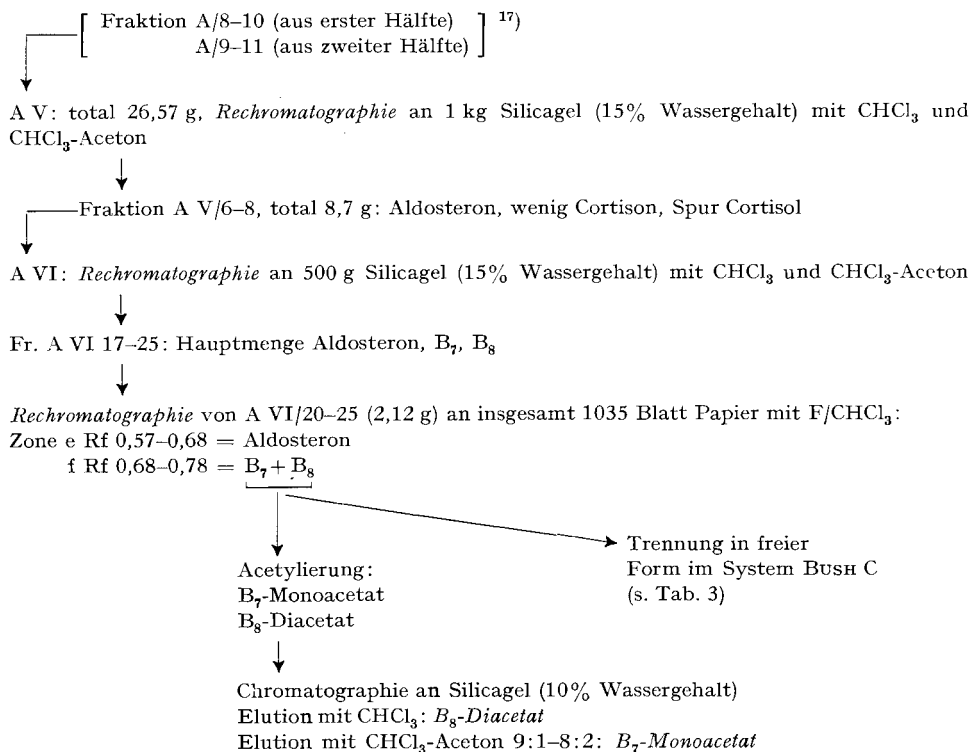
<sup>15)</sup> Siehe Schema 3 auf S. 1673 in <sup>3)</sup>, 2. Chromatogramm links unten.

<sup>16)</sup> Dieses Zwischenprodukt verdanken wir Herrn Dr. J. KALVODA.

fraktionen 8–10 bzw. 9–11 der Fraktion A aus NN XI<sup>17</sup>). Im Laufe der weiteren Auftrennung an 2 Silicagelsäulen nach Schema 2 fiel eine vor Aldosteron wandernde UV.-absorbierende Zone auf, die sich im System BUSH C weiterhin in 2 Komponenten ( $B_7 + B_8$ ) aufspalten liess; diese waren nicht mit bekannten Nebennierensteroiden identifizierbar (s. Tab. 3). Da die einwandfreie Trennung beider in freier Form papierchromatographisch etwas mühsam war, wurde nach entsprechenden Vorversuchen der Hauptteil acetyliert und, da sich ein Mono- und ein Di-acetat bildete, in dieser Form leicht an Silicagel getrennt.

### Schema 2<sup>12)</sup>

*Isolierung von  $B_7$  und  $B_8$*



$B_7$  war nicht-reduzierend, aber UV.-absorbierend, gab die für  $\Delta^4$ -Ketosteroide typische gelbe Natronlaugefluoreszenz<sup>18)</sup> und verhielt sich im PCG ähnlich wie ein 3-Keto- $\Delta^4$ -pregnen-triol oder -diolon (vgl. Tab. 3; dort auch weitere Farbreaktionen sowie vergleichsweise  $R_f$ -Werte ähnlich laufender Steroide). Aus den relativen Laufgeschwindigkeiten im PCG und aus dem IR.-Spektrum liess sich auf die Bildung eines Monoacetates schliessen, das übrigens nicht besonders leicht verseifbar war. Das IR.-Spektrum der freien Verbindung liess ausser einem  $\Delta^4$ -3-Keton keine weitere Carbonylfunktion erkennen. Der Abbau mit Perjodsäure von  $B_7$ , nicht aber seines

<sup>17)</sup> Siehe Tab. 2 auf S. 1687 in <sup>3)</sup>; Aldosteronfraktionen wurden dort mit e bezeichnet.

<sup>18)</sup> I. E. BUSH, *Biochem. J.* 50, 370 (1952).

Tabelle 3.  $R_S$ -Werte von relativ hochpolaren Nebenmensteroiden und weiteren Inhaltsstoffen (S: Cortisol = 1,00)<sup>a)</sup>

Substanzen <sup>c)</sup>	P/I	F/Be	F/CHCl <sub>3</sub>	F/ BBW	Besch C Cy-Di I	UV.	Blau- tetraz.	NaOH <sup>b)</sup>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>b)</sup>	SbCl <sub>3</sub> <sup>b)</sup>
Aldosteron <sup>f)</sup>	2,55	1,20	2,25	0,40	0,97	1,03	+	gelb	—	—
17-iso-Aldosteron (C <sub>2</sub> )	1,83	1,26	2,22	0,41	0,92	0,73	+	gelb	—	—
Cortison	2,51	1,95	2,39	0,95	1,38	1,08	+	gelb	blau	—
3,11-Diketo-20 $\beta$ ,21-dihydroxy- A <sup>4</sup> -pregnen (Reichstein's T)	2,41		2,94		1,39		+	gelb	—	—
3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -trihydroxy- A <sup>4</sup> -pregnen (B <sub>7</sub> )	~3,06 <sup>e)</sup>	5,05 <sup>e)</sup>	2,48	1,26	1,62		+	gelb	rötlich	rotorange <sup>d)</sup>
3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-trihydroxy- A <sup>4</sup> -pregnen (B <sub>8</sub> = C <sub>1</sub> )	~2,30 <sup>e)</sup>	2,34	2,48	0,88	1,35		+	gelb	gelb	gelb <sup>d)</sup>
3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy- A <sup>4</sup> -pregnen	~3,10 <sup>e)</sup>	3,33	2,66	1,02	1,53		+	gelb	(gelb)	gelb
A <sub>15</sub>	1,58		2,08	0,97	1,12		+	gelb	(gelbgrün)	blau
A <sub>43</sub> (N-haltig)	~1,55 <sup>e)</sup>		0,39		2,03		+	gelb	—	—
B <sub>1</sub> (N-haltig)	0,65		1,76	0,84	0,82		+	gelb	—	(blau?)
B <sub>3</sub>	1,65		1,30	0,59	1,95		+	gelb	—	—
B <sub>10</sub>	4,20		1,92	0,32	2,14		+	gelb	—	—
B <sub>11</sub>	~2,20		1,23	0,53	1,89		+	gelb	—	(blau)
B <sub>23</sub>	~4,30 <sup>e)</sup>	3,10	2,98		2,02		+	gelb	—	—
B <sub>28</sub>	3,16	1,31			1,03		+	gelb	—	—
B <sub>29a</sub>	0,71	1,26	1,86		0,77		+	gelb	blau	hellblau
B <sub>29b</sub>	0,64	1,12	1,66		0,76		+	gelb	hellblau	(blau)
B <sub>29c</sub>	1,79	2,48	2,90		1,53		+	gelb	(orange)	(grün)
B <sub>29d</sub>	3,06	3,79					+	gelb	gelbgrün	gelborange
B <sub>34</sub>	1,90	5,05					+	—	—	blau-gelb- orange
B <sub>30</sub>	2,41	14,5!	3,09		2,01		—	—	—	—

a) Lösungsmittelsysteme, Indikatoren und Ausführung s. exp. Teil

b) UV.-Fluoreszenzen

c) Alle negativ mit Dinitrobenzol und positiv mit Dinitrophenylhydrazin (B<sub>1</sub> nur schwach)

d) Tageslicht: s. exp. Teil!

e) läuft schlecht in diesem System

f) Weitere 18-oxygenierte Steroide s. Tab. 5a und 5b



Monoacetates, führte zu 3,17-Diketo-11 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^4$ -androsten. Dieses Ergebnis sprach für das Vorliegen eines 3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\xi$ -trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnens.

Von den beiden 20-Epimeren, die in der Literatur bereits beschrieben sind<sup>19)</sup>, stimmten die Smp. des 20 $\beta$ -Isomeren und seines Acetates gut mit denjenigen von B<sub>7</sub> und B<sub>7</sub>-Acetat überein. Der Vergleich mit authentischem Material<sup>20)</sup> nach IR.-Spektrum, Misch-Smp. und PCG bewies in der Tat die Identität von B<sub>7</sub> mit 3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -20 $\beta$ -trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen; sein Gehalt in den untersuchten Fraktionen belief sich auf insgesamt 70 mg. Nach analytischer Schätzung dürfte die Gesamtmenge dieses neuen 20-Dihydro-Metaboliten von 21-Desoxycortisol ca. 50 mg pro Tonne Nebennieren ausmachen. Eine solche Struktur wurde bereits von DE COURCEY *et al.*<sup>21)</sup> für ihren Urin-Metaboliten X<sub>6</sub> diskutiert.

### Schema 3<sup>12)</sup>

Auftrennung der Fraktion 9 (3,432 g) von NN XI/AI<sup>22)</sup>

Fraktion AI/9 (3,432 g; Corticosteron + 17-Hydroxycortexon + x)

↓  
→ Kristallisat  
↓  
Mutterlauge (2,976 g)

1. Präparative PCG auf 300 Blatt WHATMAN Nr. 1 in F/Be-CHCl<sub>3</sub> (1:1) (Chromatoblock)

Zone a	Rf 0,0	-0,16	
b	0,16	-0,24	
c	0,24	-0,30	
d	0,30	-0,57	
e	0,57	-0,74	→ Corticosteron + 17 $\alpha$ -Hydroxy-
f	0,74	-0,85	cortexon + x (940 mg)
g	0,85	-1,00	

↓

2. Präparative PCG auf 160 Blatt in P/T im Durchlauf, bis Farbstoff F<sub>5</sub> Rf 0,5 erreichte

Zone a	Rf 0,0	-0,055	
b	0,055	-0,13	→ B <sub>30</sub> + Ätiensäure
c <sub>1</sub>	0,13	-0,20	B <sub>31</sub> , B <sub>31a,b</sub>
c <sub>2</sub>	0,20	-0,28	B <sub>32</sub> , B <sub>31d,e,f</sub>
d	0,28	-0,37	B <sub>32</sub> + B <sub>35</sub>
e	0,37	-0,50	B <sub>27</sub> + B <sub>33</sub>
f	0,50	-0,75	Corticosteron
g	0,75	-1,00	
h	Durchlauf		

→ Krist. B<sub>32</sub>  
↓  
Mutterlauge

3. Präparative PCG auf 60 Blatt in F/Be im Durchlauf, bis Farbstoff F<sub>5</sub> Rf 0,8 erreichte

Elution der Zone Rf 0,44–0,54 → 28,3 mg Krist. aus Aceton-Äther  
B<sub>35</sub> Smp. 214–216°

<sup>19)</sup> G. I. POOS, J. Amer. chem. Soc. 77, 4932 (1955).

<sup>20)</sup> Herrn Dr. L. SARETT danken wir bestens für eine Probe von 3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen. Es wurde in freier (Smp. 147°) und acetylierter Form (Smp. 247–249°) zum Vergleich herangezogen.

<sup>21)</sup> C. DE COURCEY, I. E. BUSH, C. H. GRAY & J. B. LUNNON, J. Endocrinol. 9, 401 (1953).

<sup>22)</sup> Siehe Tab. 3 auf S. 1688 in <sup>3)</sup>.

5. *3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen* ( $B_8$ ). Die Isolierung erfolgte gemeinsam mit  $B_7$  wie oben angegeben. Im Unterschied zu letzterem lieferte  $B_8$  ein Diacetat und bei der Perjodsäureoxydation 3,17-Diketo- $\Delta^4$ -androsten. Das IR.-Spektrum von  $B_8$  zeigte in der Carbonylregion ebenfalls nur ein  $\Delta^4$ -3-Keton an. Diese und die in Tab. 3 angeführten Eigenschaften (relative Polarität, Farbreaktionen) machten die Struktur eines 3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\xi$ ,21-trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnens sehr wahrscheinlich. Beide Epimere davon sind in der Literatur ebenfalls beschrieben<sup>23</sup>), und von diesen stimmte nach Schmelzpunktangaben das 20 $\alpha$ -Epimere mit  $B_8$  überein. Der auf übliche Weise geführte direkte Vergleich von  $B_8$ -Diacetat mit dem synthetisch<sup>23</sup>) hergestellten 3-Keto-17 $\alpha$ -hydroxy-20 $\alpha$ ,21-diacetoxy- $\Delta^4$ -pregnen bestätigte die vermutete Identität.

Die Gesamtmenge dieses 20-Dihydro-Metaboliten von Substanz S betrug wie diejenige von  $B_7$  ca. 50 mg pro Tonne Schweine-Nebennieren. Aus anderen Aldosteron-Mutterlaugen wurde auf analoge Art neben wenig 17-*iso*-Aldosteron ebenfalls Substanz  $B_8$  in kristalliner Form isoliert, die früher<sup>8</sup>) als  $C_1$  bezeichnet worden ist.

6. *3,11-Diketo-17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen* ( $B_{27}$ ). Wir gewannen diese Verbindung gemeinsam mit  $B_{33}$  nach der in Schema 3 dargestellten Methode. Nach Rechromatographie der dort angegebenen Zone e in F/Be im Durchlaufverfahren trennte sich die etwas schwächer polare Substanz  $B_{27}$  vom langsamer wandernden  $B_{33}$ . Beide wurden in kristallisierter Form erhalten.  $B_{27}$  liess sich einerseits acetylieren und andererseits mit Perjodsäure zu Adrenosteron oxydieren. Aus dem IR.-Spektrum war das Vorhandensein von Hydroxylgruppen sowie  $\alpha,\beta$ -ungesättigter und gesättigter Ketogruppen ersichtlich. Diese und die papierchromatographischen Eigenschaften (s. Tab. 2) liessen in  $B_{27}$  ein 3,11-Diketo-17 $\alpha$ ,20 $\xi$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen vermuten.

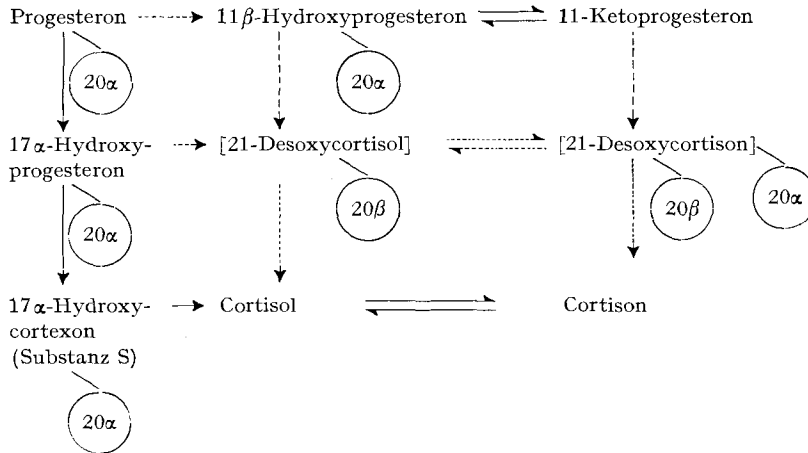
Um die Struktur zu beweisen, stellten wir das 20 $\beta$ -Epimere her, indem das 3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxy-20 $\beta$ -acetoxy- $\Delta^4$ -pregnen, das wir früher aus Nebennieren gewonnen hatten (s. oben Abschnitt 4, Substanz  $B_7$ ), mit  $\text{CrO}_3$  zum 11-Keto-Derivat oxydiert und hierauf verseift wurde; nach chromatographischer Reinigung erhielten wir ein kristallisiertes Produkt, das nach den üblichen Kriterien tatsächlich mit  $B_{27}$  identisch war<sup>24</sup>). Der Gehalt pro Tonne Nebennieren betrug ca. 5 mg.

7. *3,11-Diketo-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen* ( $B_{33}$ ). Diese zusammen mit  $B_{27}$  isolierte Substanz verhielt sich chemisch genau gleich wie jene. Auch das IR.-Spektrum war sehr ähnlich, wie es meist bei 20-Epimeren der Fall ist. Es durfte daher angenommen werden, dass  $B_{33}$  das 20 $\alpha$ -Epimere von  $B_{27}$  darstellt, womit auch das chromatographische Verhalten übereinstimmte. Der Gehalt des 20 $\alpha$ -Epimeren war mindestens doppelt so hoch wie derjenige der 20 $\beta$ -Verbindung.

Bei diesen 7 Steroiden handelt es sich offensichtlich um durch 20-Keto-Reduktasen gebildete Metaboliten wichtiger Vorstufen von Cortisol, die sich folgendermassen in dessen *Biosynthese-Schema* einfügen lassen:

<sup>23</sup>) P. L. JULIAN, E. W. MEYER, W. J. KARPEL & W. COLE, J. Amer. chem. Soc. 73, 1982 (1951).

<sup>24</sup>) Auf Grund des Smp. dürfte es sich auch bei dem im US. Patent 2508471 (1950) beschriebenen 3,11-Diketo-17 $\alpha$ ,20-dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen-hydrat um das 20 $\beta$ -Epimere handeln.



Hierbei sind, mit Ausnahme der 2 eingeklammerten, alle erwähnten Steroide aus Nebennieren isoliert worden. Der Index  $20\alpha$  bzw.  $20\beta$  zeigt an, welche der epimeren 20-Dihydro-Metaboliten der einzelnen Zwischenprodukte gefasst werden konnten. Entsprechende Dihydro-Derivate von Cortisol ( $20\beta$ ) und Cortison ( $20\alpha, 20\beta$ ) wurden schon früher<sup>4) 25)</sup> aus Nebennieren erhalten. Ob die entsprechenden 20-Keto-Reduktasen in den Nebennieren selbst vorkommen, bleibt vorläufig offen. Bisher konnte man solche Enzyme tierischer Herkunft besonders in Leber<sup>26)</sup>, ferner in Niere<sup>27)</sup>, Testes<sup>28a)</sup>, Ovar<sup>28b)</sup> und Fibroblasten<sup>29)</sup> lokalisieren. Wenigstens in Testes und Ovar scheint es sich um eine Gleichgewichtsreaktion mit den 20-Keto-Verbindungen zu handeln.

Bei den isolierten Corticosteroid-Metaboliten fällt auf, dass die  $20\alpha$ -Epimeren in Gegenwart einer Sauerstofffunktion in 11 *oder* 17 dominieren; hingegen scheint die Bildung der  $20\beta$ -Epimeren dann begünstigt zu sein, wenn *gleichzeitig* 11- und 17-Stellungen oxygeniert sind. Wie angegeben, konnten 21-Desoxycortisol und 21-Desoxycortison bisher nicht mit Sicherheit in Nebennieren nachgewiesen werden, wohl aber ersteres in Nebennieren-Venenblut<sup>30)</sup>. Die Isolierung der entsprechenden 20-Dihydro-Metaboliten, sowie diejenige von 11β-Hydroxy- und 11-Keto-progesteron<sup>8)</sup> sprechen aber dafür, dass die 21-Desoxycortisol-Variante als alternativer biosynthetischer Weg zum Cortisol im Nebennierengewebe beschritten werden kann<sup>31)</sup>.

<sup>25)</sup> T. REICHSTEIN & J. VON EUW, *Helv.* 24, 247 E (1941).

<sup>26)</sup> Vgl. z. B. R. I. DORFMAN, *Ann. Rev. Biochemistry* 26, p. 544 (1957); R. O. RECKNAGEL, *J. biol. Chemistry* 227, 273 (1957).

<sup>27)</sup> a) C. DE COURCEY, *J. biol. Chemistry* 229, 935 (1957); b) V. B. MAHESH & F. ULRICH, *ibid.* 235, 356 (1960).

<sup>28)</sup> a) W. S. LYNN & R. H. BROWN, *J. biol. Chemistry* 232, 1015 (1958). b) Vgl. z. B. W. WIEST in *Endocrinology of reproduction*, CHS. W. LLOYD, ed., Academic Press, New York 1959, p. 278.

<sup>29)</sup> M. L. SWEAT, B. I. GROSSER, D. L. BERLINER, H. E. SWIM, C. J. NABORS & T. F. DOUGHERTY, *Biochim. Biophys. Acta* 28, 591 (1958); D. L. BERLINER & T. F. DOUGHERTY, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 98, 3 (1958).

<sup>30)</sup> G. PINCUS in E. MOSETTIG, Ed., *Proc. IV. Internat. Congress of Biochemistry*, Vol. 4, 61 (1959).

<sup>31)</sup> Vgl. J. EICHHORN & O. HECHTER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 97, 614 (1958).

8. *3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -androsten* ( $B_{35}$ ). Auf dem nach Schema 3 ersichtlichen Weg der mehrfachen Verteilungschromatographie erzielten wir eine völlige Auftrennung der Mutterlaugen einer Corticosteron-Nebenfraktion der Schweine-nebennieren-Charge XI in zahlreiche Komponenten. Davon liess sich u. a.  $B_{35}$  kristallisiert erhalten; der Gehalt pro Tonne Nebenniere betrug allerdings nur 4,75 mg. Das Verhalten bei der Chromatographie, gegenüber Farbreaktionen (s. Tab. 2) und im IR.-Spektrum liess das Vorliegen eines  $C_{19}$ - oder  $C_{21}$ - $\Delta^4$ -3-Ketons mit 2 Hydroxylgruppen vermuten, von welchen nur eine acetylierbar war. Während  $B_{35}$  von Perjod-säure nicht angegriffen wurde, lieferte es bei der Chromtrioxydoxydation in Pyridin zwei Produkte: eines von ähnlicher Polarität wie 11-Ketotestosteron, das andere mit den Eigenschaften des Adrenosterons. Es handelt sich bei  $B_{35}$  jedoch nicht um 11 $\beta$ -Hydroxytestosteron, welches etwas polarer ist.

Die Antimontrichlorid-Reaktion wies auf Grund einer früheren Beobachtung mit 3-Keto-17 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -androsten (*epi*-Testosteron s. Tab. 1) auf die Möglichkeit hin, dass auch im  $B_{35}$  eine 17 $\alpha$ -Hydroxyverbindung vorliegen könnte (rote bis rot-violette Farbreaktion in Gegenwart einer  $\Delta^4$ -3-Ketogruppe, selbst im Tageslicht). 3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -androsten ist unseres Wissens jedoch nicht in der Literatur beschrieben. Wir konnten es auf einfache Weise durch mikrobiologische 11 $\beta$ -Hydroxylierung<sup>32)</sup> von *epi*-Testosteron herstellen und nach den üblichen Methoden mit  $B_{35}$  identifizieren. Es stellt somit das erste 17 $\alpha$ -Hydroxy- $C_{19}$ -steroid aus Nebennieren dar. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass wir hingegen weder 11 $\beta$ -Hydroxy- noch 11-Keto-testosteron oder auch nur Testosteron bzw. *epi*-Testosteron in unseren Nebennierenfraktionen aufspüren konnten. Der Nachweis von Testosteron in Nebennierengewebe gelang bisher nur in einem Fall von Nebennieren-rinden-Tumor<sup>33)</sup>.

9. *3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Dihydroxy-17-keto-androstan* ( $B_{25}$ , 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron). Eine weitere Substanz  $B_{25}$  isolierten wir in geringer Menge als Nebenprodukt von  $A_{60}$  (s. oben) aus der knapp vor letzterem wandernden Zone des F/Be-Chromatogramms. Papierchromatographische Analyse, Farbreaktionen und Misch-Smp. erwiesen die Identität von  $B_{25}$  mit 11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron. Dessen Gehalt in unserer Nebennierencharge NN XI betrug nur 2 mg/Tonne. In grösserer Menge wurde dieses schwach androgene Steroid bisher im Harn von Patienten mit Nebennieren-Tumoren und -Hyperplasie gefunden<sup>34)</sup>.

10. *Isolierung und Charakterisierung weiterer, unidentifizierter Inhaltsstoffe* ( $A_{12}$ ,  $A_{15}$ ,  $A_{38}$ ,  $A_{43}$ ,  $A_{46}$ ,  $B_1$ ,  $B_3$ ,  $B_4$ ,  $B_{10}$ ,  $B_{11}$ ,  $B_{21}$ ,  $B_{22}$ ,  $B_{23}$ ,  $B_{26}$ ,  $B_{28}$ ,  $B_{29}$ ,  $B_{30}$ ,  $B_{31}$ ,  $B_{32}$ ,  $B_{34}$ ). Im Verlauf der früher bzw. oben beschriebenen Isolierungen stiessen wir noch auf verschiedene andere Substanzen in sehr geringer Menge, von welchen auf Grund der untersuchten Eigenschaften angenommen werden kann, dass sie teilweise Steroide oder steroidartige Verbindungen darstellen. Wir möchten sie deshalb bei dieser Gelegenheit so weit als möglich charakterisieren, da eine Identifizierung aus Substanzmangel nicht möglich war. Die papierchromatographischen Eigenschaften der verschiedenen A- und B-Stoffe aus Nebennieren sind aus den Tabellen 1–3 ersichtlich. Bei den meisten handelt es sich um UV.-absorbierende Verbindungen mit gelber

<sup>32)</sup> Herrn Dr. J. URECH danken wir für die Angaben der Kulturbedingungen.

<sup>33)</sup> R. ANLIKER, O. ROHR & M. MARTI, *Helv.* **39**, 1100 (1956).

<sup>34)</sup> H. L. MASON, *J. biol. Chemistry* **158**, 719 (1945).

Natronlaugefluoreszenz; einige erwiesen sich als stickstoffhaltig. Weitere physikalische und chemische Eigenschaften sind in Tab. 4 zusammengestellt. Die Isolierung erfolgte jeweils auf sehr ähnliche Weise wie diejenige der identifizierten Steroide; Beispiele davon befinden sich in Schema 1 und 3.

$A_{12}$ : Isolierung aus Schweinenebnieren, Charge NN VIII. Möglicherweise handelt es sich um ein in der Seitenkette N-haltiges  $\Delta^4$ -3-Ketosteroid<sup>35</sup>).

$A_{15}$ : Isolierung aus Aldosteron-Mutterlaugen von NN VIII als etwas schwächer polare Nebenfraktion von 11-Dehydro-C<sup>36</sup>). Möglicherweise handelt es sich um ein 16,20-Dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen-3,11-dion.

$A_{33}$ : Isolierung aus NN VIII. Die biologische Prüfung ergab eine gewisse Reduktion der Na-, K- und Wasser-Ausscheidung.

$A_{43}$ : Isolierung aus NN VIII.

$A_{46}$ : Isolierung aus NN VIII;  $A_{46}$  scheint neben einer  $\Delta^4$ -3-Ketogruppe eine gesättigte Keto-Gruppe und eine Fünfring-Laktongruppe zu enthalten. Es liess sich aber trotz der Anwesenheit einer reduzierenden Gruppe unter den üblichen Bedingungen nicht mit Perjodsäure oxydieren; es ist nicht identisch mit verschiedenen Laktonen der Aldosteronreihe.

$B_1$ : Isolierung aus den vereinigten Corticosteron-Mutterlaugen verschiedener Schweinenebnieren-Chargen nach erster Silicagelchromatographie, insbesondere von NN XII<sup>17</sup>). Die Abtrennung von  $B_1$  von restlichem Corticosteron gelang nach zweimaliger Chromatographie in F/Be-CHCl<sub>3</sub> (1:1). Es könnte sich um ein Amidgruppen-haltiges  $\Delta^4$ -3-Ketosteroid handeln<sup>35</sup>).

$B_3$ : Isolierung wie bei  $B_1$  beschrieben aus Corticosteron-Mutterlaugen; N-frei.

$B_4$ : Isolierung aus den Mutterlaugen von 17-Hydroxycortexon aus Schweinenebnieren (Charge NN XII<sup>17</sup>) durch Rechromatographie in F/Be-CHCl<sub>3</sub> (1:1).  $B_4$  wanderte praktisch in allen Lösungsmittelsystemen schlecht (langgezogene Flecke) und verhielt sich in F/BBW im Gegensatz zu anderen Systemen ganz erstaunlich polar. Die Identität des nach Oxydation mit Perjodsäure erhaltenen Abbauproduktes mit 3,11-Diketo- $\Delta^4$ -ätiensäure wurde über den Methyl-ester mittels PCG, DS und IR.-Spektrum sichergestellt. Die übrigen Eigenschaften sprechen für eine besondere Struktur des vermutlich am C-Atom 17 befindlichen Restes.

$B_{10}$ : Isolierung aus den Corticosteron-Mutterlaugen von Schweinenebnieren (NN XII) nach Rechromatographie in F/Be-CHCl<sub>3</sub> (1:1).

$B_{11}$ : Isolierung wie bei  $B_{10}$  angegeben, nach zusätzlicher Rechromatographie in F/CHCl<sub>3</sub>.

$B_{21}$ : Schwach polare Verbindung, welche bei der Isolierung von  $\Delta^5$ -Pregnenolon als Nebenfraktion anfiel (s. Schema 1). Chromatographisch, sowohl bei PCG als auch DS, wanderte es zwischen Cholesterin und  $\Delta^5$ -Pregnenolon, im System BUSH A praktisch gleich wie Progesteron und sehr ähnlich wie z. B. 7 $\beta$ -Hydroxycholesterin. Es gab eine violetttrötliche Farbreaktion mit SbCl<sub>3</sub>, liess sich aber mit Digitonin nicht fällen (Abtrennung von  $\Delta^5$ -Pregnenolon) und bildete auch kein Hydrazon mit GIRARD-Reagens T.

$B_{22}$ : Isolierung aus Schweinenebnieren (NN XI) als Nebenprodukt von 3-Keto-20 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -pregnen; x-Ketoprogesteron?

$B_{23}$ : Isolierung aus Corticosteron-Mutterlaugen der Charge NN XI als Nebenprodukt von  $A_{59}$  usw.; ähnlich wie  $B_{10}$ .

$B_{26}$ : Isolierung wie  $B_{23}$ ; trotz Reduktionsvermögen beständig gegen Perjodsäure; chromatographisch sehr ähnlich wie 3,20-Diketo-17 $\alpha$ ,21-dihydroxy-pregnan.

$B_{28}$ ,  $B_{29a}$ ,  $B_{29b}$ ,  $B_{29c}$ ,  $B_{29d}$ ,  $B_{34}$ : Isolierung aus Corticosteron-Mutterlaugen von Schweinenebnieren (NN XI); es handelt sich um eine Gruppe von Substanzen ( $\Delta^4$ -3-Ketosteroide?), welche sich bereits bei der Papierchromatographie in den meisten Systemen zersetzten bzw. gegenseitig umwandelten, wobei  $B_{34}$  und besonders  $B_{29a}$  die relativ stabilsten Produkte darstellten. Sie liessen sich nicht mit einigen der labilen 18-Hydroxyverbindungen identifizieren (s. Tab. 5a).

$B_{30}$ : Isolierung aus Schweinenebnieren, wie in Schema 3 angedeutet, in einer Ausbeute von ca. 5 mg/Tonne; analysierte auf C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>. Die Mutterlauge enthielt geringe Mengen von 3-Keto-11 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^4$ -ätiensäure.

<sup>35</sup>) Vgl. hierzu z. B. K. D. VOIGT & W. SCHROEDER, Acta endocrinol. 27, 343 (1956).

<sup>36</sup>) J. VON EUW, C. MEYSTRE, R. NEHER, T. REICHSTEIN & A. WETTSTEIN, Helv. 47, 1516 (1958).

Tabelle 4. Charakterisierung verschiedener unidentifizierter Stoffe aus Nebennieren (vgl. auch Tab. 1-3)

Substanzen	Smp.	Spektren	Verhalten gegen		Gegenwart von N S P
			Acetanhydrid in Pyridin	Oxydationsmittel	
A <sub>12</sub>	258-262° (Blättchen)				
A <sub>15</sub>	239-241° (Nadeln)	IR. (KBr): OH möglich; 5,85 $\mu$ , 6,00 $\mu$ , 6,15 $\mu$	vermutlich 2 Acetoxygruppen (IR., PCG), keine OH-Gruppe mehr (IR.)	beständig gegen HJO <sub>4</sub>	0 0 0
A <sub>38</sub>	310° (Zers.) (Nadeln)	IR. (KBr): OH möglich; 5,83 $\mu$ , 6,00 $\mu$ , 6,16 $\mu$			0 0 0
A <sub>43</sub>	Rohkrist.				+ $\pm$ 0
A <sub>46</sub>	205-215° (Zers.) (Rosetten)	IR. (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ): 2,72 $\mu$ , 5,65 $\mu$ , 5,85 $\mu$ , 5,92 $\mu$ , 6,16 $\mu$		beständig gegen HJO <sub>4</sub>	
B <sub>1</sub>	230-234°/ 255° (Zers.)	IR. (KBr): OH möglich; 5,88 $\mu$ , 6,01 $\mu$ , 6,08 $\mu$ (breite Bande) UV.: $\lambda_{\max}$ 241 m $\mu$ (E <sub>1</sub> = 450)	nur schwer acetylierbar zu 2 schwächer polaren Verbindungen	beständig gegen HJO <sub>4</sub>	+ 0 0
B <sub>3</sub>	253-265° (Zers.)	IR. (KBr): 5,7 $\mu$ , 6,01 $\mu$ , 6,19 $\mu$	nicht acetylierbar	oxydierbar m. HJO <sub>4</sub> zu krist. Säure; Methyl ester vermutlich identisch mit 3-Keto-11 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^4$ -ätiensäure-methylester	0 0 0
B <sub>4</sub>	253-263° (Zers. ab 234°)	IR. (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ): 2,85 $\mu$ , 5,71 $\mu$ , 5,84 $\mu$ , 6,07 $\mu$ , 6,16 $\mu$ UV.: $\lambda_{\max}$ 238 m $\mu$ (E <sub>1</sub> = 307,8), 300 m $\mu$ (E <sub>1</sub> = 29,1)	nicht acetylierbar	oxydierbar mit HJO <sub>4</sub> zu 3,11-Diketo- $\Delta^4$ -ätiensäure (IR.)	0 0 0
B <sub>10</sub>	amorph				
B <sub>11</sub>	amorph				
B <sub>21</sub>	amorph		acetylierbar		

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Substanzen	Smp.	Spektren	Verhalten gegen		Gegenwart von N S P
			Acetanhydrid in Pyridin	Oxydationsmittel	
B <sub>22</sub>	242-250° (Zers.)				0 0
B <sub>23</sub>	amorph		nicht acetylierbar	oxydierbar mit CrO <sub>3</sub>	
B <sub>26</sub>	amorph			beständig gegen HJO <sub>4</sub>	
B <sub>26</sub> B <sub>26a</sub>	amorph 225-234°	IR. (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ): 2,75 $\mu$ , 2,83 $\mu$ , 2,93 $\mu$ , 5,98 $\mu$ , 6,17 $\mu$		} liefern nach Chromsäure- oxydation keine $\gamma$ -Lacton- gruppenhaltigen Verbindungen	
B <sub>26b</sub>	amorph				
B <sub>26c</sub>	amorph				
B <sub>26d</sub>	amorph				
B <sub>24</sub>	amorph	IR. (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ): 2,75 $\mu$ , 2,86 $\mu$ , 5,84 $\mu$ , 5,98 $\mu$ , 6,16 $\mu$			
B <sub>30</sub>	252-255°	IR. (KBr): 5,83 $\mu$ , 6,91 $\mu$ , 7,12 $\mu$ , 7,25 $\mu$ , 7,33 $\mu$ , 7,68 $\mu$ , usw.		beständig gegen HJO <sub>4</sub> und CrO <sub>3</sub>	0 0 0
B <sub>31</sub>	Subl. bei 235-275° ab	IR. (KBr): 6,00 $\mu$ , 6,90 $\mu$ , 7,30 $\mu$ usw.			+ 0 0 halogenfrei
B <sub>32</sub>	Subl. bei 235-275° ab	IR. (KBr): 6,00 $\mu$ , 6,90 $\mu$ , 7,55 $\mu$ usw.; keine UV.-Absorption			+ 0 0

$B_{31}$ : Sehr schwer lösliche, N-haltige Substanz aus Schweinenebennieren (s. Schema 3), sehr ähnlich wie  $B_{32}$ . Die Mutterlauge lieferte in einer Ausbeute von 400–530  $\gamma$  zwei papierchromatographisch nachweisbare Komponenten  $B_{31a}$  u.  $b$ , bei welchen es sich um Steroide handeln könnte,  $B_{31}$  selbst ist sicher kein Steroid.

$B_{32}$ : Isolierung wie  $B_{31}$ , mit sehr ähnlichen Eigenschaften wie dieses; enthält 10,54% N. Die Mutterlauge enthielt 3 papierchromatographisch nachweisbare Komponenten  $B_{32d}$ ,  $e$  u.  $f$  in einer Ausbeute von 400–980  $\gamma$ , bei welchen es sich um Steroide handeln könnte (chromatographisch ähnlich wie Diketo-dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnene).

$B_{35a, b, d}$ : Nebenprodukte der Isolierung von  $B_{35}$ , vermutlich Steroide.

Bei diesen Isolierungen wurde auch darauf geachtet, ob die zur Verfügung stehenden Extrakte weitere Steroide enthielten, die als mögliche Zwischenstufen bei der *Biosynthese des Aldosterons* denkbar sind<sup>8)</sup><sup>37)</sup>: 18-Hydroxyprogesteron, 11 $\beta$ ,18-Dihydroxyprogesteron, 11-Keto-18-hydroxy-cortexon, 18-Hydroxycorticosteron und 11-Dehydroaldosteron. Bisher konnte jedoch keines dieser Steroide eindeutig nachgewiesen werden. Selbst im Falle ihrer ursprünglichen Anwesenheit würde die Abtrennung kleinster Mengen schwierig sein, da diese Verbindungen unter chromatographischen Bedingungen teilweise recht labil sind; ihre chromatographischen Eigenschaften sind in Tab. 5a und 5b beschrieben.

Mit den eingangs erwähnten identifizierten Steroiden sind somit bisher *total 66 Steroide in Nebennierengewebe* inklusive Nebennieren-Tumoren *aufgefunden* worden: 3  $C_{18}$ -Steroide, 10  $C_{19}$ -Steroide, 2  $C_{20}$ -Steroide und 51  $C_{21}$ -Steroide<sup>38)</sup>. Mit Ausnahme von Östradiol-(17 $\beta$ ), Equilenin, Androstenolon, Androsteron und Testosteron<sup>39)</sup><sup>39)</sup><sup>40)</sup><sup>41)</sup>, die in Tumorgewebe nur analytisch nachgewiesen werden konnten, sind alle übrigen 61 Steroide in Substanz isoliert worden.

Tabelle 5b.  $R_g$ -Werte von 18-hydrolierten Steroiden<sup>12)</sup><sup>37)</sup>

Substanzen	P/T	F/Cy-Be	F/Be	F/Be- CHCl <sub>3</sub>	BUSH A 38°	BUSH B <sub>3</sub> 38°	BL <sub>1</sub> 38°
18-Hydroxyprogesteron R <sub>Cortexon</sub>	0,73	0,90	0,95		4,68!	1,78!	
11 $\beta$ ,18-Dihydroxyprogesteron							
R <sub>Corticosteron</sub>	0,43		0,66	0,83			1,46!
R <sub>Cortisol</sub>	5,50		7,30				
18,21-Dihydroxyprogesteron (18-Hydroxycortexon) <sup>42)</sup> R <sub>Corticosteron</sub>	0,59			0,73			0,89

### Experimenteller Teil

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

<sup>37)</sup> Von den erwähnten Steroiden als Referenzmuster verdanken wir 18-Hydroxyprogesteron Herrn Prof. JEGER und die übrigen Herrn Dr. J. SCHMIDLIN.

<sup>38)</sup> Vgl. hierzu die letzte Zusammenstellung von A. WETTSTEIN, IV. Internat. Congress of Biochemistry, Vol. 4, 233, Pergamon Press, London 1959.

<sup>39)</sup> H. A. SALHANIK & D. L. BERLINER, J. biol. Chemistry 227, 583 (1957).

<sup>40)</sup> L. O. PLANTIN, E. DICZFALUSY & G. BIRKE, Nature 179, 421 (1957).

<sup>41)</sup> M. KELLER, A. HAUSER & A. WALSER, J. Clin. Endocrinol. Metabolism 78, 1384 (1958).

<sup>42)</sup> F. W. KAHNT, R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. 38, 1237 (1955).



Tabelle 5a. *R<sub>Cortisol</sub>-Werte von 18-oxygenierten Steroiden* (Mittelwerte der Fleckenmittelpunkte)<sup>(12) 37)</sup>

Substanzen	P/T <sup>d)</sup>	F/Be <sup>d)</sup>	F/CHCl <sub>3</sub>	F/BBW	C <sup>35° b)</sup>	E <sub>2</sub> B <sup>35°</sup>	Cy-Di I <sup>b)</sup> 38°	B <sub>5</sub> <sup>35°</sup>	Blau- tetra- zolum	NaOH <sup>e)</sup>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>e)</sup>	SbCl <sub>5</sub> <sup>e)</sup>
18-Hydroxycorticosteron	0,57	0,36	0,88	0,70	0,54		0,76		+ <sup>e)</sup>	gelb	–	–
Aldosteron . . . . .	2,55	1,20	2,25	0,40	0,97	0,77	1,03	1,22	++	gelb	–	–
17-iso-Aldosteron . . . . .	1,83	1,26	2,22	0,41	0,92	0,73	0,73	1,09	++	gelb	–	–
11-Keto-18-hydroxy-cortexon . . . . .	2,95	1,82	2,20	0,74	1,08	0,74	0,91	1,20	+ <sup>e)</sup>	blass- gelblich	hellblau	hell- violett
11, 18-Diketocortexon (11-Dehydroaldosteron) <sup>a)</sup>	~4,50	2,65	2,78	0,77	1,18	0,64	0,94	1,39	++	gelb	–	–
Cortison . . . . .	2,51	1,95	2,39	0,95	1,38	1,13	1,08	1,43	++	gelb	blau	–

a) Läuft in allen Systemen schlecht, d. h. in langgezogenen Flecken, evtl. bedingt durch Tautomerie. Am besten eignet sich noch F/Be, F/CHCl<sub>3</sub> und Cy-Di I<sup>b)</sup>  
 b) Bush-Typ-Systeme eignen sich für die empfindlichen 18-OH-Verbindungen gut, wenn das Papier vorequilibriert und die Substanz erst unmittelbar vor der Chromatographie aufgetropft wird; andernfalls zersetzen sich die Substanzen teilweise  
 c) Nur schwache und vor allem langsame Farbbildung [20(18)-Cyclohemiketal-Gruppierung]  
 d) 24–48 Stunden  
 e) UV-Fluoreszenzen

*Papierchromatographie* (PCG): Absteigend auf WHATMAN-Papier Nr. 1; ZAFFARONI-Typ-Systeme<sup>43)</sup> bei 22°, BUSH-Typ-Systeme<sup>48)</sup> bei 38°, wie in<sup>44)</sup> angegeben. Über die Ausführung der Farbreaktionen vgl.<sup>44)</sup>, und die der präparativen Papierchromatographie auf einzelnen Blättern in Metalltrögen oder als Chromatoblock s.<sup>45)</sup>. Als Leitfarbstoff diente besonders F<sub>5</sub><sup>46)</sup>. Die für die Lösungsmittel benützten Abkürzungen bedeuten: Be = Benzol, Cy = Cyclohexan, Di = Dioxan, F = Formamid, P = Propylenglykol, T = Toluol; diejenigen für spezielle Lösungsmittelsysteme: BL<sub>1</sub> = Petroläther-Benzol-Methanol-Wasser (3:7:5:5), Cy-Di I = Cyclohexan-Dioxan-Methanol-Wasser (4:4:2:1)<sup>46)</sup>, E<sub>2</sub>B = Isooctan-tert.-Butanol-Wasser (10:5:9)<sup>47)</sup>, F/BBW = Formamid (20% Impr.)/Butylacetat-n-Butanol-Wasser (85:15:5)<sup>48)</sup>. Die mittleren Rf-Werte der Standard-Steroide sind in Tab. 6 zusammengestellt. Die Elution der Substanzen aus den Papierchromatogrammen erfolgte mit 20-proz. Methanol und Methanol nach dem in<sup>49)</sup> angegebenen Modus a).

Tabelle 6. *Mittlere Rf-Werte der Standard-Steroide in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen*

	Progesteron	Cortexon	Corticosteron	Cortisol
P/Cy-Be (1:1)	0,45	0,07		
P/T	0,92	0,73	0,23	(48 h: 0,25)
F/Cy	0,58	0,08		
F/Cy-Be (1:1)	0,91	0,52	0,05	
F/Be		0,85	0,33	(24 h: 0,20)
F/Be-CHCl <sub>3</sub> (1:1)		0,92	0,54	0,05
F/CHCl <sub>3</sub>			0,77	0,24
F/BBW				0,60
BUSH A	0,71	0,19		
B <sub>3</sub>		0,52	0,11	
BL <sub>1</sub>		0,91	0,60	
B <sub>5</sub>			0,78	0,35
C			0,78	0,38
Cy-Di I			0,45	0,25
E <sub>2</sub> B				0,48

*Acetylierungen, Oxydationen* mit Perjodsäure oder Chromtrioxyd in Pyridin, sowie mikrobiologische *Hydroxylierungen* wie in<sup>4)</sup> angegeben.

**Einzelne Verbindungen.** – 1. *3-Keto-20 $\alpha$ -hydroxy-A<sup>4</sup>-pregnen*. Fraktion B/3+4 (9,7 g; s. Schema 1) wurde an 300 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10% Wassergehalt) in Petroläther-Benzol (1:1) adsorbiert und in 200-ml-Fraktionen chromatographiert. Von Fraktion 4 (Petroläther-Benzol (1:1)) wurden 50 mg nach Schema 1 rechromatographiert, davon Zonen b (6,5 mg) und c (8,8 mg) nochmals im System BUSH A. Zone b (Rf 0,29–0,36; 2,5 mg) bzw. a (Rf 0,26–0,33; 2,7 mg) aus letzterem ergaben aus Äther-Aceton 0,8 mg Kristalle, Smp. 158–160°; keine Depression im Misch-Smp. mit

<sup>43)</sup> A. ZAFFARONI, *Recent Progr. Hormone Res.* 8, 51 (1953).

<sup>44)</sup> R. NEHER, *J. Chromatogr.* 1, 205 (1958).

<sup>45)</sup> E. VON ARX & R. NEHER, *Helv.* 39, 1664 (1956).

<sup>46)</sup> P. S. CHEN, H. P. SCHEDL, G. ROSENFELD & F. C. BARTTER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 97, 683 (1958).

<sup>47)</sup> W. R. EBERLEIN & A. M. BONGIOVANNI, *Arch. Biochemistry Biophysics* 59, 90 (1955).

<sup>48)</sup> Variante des F/BW-Systems von V. R. MATTOX & M. L. LEWBART, *Arch. Biochemistry Biophysics* 76, 362 (1958).

<sup>49)</sup> R. NEHER & A. WETTSTEIN, *J. clin. Investig.* 35, 800 (1956).

authentischem 3-Keto-20 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (Smp. 159–160°) und kein Unterschied im IR.-Spektrum (in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

2. 3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (A<sub>60</sub>). – *Isolierung*: s. theoret. Teil. Aus dem Eluat (13,6 mg) erhielt man ein Spitzenkristallinat von 2,0 mg mit dem doppelten Smp. 180–185°/207–209°.  $\lambda_{\max}$  241 m $\mu$  (log  $\epsilon$  = 4,24, ber. für C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>). Das IR.-Spektrum (in KBr) zeigte in der 6 $\mu$ -Region nur ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Sechsringketon an. Chromatographische Eigenschaften s. Tab. 2. Die gelbe Natronlauge-Fluoreszenz war bemerkenswert schwach.

*Synthese*: 100 mg 3,3-Äthylendioxy-16 $\alpha$ ,17-epoxy-20-keto- $\Delta^5$ -pregnen<sup>14</sup>) wurden, in 15 ml Äther gelöst, zu einer gerührten Suspension von 100 mg pulverisiertem LiAlH<sub>4</sub> in 20 ml Äther bei 25° zuge tropft; nach 2-stdg. Kochen des Gemisches unter Rückfluss wurde abgekühlt und mit 10 ml H<sub>2</sub>O zersetzt. Nach Verdünnen mit 50 ml Äthylacetat wusch man die Lösung mit 10-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und H<sub>2</sub>O und destillierte sie nach Trocknen über Natriumsulfat ab. Der Rückstand wurde in 10 ml CH<sub>3</sub>OH gelöst, mit 2 ml 2 N HCl versetzt und 60 Std. bei 5° stehengelassen. Nach Neutralisation mit Hydrogencarbonat-Lösung engte man ein, versetzte mit Wasser und extrahierte mit Chloroform. Den Rückstand der Chloroformlösung (92,8 mg) chromatographierten wir auf 90 Blatt im System F/Be (Chromatoblock). Aus der Zone a (Rf 0,38–0,51) wurden 27,5 mg eluiert, woraus nach Behandlung mit Aceton-Äther 9,9 mg 3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen mit dem Smp. 212° auskristallisierten; dieses erwies sich als die höher schmelzende Modifikation von A<sub>60</sub>, deren IR.-Spektrn nur bei der Aufnahme in Lösung (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), nicht aber in fester Form (KBr) identisch waren.  $[\alpha]_D^{25} = +68,7^\circ \pm 1,4^\circ$  (*c* 0,698, CHCl<sub>3</sub>). Aus Zone b (Rf 0,52–0,65) erhielt man 91,1 mg Eluat, aus welchem mit Aceton-Petroläther 26,3 mg des 20 $\beta$ -Epimeren in Prismen mit dem Smp. 203–204° kristallisierten. R<sub>S</sub>-Werte und Farbreaktionen s. Tab. 2.

Das 20-O-Acetylderivat des  $\alpha$ -Epimeren (isoliertes und synthetisches Produkt), nach üblicher Acetylierung hergestellt, kristallisierte aus Äther-Pentan in Nadeln mit dem Smp. und Misch-Smp. 200–202°. Auch die IR.-Spektrn (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) erwiesen sich als identisch, ebenso die Rf-Werte.  $[\alpha]_D^{25} = +30,5^\circ \pm 1,7^\circ$  (*c* 0,740, CHCl<sub>3</sub>);  $\Delta M_D$  (20-Acetat–20 $\alpha$ -ol) = –99°.

3. 3-Keto-11 $\beta$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (B<sub>6</sub>). – *Isolierung*: s. theoret. Teil. Nach dem letzten Chromatogramm (Chromatoblock mit F/Be-CHCl<sub>3</sub> (1:1)) erhielt man aus der Zone b (Rf 0,65–0,80) 74,9 mg Eluat, das auf 40 Blatt mit F/Be-CHCl<sub>3</sub> (3:1) rechromatographiert wurde. Daraus liessen sich mit Aceton-Äther Nadeln mit dem Smp. 228–229° erhalten; R<sub>S</sub>-Werte und Farbreaktionen s. Tab. 2;  $\lambda_{\max}^{CHCl_3}$  2,74  $\mu$ , 5,98  $\mu$ , 6,16  $\mu$ , usw.

*Synthese*: 500 mg 3,3-Äthylendioxy-11 $\alpha$ -acetoxy-20 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -pregnen<sup>16</sup>) kochte man in 10 ml CH<sub>3</sub>OH mit 5 ml 2-proz. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung 8 Std. unter Rückfluss. Das im Vakuum eingeeengte und mit Wasser versetzte Gemisch wurde mit Äther extrahiert, die Ätherlösung mit 0,1 N HCl und Wasser gewaschen, getrocknet und eingeeengt. Den Rückstand (476 mg) oxydierte man mit 500 mg CrO<sub>3</sub> in 10 ml Pyridin während 24 Std. bei 20°, engte das Gemisch hierauf ein und fällte mit H<sub>2</sub>O; die in Äther aufgenommene Fällung wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Von dem aus der ätherischen Lösung gewonnenen Rückstand reduzierte man 227 mg mit 200 mg LiAlH<sub>4</sub> in total 30 ml Äther wie oben beschrieben (s. A<sub>60</sub>). Das rohe Reduktionsprodukt (239 mg) spaltete man durch 60-stdg. Stehen bei 5° in 10 ml CH<sub>3</sub>OH und 2 ml 2 N HCl. Die ebenfalls wie oben (A<sub>60</sub>) aufgearbeitete Lösung lieferte 198 mg eines Gemisches, das auf 170 Blatt mit F/Be im Chromatoblockverfahren aufgetrennt wurde. Zone a (Rf 0,30–0,46) ergab 94,8 mg Eluat, aus welchem mit Aceton-Äther 10,1 mg 3-Keto-11 $\beta$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen in Nadeln mit dem Smp. 226–229° kristallisierten. Sein IR.-Spektrum (CHCl<sub>3</sub>) war mit demjenigen von B<sub>6</sub> identisch, ebenso das Verhalten im PCG (Tab. 2). Der Misch-Smp. beider Derivate zeigte keine Depression.  $[\alpha]_D^{25} = +134,6^\circ \pm 1,0^\circ$  (*c* 0,78 CHCl<sub>3</sub>). Zone b (Rf 0,49–0,70) lieferte 399 mg Eluat, aus welchem mit Aceton-Äther 26,8 mg des 20 $\beta$ -Epimeren mit dem Smp. 148–150° (kristallwasserfrei) kristallisierten.

Das 20-O-Acetylderivat des  $\alpha$ -Epimeren (isoliertes und synthetisches Produkt), nach üblicher Acetylierung hergestellt, kristallisierte aus Aceton-Petroläther in Nadeln mit dem Smp. und Misch-Smp. von 171–173°. Identität erwies sich auch mit Hilfe der IR.-Spektrn (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und des chromatographischen Verhaltens.  $[\alpha]_D^{25} = +116,1^\circ \pm 3,2^\circ$  (*c* 0,353 CHCl<sub>3</sub>);  $\Delta M_D$  (20-Acetat–20 $\alpha$ -ol) = –95°.

4. und 5. 3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (B<sub>7</sub>) und 3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (B<sub>8</sub> = C<sub>1</sub>). Fraktion A V (26,57 g, vgl. Schema 2) wurde an 1 kg Silicagel mit 15% Wassergehalt grob chromatographiert. Nach Elution von fünf 500-ml-Fractionen mit Chloroform

Chloroform-Aceton (98:2) und (95:5) wurden Fraktionen 6–8 ebenfalls mit letzterer Mischung eluiert, zu Fraktion A VI vereinigt und an 500 g Silicagel mit 15% Wassergehalt feiner rechromatographiert. Man eluierte 500-ml-Fraktionen mit  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ -Aceton (99:1) und (98:2) (je 1 Fraktion),  $\text{CHCl}_3$ -Aceton (97:3) (2), (96:4) (4), (95:5) (2), (92,5:7,5) (2), (90:10) (3 Fr.) und eluierte dann die Hauptmenge Aldosteron mit den Mischungen (90:10) und (85:15) (Fraktionen 17–25). Für die Isolierung von  $\text{B}_7$  und  $\text{B}_8$  wurden Fr. 20–25 (2,12 g) weitergetrennt, und zwar mit Hilfe der Chromatoblockmethode auf insgesamt 1035 Blatt in  $\text{F/CHCl}_3$ . Die vor Aldosteron wandernde UV.-absorbierende Zone Rf 0,68–0,78 ergab nach Elution ein Gemisch von 630 mg rohem  $\text{B}_7 + \text{B}_8$ . Ein Trennungsversuch an einer weiteren Silicagelsäule war erfolglos. Ein 150-mg-Aliquot wurde in Pyridin acetyliert und das Gemisch der Acetate an 20 g Silicagel mit 10% Wassergehalt chromatographiert (100-ml-Fraktionen). Fr. 1–4 ( $\text{CHCl}_3$ ) lieferten 103,4 mg Rückstand, aus welchem mit Äther-Aceton leicht  $\text{B}_8$ -Diacetat kristallisierte. Nach Rekristallisation aus Methanol erhielt man 11,6 mg rein mit dem Smp. 251–253°; keine Smp.-Depression im Gemisch mit synthetischem Material<sup>23</sup>); IR.-Spektren ebenfalls identisch. Fr. 6–7 ( $\text{CHCl}_3$ -Aceton (90:10) und (80:20)) ergaben 50,7 mg Rückstand, der mit Äther-Aceton 35,6 mg reines  $\text{B}_7$ -Monoacetat in Nadeln vom Smp. 243–245° lieferte; keine Depression im Gemisch mit authentischem Material<sup>20</sup>). Die IR.-Spektren ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) waren ebenfalls identisch. Verseifung von  $\text{B}_8$ -Diacetat: 61,0 mg rohes  $\text{B}_8$ -Diacetat kochte man 1 Std. mit 50 ml MeOH und 50 ml 2-proz.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung unter Rückfluss (die Verseifung ging auch bei 20° nach langem Stehen). Die übliche Aufarbeitung ergab 39,0 mg papierchromatographisch einwandfreies  $\text{B}_8$ , das jedoch nur geringe Neigung zur Kristallisation zeigte, auch nach chromatographischer Reinigung über Silicagel. Eine Rechromatographie in  $\text{F/CHCl}_3$  (50 Blatt) erleichterte die Kristallisation etwas. Freies  $\text{B}_8$ , entweder durch Verseifung des Acetates oder durch chromatographische Trennung aus dem ursprünglichen Gemisch mit dem Bush-C-System von  $\text{B}_7$  getrennt, schmolz unscharf bei 215–221°, erwies sich aber als einheitlich und im IR.-Spektrum als identisch mit synthetischem Material<sup>23</sup>). Auf die gleiche Weise wurde freies  $\text{B}_7$  gewonnen, vom Smp. 141–145°<sup>20</sup>); das  $\text{B}_7$ -acetat war jedoch schwerer verseifbar als das  $\text{B}_8$ -Acetat.

Rf-Werte:	P/T	F/Be	BUSH $\text{B}_8$
$\text{B}_7$ -Monoacetat	0,25	0,44	0,19
$\text{B}_8$ -Diacetat	0,78	0,95	0,60

Hier sei noch auf die eigentümlichen und leicht zu Verwechslungen führenden Fluoreszenzreaktionen von  $\text{B}_7$  und  $\text{B}_8$  und ihren Acetaten mit  $\text{SbCl}_5$  hingewiesen:

	$\text{B}_7$		$\text{B}_8$	
	frei	Monoacetat	frei	Diacetat
UV.-Licht	orangerot	gelb	gelb;	rot
Tageslicht	rötlich-violett	gelblich	hell gelbbraunlich	blaugrau

6. und 7. 3, 11-Diketo-17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen ( $\text{B}_{27}$ ) und 3, 11-Diketo-17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen ( $\text{B}_{33}$ ). — *Isolierung*: s. theoret. Teil, Schema 3. Beide Substanzen befanden sich in Zone e (96,3 mg Eluat) des letzten P/T-Chromatogrammes. Eine Trennung erreichte man durch Rechromatographie auf 60 Blatt in  $\text{F/Be}$  im Durchlauf bis Farbstoff  $\text{F}_9$   $3/4$  der Papierstrecke zurückgelegt hatte. Aus dem Eluat der stärker polaren Zone a kristallisierten mit Aceton-Äther leicht 11,5 mg  $\text{B}_{33}$  mit dem Smp. 223–226° aus. Gelegentlich war ein Doppel-Smp. von 208–210°/219–223° zu beobachten. Aus dem Eluat der nur wenig schwächer polaren Zone b erhielten wir nur ca. 1,2 mg des relativ schlecht kristallisierenden  $\text{B}_{27}$  (Hydrat) mit dem Doppel-Smp. 106°/155°. Chromatogr. Verhalten und Farbreaktionen s. Tab. 2.

Sowohl  $\text{B}_{27}$  wie  $\text{B}_{33}$  liessen sich zu einem *Mono-O-acetylderivat* acetylieren und mit Perjodsäure auf übliche Weise zu Adrenosteron oxydieren; die Chromsäureoxydation lieferte teils Adrenosteron, teils 11-Keto-17 $\alpha$ -hydroxy-progesteron (PCG).

$\text{B}_{27}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$	2,76,	2,81,	5,86,	5,98,	6,17,	7,25,	–,	7,45,	8,16,	8,24,	8,41,	8,88
$\text{B}_{33}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$	2,76,	–,	5,85,	5,96,	6,15,	7,24,	7,28,	7,44,	8,15,	–,	8,39,	8,87
( $\text{B}_{27}$ Forts.)		9,16,	9,52,	–,	9,73,	9,84,	9,99,	10,36,	10,55,	10,92,	11,38	$\mu$	
( $\text{B}_{33}$ Forts.)		9,16,	9,50,	9,65,	–,	9,83,	–,	10,35,	–,	10,88,	11,34	$\mu$	

*Synthese* von 3,11-Diketo-17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen ( $B_{27}$ ). 15 mg 3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen-20-acetat (s. unter  $B_7$ -Acetat) wurden in 0,5 mg Pyridin mit 20 mg  $CrO_3$  20 Std. bei 20° oxydiert; das auf übliche Weise aufgearbeitete Gemisch (17,5 mg) verseifte man mit 1 ml Methanol und 0,2 ml 1-proz.  $K_2CO_3$ -Lösung 3 Std. bei 20°. Das Reaktionsprodukt (14,7 mg) wurde auf 14 Blatt im System  $BL_1$  chromatographiert, wobei sich noch etwas unverseiftes Material abtrennen liess; die stärker polare Zone a (Rf 0,40–0,55) wurde eluiert und lieferte mit Äther bzw. Methanol-Chloroform 7,3 mg Kristalle mit dem Doppel-Smp. 108°/156°. Papierchromatographisch (Tab. 2) und spektroskopisch erwies sich diese Substanz als identisch mit dem isolierten  $B_{27}$ . Auf Grund der gleichen chemischen und der sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften wurde der Substanz  $B_{33}$  die Struktur des 20 $\alpha$ -Epimeren von  $B_{27}$  zugeschrieben.

8. 3-Keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -androstene ( $B_{35}$ ). – *Isolierung*: s. theoret. Teil, Schema 3. 6,1 mg Nadeln aus Aceton-Äther, Smp. 214–216°; chromatographische Eigenschaften und Farbreaktionen s. Tab. 2.  $\lambda_{max}^{CHCl_3}$  2,76, 6,00, 6,17, 6,90, 6,99, 7,25, 7,88, 9,09, 9,39, 9,52, 9,97, 10,40, 10,57  $\mu$ . Chemische Eigenschaften s. theoret. Teil.

*Synthese*: In 3 ERLNMEYER-Flaschen wurde auf je 100 ml Nährlösung der Stamm *Curvularia lunata* 1028 4 Tage bei 77° gezüchtet. Das Mycel filtrierte man ab, wusch es mit dest. Wasser und suspendierte es in 300 ml 0,9-proz. NaCl-Lösung. Nach Zugabe von 60 mg 3-Keto-17 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -androstene (*epi*-Testosteron) in 3 ml Aceton wurde 48 Std. unter Schütteln inkubiert. Nach Abtrennen des Mycels, Essigesterextraktion des Filtrates und Abdestillieren des Essigesters chromatographierte man den Rückstand (78,5 mg) auf 60 Blatt in F/Be- $CHCl_3$  (1:1). Aus der Zone b (Rf 0,555–0,605) konnten 15,7 mg Eluat erhalten werden, aus welchem mit Aceton-Äther-Petroläther 6,5 mg Nadeln mit dem Smp. 217–219° kristallisierten. Durch Chromtrioxyd-Oxydation eines Teiles liess sich Adrenosteron vom Smp. und Misch-Smp. 221–223° gewinnen und damit die neu eingeführte 11 $\beta$ -Hydroxylgruppe nachweisen, die, wie erwartet, nicht acetylierbar war. – IR.-Spektrum, Misch.-Smp. und das typische papierchromatographische Verhalten bestätigten die Identität des mikrobiologisch gewonnenen Produktes mit dem aus Nebennieren isolierten  $B_{35}$ .

9. 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Dihydroxy-17-keto-androstan ( $B_{25}$ ). – *Isolierung*: s. theoret. Teil; Smp. und Misch.-Smp. mit authentischem Material: 197–200°. Papierchromatographisches Verhalten s. Tab. 2.

Die Analysen verdanken wir Herrn Dr. W. PADOWETZ, die IR.-Spektren den Herren Dr. E. GANZ und Dr. R. ZÜRCHER. Für die Hilfe bei der Papierchromatographie danken wir Herrn E. VON ARX bestens.

#### SUMMARY

1. The isolation in low yield and the identification of the following 9  $C_{21}$ - and  $C_{19}$ -steroids from hog adrenals is described: (1) 3-keto-20 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^4$ -pregnene, (2) 3-keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnene, (3) 3-keto-11 $\beta$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnene, (4) 3-keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnene, (5) 3-keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-trihydroxy- $\Delta^4$ -pregnene, (6) and (7) 3,11-diketo-17 $\alpha$ ,20 $\beta$ - and -11 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnene, (8) 3-keto-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -androstene and (9) 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-17-keto-androstane. To our knowledge compounds (3), (8) and (7) were unknown up till now. The first two, among others, have been synthesized for comparison with the isolated compounds.

2. The isolated 3-keto-20-hydroxy- $\Delta^4$ -pregnene derivatives are discussed in relation to the biosynthetic pathways of cortisol; the occurrence of some of these 21-desoxy derivatives in adrenals leads to the assumption that the biosynthesis of cortisol proceeds to a certain extent *via* 21-desoxycortisol.

3. The isolation of about 25 partly characterized compounds is reported. Some of them are probably of steroidal nature, some others contain nitrogen. In addition, the paper-chromatographic behaviour of a few 18-oxygenated steroids related to aldosterone is presented.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung