

SUMMARY

The preparation of a number of racemic 11,18-dioxygenated androstene derivatives is described.

From an 11,18-dioxygenated 16 α ,17 α -epoxy-20-oxo-pregnene corresponding 17-oxo-androstene derivatives were prepared, which by further reduction and oxidation yielded the following substituted testosterone: 11 β ,18-dihydroxy, 11 β -hydroxy-18-oxo (as its 18,11-cyclohemiacetal), (18 \rightarrow 11)-lactone of the 11 β -hydroxy-18-acid, 11 β ,18-oxido and 11,18-dioxo testosterone or their acetates.

In an 11 β -hydroxy-18-acetoxy-testosterone derivative, the proximity of the 18-acetoxy group to both the 11 β - and 17 β -hydroxyl functions gave rise to a facile acyl migration from position 18 to 17 and to the smooth formation of an 11 β ,18-ether bridge.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

181. Isolierung, Konstitution und Synthese eines neuen Steroides aus Nebennieren^{1)a)}

Über Steroide, 155. Mitteilung²⁾

von **R. Neher, P. Desaulles, E. Vischer, P. Wieland** und **A. Wettstein**

(30. IV. 58)

Vor 10 Jahren stellten WILKINS & LEWIS⁴⁾ zur Erklärung des exzessiven Salzverlustes, der bei einer besonderen Form⁵⁾ des familiär angeborenen Adrenogenital-Syndroms auftritt, u. a. folgende Hypothese zur Diskussion: Durch die hyperplasierten Nebennieren werde ein Natrium ausscheidender Faktor im Überschuss produziert. Andere Autoren dagegen nahmen als Ursache eine Nebennierenrinden-Insuffizienz mit ungenügender Produktion Natrium zurückhaltender Steroide (wie z. B. Aldosteron) an. Zugunsten der ersten Hypothese können die späteren Beobachtungen von WILKINS⁶⁾,

¹⁾ Über die Isolierung hat A. WETTSTEIN bereits anlässlich zweier Vorträge, am 27. Februar 1957 in Paris und am 6. Dezember 1957 in Stockholm, kurz berichtet. Vgl. hiezu ³⁾.

²⁾ Anmerkung bei der Korrektur: Über die Konstitution und Synthese wurde am IV. Internat. Kongress für Biochemie in Wien vorgetragen.

³⁾ 154. Mitteilung s. P. WIELAND, K. HEUSLER & A. WETTSTEIN, *Helv.* **41**, 1657 (1958).

³⁾ A. WETTSTEIN, a) *Exposés ann. Biochim. méd.* **19**, 171 (1957); b) *TVF* **29**, 49 (1958).

⁴⁾ L. WILKINS & R. A. LEWIS, *Trans. 17th Meet. Conf. on Metabol. Aspects of Con- valence*, J. Macy Jr. Found., N. Y., **1948**, 168.

⁵⁾ A. M. BUTLER, R. A. ROSS & N. B. TALBOT, *J. Pediat.* **15**, 831 (1939).

⁶⁾ J. F. CRIGLER, JR., S. H. SILVERMAN & L. WILKINS, *Pediatrics* **10**, 397 (1952); vgl. auch R. A. LEWIS & L. WILKINS, *J. clin. Investig.* **28**, 394 (1949); R. A. LEWIS, R. KLEIN & L. WILKINS, *J. clin. Endocrinol.* **10**, 703 (1950); L. WILKINS, R. KLEIN & R. A. LEWIS, *Proc. 1st Clin. ACTH Conf.*, Blakiston Phila. **1950**, 184.

JAILER⁷⁾, BARTTER⁸⁾, BIERICH⁹⁾ und anderen ausgelegt werden, wonach die Natriumverluste durch exogenes Hypophysenhormon ACTH verstärkt werden; ferner ihre Befunde, dass unter Cortison oder Cortexon (Hypophysenhemmer) oder durch Natriumzulage Besserung eintritt.

PRADER, SPAHR & NEHER¹⁰⁾ konnten 1955 zeigen, dass die auf physikalisch-chemischem Wege bestimmte¹¹⁾¹²⁾ Aldosteron-Ausscheidung beim angeborenen adrenogenitalen Syndrom mit manifestem Salzverlust nicht erniedrigt, sondern normal¹³⁾ oder wenig erhöht, beim seltenen, spontan klinisch geheilten Salzverlustsyndrom jedoch deutlich erhöht ist (bis 59 γ /24 h). Der Befund, dass so hohe Aldosteronwerte auftreten ohne klinische Symptome zu verursachen, wurde als Stütze für das gleichzeitige Vorliegen eines Natrium ausscheidenden Faktors aufgefasst. Seit 1955 suchten wir deshalb systematisch nach einem solchen Wirkstoff oder solchen Wirkstoffen, im weiteren provisorisch als SEF bezeichnet (= Sodium Excreting Factor).

Vorversuche mit Harn

Als Ausgangsmaterial für orientierende Versuche diente der Urin eines 5jährigen, stark virilisierten Mädchens mit kongenitalem adrenogenitalem Syndrom¹⁴⁾. Der nach verschiedenen Methoden hydrolysierte Harn wurde mit Chloroform extrahiert, der Extrakt in neutrale und saure Anteile zerlegt und einer ausgiebigen papierchromatographischen Fraktionierung unterzogen.

Zur biologischen Auswertung der zahlreich anfallenden Fraktionen musste eine Testmethode angewandt werden, die quantitative Resultate in nützlicher Frist ergab. Die von KAGAWA und Mitarb.¹⁵⁾ angegebene Methodik, die in einzelnen Punkten adaptiert wurde und die sich uns bei der Isolierung des Aldosterons bewährt hatte, schien auch hier geeignet zu sein. Dabei wurde zuerst eine Modifikation angewandt, welche protrahiert eintretende Wirkungen nachzuweisen gestattete, später eine solche, die rascher einsetzende Wirkungen erfasste.

Auf diese Weise liess sich ein biologisch aktives Kristallisat mit bestimmten chromatographischen Eigenschaften isolieren. Es konnte jedoch von den Verunreinigungen sehr ähnlicher Polarität weder durch Sublimation noch durch Umkristallisation oder Rechromatographie gänzlich befreit werden. Bemerkenswerterweise zeigte es weder UV-Absorption bei 240 $m\mu$ noch Reduktionsvermögen. Mit Phosphorsäure ergab es eine sehr schwache hellblaue Fluoreszenz im UV.-Licht (360 $m\mu$), während von allen anderen geprüften Indikatoren lediglich Antimontrichlorid eine brauchbare violette bis blaue UV.-Fluoreszenz lieferte. Diese Farbreaktionen konnten aber, wegen der noch mangelnden Einheitlichkeit des Präparates, nicht mit Sicherheit dem Wirkstoff zugewiesen werden, so dass für die weitere Bearbeitung nach wie vor die biologische Kontrolle erforderlich war.

⁷⁾ J. W. JAILER, J. clin. Endocrinol. **11**, 798 (1951); Transact. N. Y. Acad. Sci. **13**, 262 (1951).

⁸⁾ F. C. BARTTER, A. P. FORBES & A. LEAF, J. clin. Investig. **29**, 797 (1950); vgl. auch F. C. BARTTER *et al.*, *ibid.* **30**, 237 (1951).

⁹⁾ J. R. BIERICH, Monatschr. Kinderheilk. **104**, 170 (1956).

¹⁰⁾ A. PRADER, A. SPAHR & R. NEHER, Schweiz. med. Wschr. **85**, 1085 (1955).

¹¹⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, Acta endocrinol. **18**, 386 (1955).

¹²⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, J. clin. Investig. **35**, 800 (1956).

¹³⁾ Vgl. auch J. A. LUETSCHER JR., in «Adrenal Function in Infants and Children», Ed. L. I. Gardner, Verlag Grune & Stratton, New York 1956, S. 103.

¹⁴⁾ Herrn P. D. Dr. A. PRADER, Zürich, sind wir für die Vermittlung zur Beschaffung dieses Urines sehr dankbar.

¹⁵⁾ C. M. KAGAWA, E. G. SHIPLEY & R. K. MEYER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **80**, 281 (1952).

Nach diesen Vorversuchen wurde systematisch eine grosse Anzahl von Urinproben sowohl der gleichen Patientin als auch weiterer Fälle mit adrenogenitalem Syndrom oder anderen endokrinen Störungen (wie CUSHING-Syndrom, primärem oder sekundärem Hyperaldosteronismus) auf das Vorkommen eines solchen Wirkstoffes untersucht, worüber später berichtet werden soll. Da der schwierig erhaltliche Urin von Patienten mit Adrenogenitalsyndrom zur Gewinnung grösserer Mengen solcher Fraktionen ungeeignet war, prüften wir an Hand der bisherigen Erfahrungen, ob sich ein gleicher oder ähnlicher Wirkstoff aus Rinder- oder Schweine-Nebennieren besser isolieren lasse.

Isolierung aus Nebennieren

Wir griffen znnächst auf Fraktionen von Rinder- und Schweine-Nebennieren zurück, die anlässlich der Isolierung von Aldosteron¹⁶⁾ und anderen Pregnanderivaten¹⁷⁾ aus mehreren Tonnen Drüsen angefallen waren. Trotzdem wir uns auf die Untersuchung von Fraktionen mittlerer Polarität beschränkten, waren viele Hunderte von solchen Präparaten verschiedenen Anreicherungsgrades aufzuarbeiten und biologisch zu prüfen. Diese langwierigen Versuche führten schliesslich zu einigen wenigen Milligrammen eines reinen Wirkstoffes (SEF) vom Smp. 258–260°, der mit demjenigen aus Harn sehr ähnlich, aber nicht identisch war. In erster Linie konnte diese Substanz aus den von Schweine-Nebennieren stammenden Äthylenchlorid-Extrakten und Fett-Fraktionen¹⁶⁾¹⁷⁾ gewonnen werden. Im weiteren war sie in kleinerer Menge chromatographisch und biologisch in entsprechenden Fraktionen aus Rinder-Nebennieren nachweisbar. Die Ausbeute aus diesem alten Material liess aber sehr zu wünschen übrig (ca. 1 mg/Tonne Schweine-Nebennieren), vermutlich weil ein grosser Teil der Substanz durch die jahrelange Aufbewahrung und allzu häufige Rekombination und Rechromatographie der Fraktionen verloren gegangen war. Wir verzichteten deshalb auf die nähere Beschreibung dieser Versuche.

Inzwischen waren frische Sendungen tiefgefrorener Schweine-Nebennieren eingetroffen, die nun in verhältnismässig einfacher Weise nach Schema 1, 2 und 3 aufgearbeitet wurden. Die *Extraktion*¹⁸⁾ erfolgte gemäss Schema 1 nach CARTLAND & KUIZENGA¹⁹⁾. Eine Entfettung des eingeeengten Extraktes mit Petroläther wurde allerdings weggelassen, da hierdurch fast die halbe Menge SEF mit dem Fett verloren gegangen wäre. Tatsächlich konnte aus solchen Fettanteilen früherer Nebennieren-Extraktionen SEF isoliert werden. Da SEF und Corticosteron in gewissen Lösungsmittelsystemen ähnliche Polarität zeigten, wurden alle Extraktionsstufen durch den papierchromatographisch leicht möglichen Nachweis des in ziemlich grossen Mengen vorhandenen Corticosterons als Leitsubstanz kontrolliert. Das wässrige Nebennieren-Konzentrat extrahierten wir also ohne Entfettung erschöpfend mit Äthylenchlorid, wobei etwa 45 kg Extrakt pro 1000 kg Nebennieren resultierten.

Das auf diese Weise aus 2 Tonnen Nebennieren gewonnene Material wurde in Petroläther gelöst und gemäss Schema 2 durch *Gegenstrom-Extraktionen* mit 60-proz. Methanol in einen lipophilen (Fett) und einen hydrophilen (Steroide) Anteil aufgetrennt²⁰⁾. Die Prüfung auf Corticosteron ergab die Hauptmenge

¹⁶⁾ S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. VON EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. **37**, 1163 (1954).

¹⁷⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. **39**, 2062 (1956).

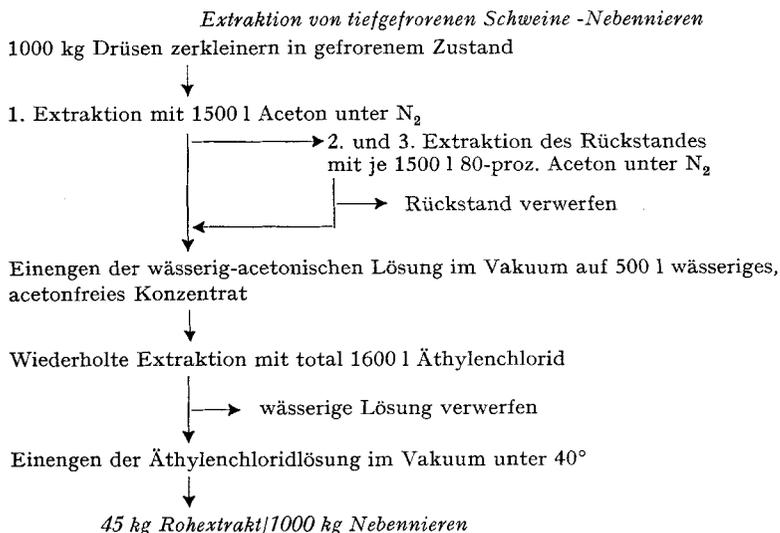
¹⁸⁾ Herrn Dr. M. SUTTER danken wir für die sorgfältige Ausführung dieser Extraktionen im Grosse.

¹⁹⁾ G. F. CARTLAND & M. H. KUIZENGA, J. biol. Chemistry **116**, 57 (1936).

²⁰⁾ Wir danken Herrn Dr. A. STALDER bestens für diese Aufarbeitung.

in den Passagen 1 und 2, während die Passagen 3 und 4 nur noch geringe Steroid-Konzentrationen aufwiesen. Es konnte damit gerechnet werden, dass sich auch der SEF zur Hauptsache in den Passagen 1 und 2 befand. Die wässrig-methanolischen Phasen der Passagen 1+2 (= a) und 3+4 (= b) wurden getrennt mit Petroläther gewaschen, ohne dass dabei Steroide merklich verloren gegangen wären. Schliesslich wurden die gewaschenen Methanol-lösungen (a_1 und b_1) einzeln gründlich mit Chloroform *reextrahiert* (Lösungen a_2 und b_2). Nach Neutralwaschen der Chloroformauszüge erhielten wir so durch Eindampfen 2 Extrakte, von denen A sehr reich an Steroiden war, B aber nur wenig solche enthielt.

Schema 1



Fraktion A unterzogen wir nun gemäss Schema 3 einer ersten *Adsorptionschromatographie* in zwei Säulen von Silicagel, das vorher durch Zusatz von 20% Wasser teilweise entaktiviert worden war²¹⁾ ²²⁾. Vorversuche hatten gezeigt, dass sich die Auftrennung so wesentlich rascher, schonender und auch effektiver erreichen lässt als durch Verteilung an Kieselgur¹⁷⁾. Eluiert wurde mit Chloroform und mit Chloroform-Aceton-Mischungen. Entsprechend der annähernd bekannten Polarität des SEF zog man die mit Chloroform und Chloroform-Aceton (0–3%) erhaltenen Eluate, welche u. a. 11-Dehydrocorticosteron, Corticosteron und 17-Hydroxycortexon (REICHSTEIN's Substanz S) enthielten, zur weiteren Anreicherung heran. Sie wurden vereinigt (A I) und erneut an 3,4 kg Silicagel, das 20% Wasser enthielt, chromatographiert: 11-Dehydrocorticosteron war nun in den Eluaten 4 und 5 (Chloroform mit 2% Aceton), 17-Hydroxycortexon in den Eluaten 5 und 6 (Chloroform mit 2–3% Aceton) und Corticosteron in den Eluaten 6–9 (Chloroform mit

²¹⁾ R. NEHER, *J. of Chromatogr.* **1**, 122, 205 (1958).

²²⁾ H. J. CAHNMAN, *Analyt. Chemistry* **29**, 1307 (1957).

3–4,5% Aceton) enthalten. Aus Aceton ergaben diese Fraktionen bereits grosse Mengen von Kristallisaten, welche sich in der Folge als frei von SEF erwiesen. So lieferten die Fraktionen 6–8 allein nahezu 5 g reines Corticosteron.

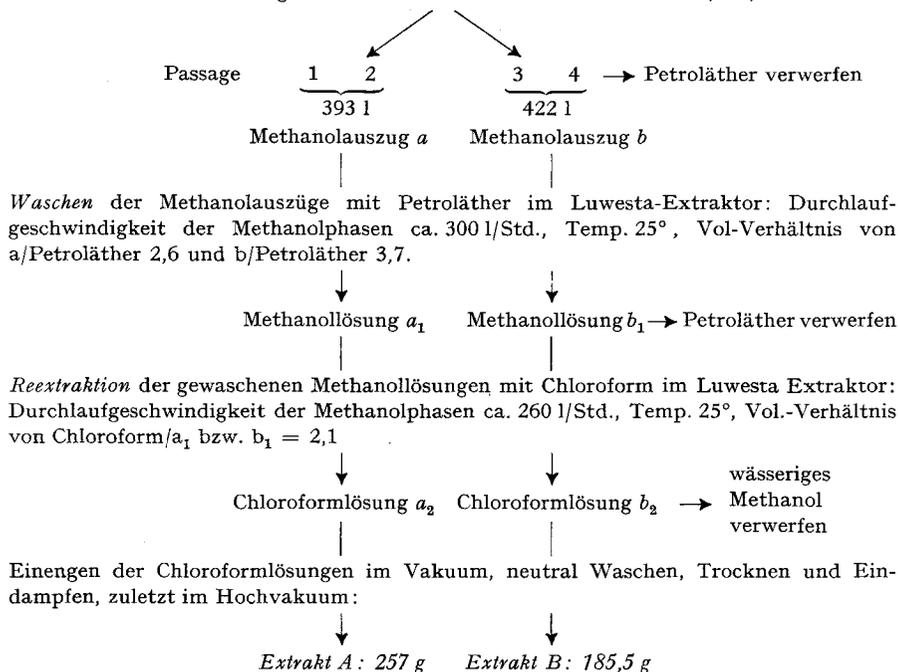
Schema 2

Entfettung von Nebennieren-Rohextrakt

90,2 kg Rohextrakt aus 2000 kg Schweine-Nebennieren (Charge NN XI, gewonnen nach Schema 1).

Lösen in 800 l Petroläther und Abfiltrieren von unlöslichen Stoffen.

Gegenstromextraktion mit 60-proz. wässrigem Methanol (mit 5 g NaCl/l) im Luwesta EG 2006-Extraktor: Durchlaufgeschwindigkeit der Petrolätherphase 600 l/Std., Temp. 18–31°, Vol.-Verhältnis der wässrigen Methanol- zu den Petroläther-Phasen 3,6–4,1.



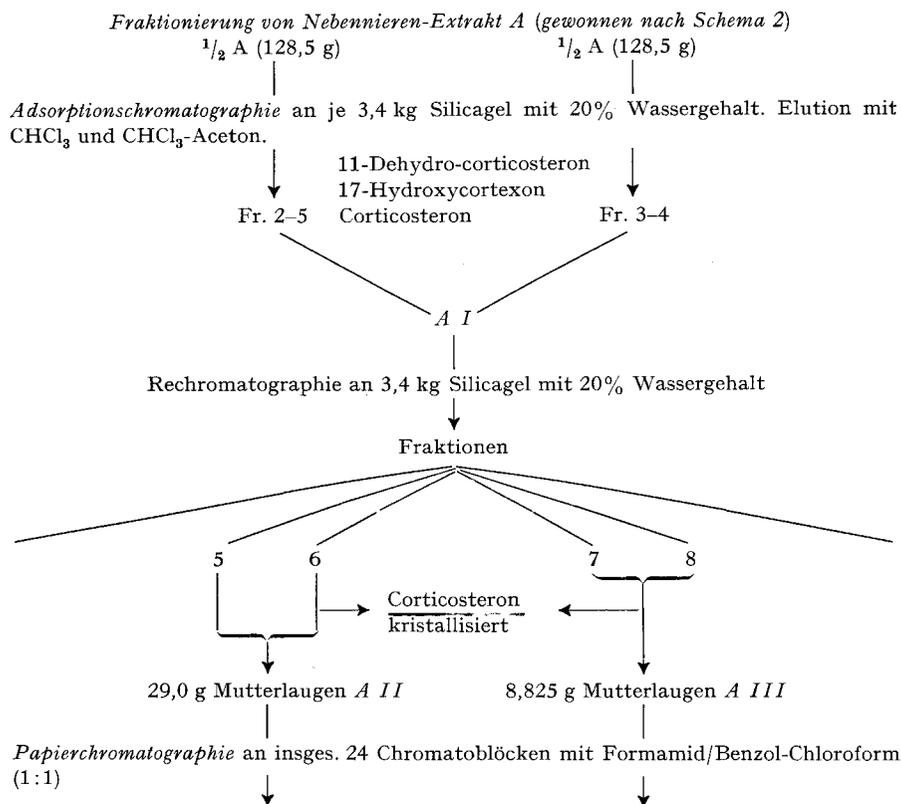
Im weiteren wurden aliquote Teile der Mutterlauge der Fraktionen 4–9 mit dem System Formamid/Benzol-Chloroform (1:1) und Propylenglykol/Toluol *papierchromatographisch* auf das Vorhandensein von SEF geprüft. Der Wirkstoff fand sich zum grösseren Teil in den Fraktionen 5 + 6 (= A II) und zum kleineren in 7 + 8 (= A III). Entsprechend wurden A II und A III einzeln auf WHATMAN-Papier Nr. 1 (19 × 37 cm) im Chromatoblock-Verfahren²³⁾ (je 160–170 Blatt pro Block) mit dem System Formamid/Benzol-Chloroform (1:1) aufgetrennt. Dieses Verfahren erwies sich durch scharfe und rasche Auftrennung für die Isolierung des SEF als äusserst nützlich. Die SEF-haltigen Zonen der verschiedenen Blöcke konnten durch den Farbstoff F₅ sowie be-

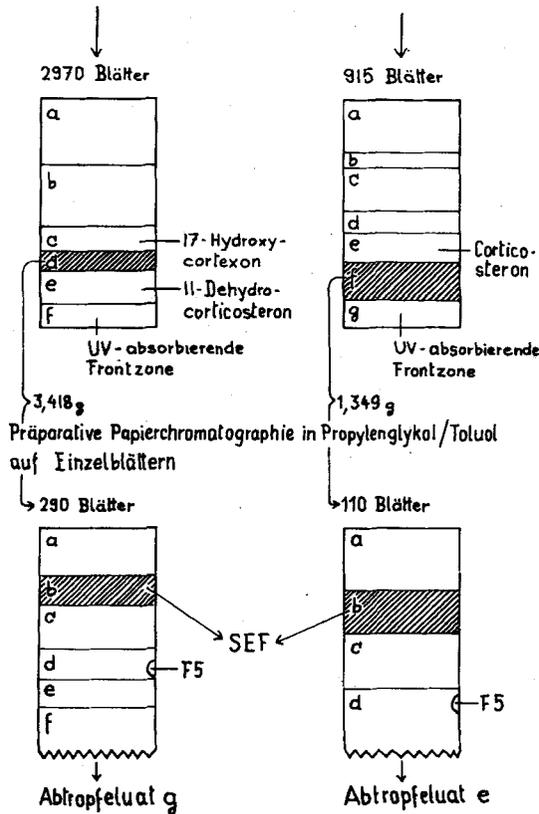
²³⁾ E. VON ARX & R. NEHER, Helv. **39**, 1664 (1956).

sonders durch das im Extrakt befindliche 11-Dehydro-corticosteron (vor SEF laufend) bzw. Corticosteron und 17-Hydroxycortexon (knapp hinter SEF laufend) nach Auswertung der einzelnen Blätter mit dem Fluoreszenzschirm²³⁾ leicht festgelegt werden, ohne dass auf dieser Reinigungsstufe ein Nachweis des SEF selbst mit einer Farbreaktion möglich gewesen wäre. Das auf den ausgeschnittenen Zonen befindliche Material wurde auf übliche Weise mit wässrigem Methanol eluiert und daraus mit Chloroform zurückgewonnen.

Anschliessend wurde im System Propylenglykol/Toluol, und zwar auf einzelnen Blättern, rechromatographiert; hierbei entwickelte man so lange, bis der Farbstoff F_5 ca. $\frac{3}{4}$ der Papierlänge zurückgelegt hatte. Die SEF-Zone befand sich stets etwa auf halbem Weg zwischen F_5 und Startlinie und wurde durch zwei Linien bei R_{F_5} 0,35 und R_{F_5} 0,6 begrenzt. Ausser dem Farbstoff war für die Lokalisierung des SEF in den meisten Fällen auch eine im UV. schwach grünlich fluoreszierende Bande knapp hinter der SEF-Zone nützlich; im UV. bei $240\text{ m}\mu$ absorbierende Substanzen waren in dieser Reinigungsstufe nicht mehr nachweisbar. Hingegen war es nun nach Einwirkung von Antimontrichlorid möglich, den SEF selbst durch eine schwach blaue bis blauviolette UV.-Fluoreszenz sichtbar zu machen.

Schema 3





Das Eluat dieser Zone lieferte mit Aceton oder Aceton-Äther-Gemisch leicht ein Rohkristallisat. Durch einmalige Umkristallisation aus Methanol-Aceton und Waschen der Kristalle mit Aceton und Aceton-Äther erhielt man bereits ein reines, einheitliches Kristallisat vom Smp. 260–261°. Es verursachte in geringen Dosen an der epinephrektomierten Ratte in der Testanordnung, die akute Wirkungen erfasst, eine deutliche Natrium-Mehrausscheidung, und war mit dem früher aus anderen Nebennieren-Chargen gewonnenen Material identisch. Aus den Fraktionen AI/5 + 6 (s. Schema 3) konnten auf diese Weise 50,9 mg reiner SEF isoliert werden, wobei in den Mutterlauge dank der guten Kristallisationsfähigkeit nur noch einige wenige Milligramme des Wirkstoffes verblieben. In den Fraktionen AI/7+8 waren nur noch ca. 2,7 mg SEF enthalten; auch der Extrakt B (s. Schema 2), dessen Aufarbeitung inzwischen auf ähnliche Weise in Angriff genommen worden war, liess nach dem geringen Corticosterongehalt zu schliessen höchstens einige Milligramme SEF erwarten. Insgesamt wurden aus 2000 kg tiefgefrorenen Schweine-Nebennieren rund 54 mg der neuen Verbindung in Substanz isoliert. Entsprechend den analytischen Befunden schätzen wir den Gesamtgehalt auf ca. 30 mg pro 1000 kg dieser Drüsen.

Eigenschaften des SEF aus Schweine-Nebennieren

Der Wirkstoff kristallisiert aus Methanol, Aceton, Äthylacetat, Dioxan oder Tetrahydrofuran, mit oder ohne Zusatz von Wasser, in kleinen dünnen Blättchen. Die Kristalle beginnen ab ca. 210° zu sublimieren, stark ab ca. 230°, und schmelzen bei 258–260°, reinste Proben bei 260–262°; der Smp. ist wegen der vorangehenden starken Sublimation nicht leicht zu bestimmen. Mikrophotographien der Kristalle siehe Fig. 1 sowie 3b).

$$[\alpha]_D^{25} = +64 \pm 2^\circ \text{ (c = 1,0\% in Methanol-Chloroform 1:1)}$$

$$\lambda_{\max} = 287 \text{ m}\mu, E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1,65 \text{ (in Methanol-Chloroform 1:1)}$$

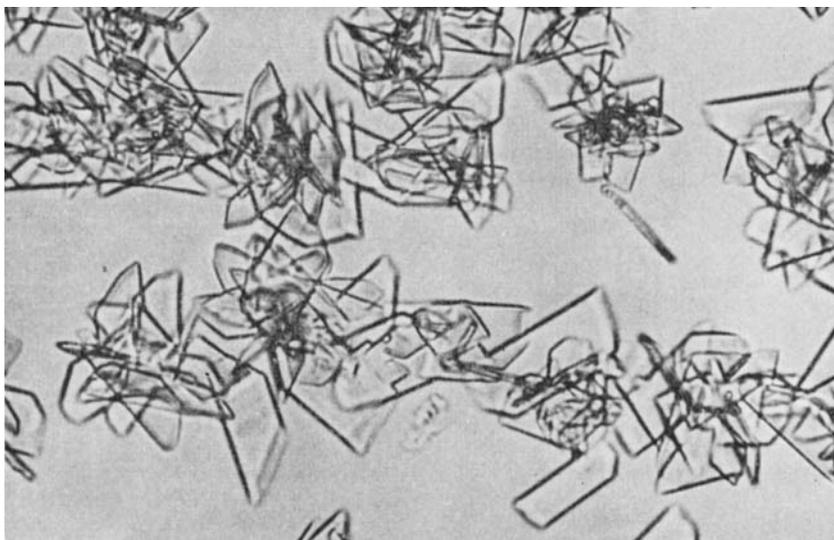


Fig. 1

SEF-Kristalle (aus Methanol), Smp. 260–261°, Vergrößerung 630-fach.

Das IR.-Spektrum wurde (wegen der schlechten Löslichkeit) in Kaliumbromid bzw. Nujol aufgenommen (s. Fig. 2a und b); es zeigt im Doppelbindungsereich nur eine relativ schwache Bande bei 5,85 μ .

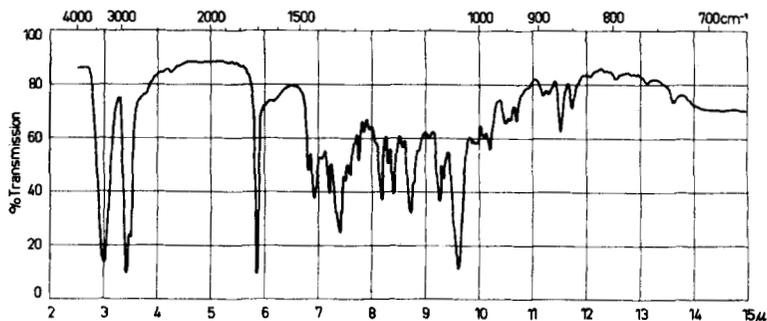


Fig. 2a

IR.-Spektrum von SEF in KBr.

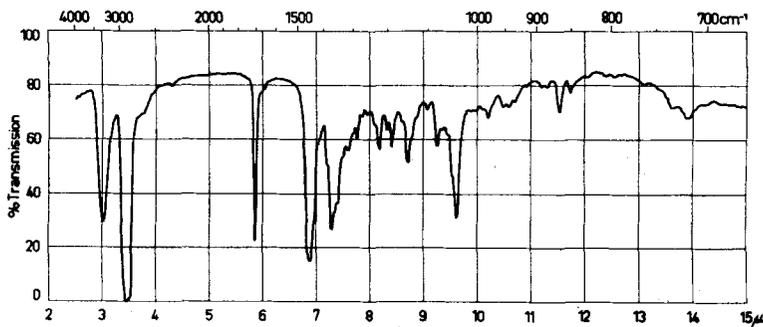


Fig. 2b

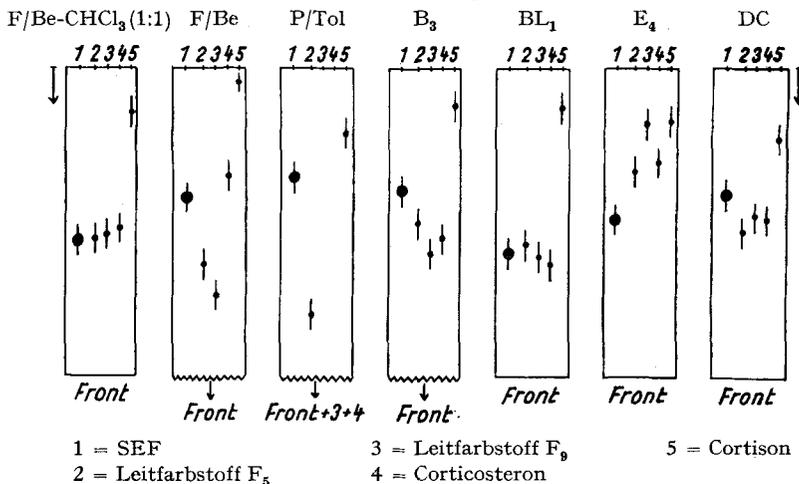
IR.-Spektrum von SEF in Nujol.

Löslichkeit: Gut in Methanol-Chloroform (1:1) oder Propylenglykol; < 1% in Methanol, Chloroform, Methylchlorid, Dioxan, Tetrahydro-furan oder Äthylacetat; gering in Aceton, sehr gering in Äther oder Wasser; in Sesamöl ca. 0,01% (20°).

Verhalten im Papierchromatogramm: Über die Laufgeschwindigkeiten des reinen SEF in verschiedenen Lösungsmittelsystemen im Verhältnis zu den Leitfarbstoffen F_5 und F_9 , zu Corticosteron und Cortison vgl. Schema 4.

Schema 4

Systeme (vgl. Tab. 1 und experimenteller Teil):



Die in Tab. 1 angeführten R-Werte beziehen sich jeweils auf die als Index angegebenen Referenzsubstanzen und nicht auf die Lösungsmittelfront. F_5 , F_9 = Leitfarbstoff 5 bzw. 9. Angegeben sind die Mittelpunkte der Flecken.

In unreinen Extrakten zeigte der SEF gegenüber den in Tab. 1 angegebenen Werten Schwankungen von ca. $\pm 10\%$. In chromatographischer Hinsicht schien der SEF aus Schweine-Nebennieren dem eingangs erwähnten Wirkstoff aus Urin innerhalb der Fehlergrenze zu entsprechen. Beim direkten Vergleich ergaben sich jedoch für einige Systeme Unterschiede (s. spätere Mitteilung), so dass eine Identität ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle 1. *R*-Werte von SEF aus Schweine-Nebennieren in verschiedenen papierchromatographischen Systemen²¹⁾ im Verhältnis zu F_5 , F_9 , Corticosteron und Cortison

	R_{F_5}	R_{F_9}	$R_{\text{Corticosteron}}$	R_{Cortison}
Formamid/Benzol- CHCl_3 (1:1)	1,02	1,04	1,08	4,00
Formamid/Benzol	0,65	0,56	1,15	8,90
Propylenglykol/Toluol	0,44	<0,35	<0,35	1,69
Bush B_3	0,78	0,65	0,71	3,25
BL_1	1,05	0,98	0,94	4,80
E_4	1,48	2,80	1,63	2,88
DC	0,77	0,85	0,84	1,78

Farbreaktionen: SbCl_3 (UV.-Fluoreszenz im 360 $m\mu$ Licht): blau bzw. gelb je nach Konzentration, Lösungsmittelsystem und Trocknung. Empfindlichkeit im Chromatogramm: bis 1 γ /3 cm^2 im BUSH-System und bis 2 γ /3 cm^2 im ZAFFARONI-System (Formamid).

H_3PO_4 : schwach blaue UV.-Fluoreszenz.

SnCl_4 : schwach blaue UV.-Fluoreszenz.

Dinitrophenylhydrazin: schwach gelb; Empfindlichkeit im Chromatogramm 5–10 γ /3 cm^2 .

Von anderen geprüften Farbreaktionen erwiesen sich bis zu 20 γ /3 cm^2 als negativ (Ausführung vgl. ²¹⁾): Blautetrazolium (reduzierende Verbindungen), Natronlaugefluoreszenz (Δ^4 -3-Keto-steroid), alkal. Dinitrobenzol (17-Keto-steroid), Trichloressigsäure, Zinkchlorid, Jod-Kaliumjodid, Ferrichlorid-Kaliumferricyanid (Enole), Kaliumjodplatinat, Ninhydrin.

Biologische Testierung (P. DESAULLES): Viele chemische Verbindungen, wie z. B. gewisse Lipopolysaccharide, führen an der Ratte mit intakten Nebennieren zu einer Steigerung der Natrium-Ausscheidung, welche nach Entfernen der Nebennieren ausbleibt²⁴⁾. Deshalb erscheint für die Testierung von Substanzen mit spezifischer Natrium-ausscheidender Wirkung die Verwendung adrenalektomierter Tiere angezeigt. Die Natrium-Ausscheidung wird von SEF unter gewissen Voraussetzungen, die zur Zeit noch nicht völlig abgeklärt sind, gefördert oder beschleunigt; so scheinen z. B. der Tierart, dem Geschlecht der Tiere und der Art der Wasser- und Kochsalz-Belastung Bedeutung zuzukommen. Die Wirkungen auf den Elektrolyt- und Wasserhaushalt beanspruchen, zumindest theoretisch, grosses Interesse. Ob der weiter nachgewiesene antihypertensive Effekt bei renal hypertensiven Ratten auf demselben Mechanismus beruht, kann heute noch nicht mit Sicherheit angegeben werden.

Konstitution und Synthesen

Wie bereits erwähnt, zeigt der SEF weder UV.-Absorption bei 240 $m\mu$ noch Reduktionsvermögen, was seinen Nachweis und seine Isolierung erheblich erschwerte.

Die Elementaranalyse entsprach am besten der Summenformel eines C_{21} -Steroides, $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$. Die IR.-Spektren, das papierchromatographische Verhalten in verschiedenen Systemen im Vergleich zu bekannten Verbindungen, sowie der positive Ausfall der Farbreaktion mit Dinitrophenylhydrazin sprachen für ein Dihydroxy-monoketon mit einer Sechsring- oder aliphatischen Ketogruppe. Es liess sich mit GIRARD-Reagens T²⁵⁾ in Alkohol und Essigsäure

²⁴⁾ P. DESAULLES & R. MEIER, Schweiz. med. Wschr. **86**, 1060 (1956).

²⁵⁾ A. GIRARD & G. SANDULESCO, Helv. **19**, 1095 (1936).

bei Zimmertemp. in ein wasserlösliches Hydrazon überführen, das mit Mineralsäure leicht wieder gespalten werden konnte. Eine Ketogruppe in 11-Stellung war also sicher auszuschliessen, denn eine solche würde unter den angewandten Bedingungen nicht mit Hydrazin-Derivaten reagieren. Die verhältnismässig geringe Intensität der Carbonylbande bei $5,85 \mu$ im IR. machte das Vorliegen eines 20-Ketons mit benachbarter Hydroxylgruppe wahrscheinlich²⁶⁾. Für eine Methylketon-Seitenkette sprach auch das Auftreten einer starken CH_3 -Bande ($7,39 \mu$), ferner die schwache UV.-Absorption bei $\lambda_{\text{max}} = 287 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 55,2$; $\log \epsilon = 1,742$; ber. für Mol.-Gew. 334,48) und die Rotationsdispersion (Fig. 3). Letztere zeigte eine einfache positive COTTON-Effekt-Kurve mit einem Gipfel von $[\alpha]_{307 \text{ m}\mu} = +2300^\circ$ und einem Tal von $[\alpha]_{260 \text{ m}\mu} = -3400^\circ$ (ca. $\pm 5\%$)²⁷⁾. Diese Werte stimmen am besten mit den für 20-Ketone angegebenen überein²⁸⁾.

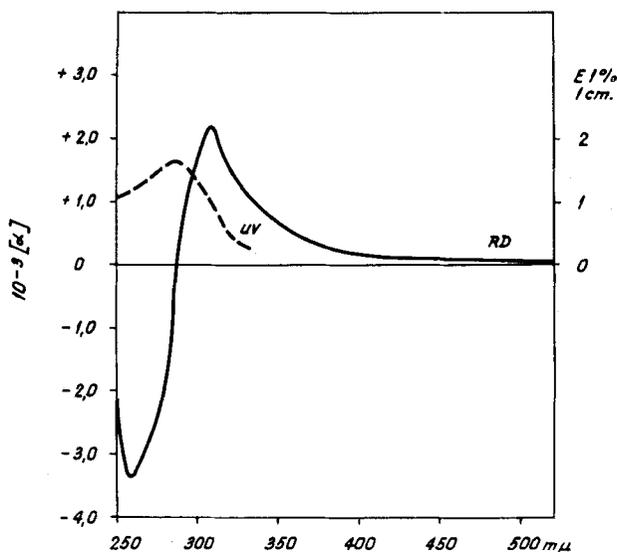


Fig. 3

Rotationsdispersion (RD) und UV.-Absorption (UV.) von SEF (VII), 1% in $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$ (1:1) (F. W. WOOD & R. ROMETSCH); $[\alpha]_{307 \text{ m}\mu} = +2300^\circ$, $[\alpha]_{260 \text{ m}\mu} = -3400^\circ$ (ca. $\pm 5\%$).

SEF liess sich leicht zu einer Verbindung vom Smp. $175-177^\circ$ acetylieren. Deren Papierchromatogramme (Fig. 4, Fleck 4) und IR.-Spektrum (Fig. 5) sprachen gegen das Vorliegen eines freien Hydroxyls und für ein Diacetat; somit konnte sich keine Hydroxylgruppe in einer tertiären oder in 11β -Stellung befunden haben. Eine der Hydroxylgruppen wurde nach IR.-Spektrum und

²⁶⁾ a) R. N. JONES, D. A. RAMSAY, D. S. KEIR & K. DOBRINER, J. Amer. chem. Soc. **74**, 80 (1952); b) R. N. JONES, F. HERLING & E. KATZENELLENBOGEN, *ibid.* **77**, 651 (1955); c) H. ROSENKRANTZ & P. SKOGSTROM, *Analyt. Chemistry* **28**, 31 (1956).

²⁷⁾ Zur Nomenklatur vgl. C. DJERASSI, *Proc. chem. Soc.* **1957**, 55.

²⁸⁾ E. W. FOLTZ, A. E. LIPPMAN & C. DJERASSI, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4359 (1955); C. DJERASSI, *Bull. Soc. chim. France* **1957**, 741.

aus Analogieüberlegungen tentativ in Stellung 3 angenommen, die zweite aus dem oben erwähnten Grund in der Nähe der wahrscheinlichen 20-Ketogruppe, wobei Stellungen 17 und 21 nicht mehr in Betracht kamen. Durch Perjodsäure

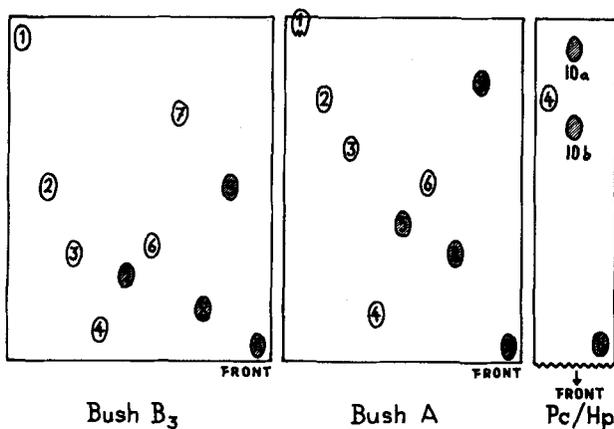


Fig. 4

- 1 SEF, Allopregnan-3 β , 16 α -diol-20-on (VII)
- 2 Mono-16-O-acetyl-allopregnan-3 β , 16 α -diol-20-on (X)
- 3 Mono-3-O-acetyl-allopregnan-3 β , 16 α -diol-20-on (VIII)
- 4 Di-O-acetyl-allopregnan-3 β , 16 α -diol-20-on (XI)
- 5 Δ^{16} -Allopregnen-3 β -ol-20-on (II)
- 6 16 α -Methoxy-allopregnan-3 β -ol-20-on (XIII)
- 7 Allopregnan-16 α -ol-3, 20-dion (IX)
- 8 Progesteron
- 9 Cortexon
- 10 Leitfarbstoff F₁₃ = Fettblau B, enthaltend 2 Komponenten (10a und 10b)
- 11 Sudan IV

Nr. 1-7 zeigen alle blaue (gelegentlich gelbe) UV.-Fluoreszenz verschiedener Intensität nach Behandlung mit Antimontrichlorid

Nr. 1-9 geben positive Dinitrophenylhydrazin-Reaktion. Die schraffierten Flecken absorbieren im UV. - Systeme s. Experimenteller Teil

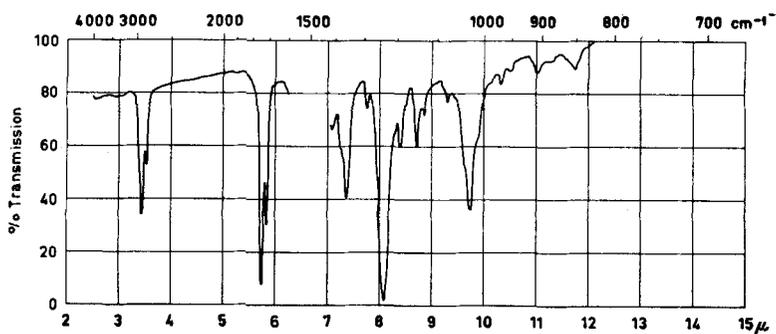


Fig. 5

IR.-Spektrum von Di-O-acetyl-SEF (XI); ca. 300 γ in 2 Tropfen CS₂, kompensiert mit reinem Lösungsmittel, Mikrozelle, Schichtdicke 0,2 mm

wurde SEF nicht verändert, was mit einer unmittelbar benachbarten Stellung beider Hydroxylgruppen nicht vereinbar ist. Dieser Befund liess auch eine an und für sich wenig wahrscheinliche 20,21-Dihydroxy-Seitenkette sicher ausschliessen.

Für die zweite Hydroxylgruppe kamen aus biogenetischen Überlegungen neben Stellung 6 in erster Linie die C-Atome 18 und 19, ferner 16 in Frage. Die Chromsäure-Oxydation von SEF ergab keine klärende Antwort. Die milde Oxydation mit Chromtrioxyd in Pyridin lieferte nebst Ausgangsmaterial nur *ein* kristallisiertes, neutrales Hauptprodukt vom Smp. 227–228°. Papierchromatographie (Fig. 4, Fleck 7) und IR.-Spektrum (Fig. 6) zeigten, dass nur *eine* Hydroxylgruppe dehydriert worden war; die Lage der zusätzlichen Carbonylbande, welche weitgehend mit der ursprünglichen Bande zusammenfiel, entsprach wieder einem aliphatischen oder Sechsringketon und nicht einem Fünfringketon. Ausserdem konnte nach dem IR.-Spektrum, besonders des acetylierten Oxydationsproduktes (vom Smp. 145–147°), vermutet werden, dass die neue Carbonylgruppe aus der 3-Hydroxylgruppe entstanden war^{26c}).

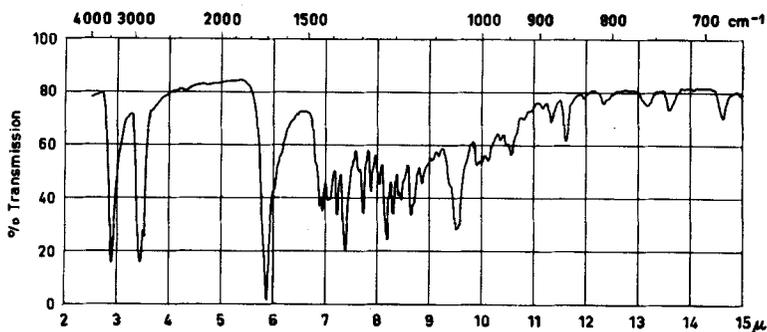


Fig. 6

IR.-Spektrum von 3-Dehydro-SEF (IX); 480 γ in 90 mg KBr gepresst

Chromsäure-Oxydation in wässriger Essigsäure führte zu weitgehendem Abbau und zu einem komplizierten Gemisch zahlreicher neutraler und saurer Verbindungen. Immerhin konnte daraus die gleiche Verbindung vom Smp. 227–228° isoliert werden, die schon bei der Chromtrioxyd-Oxydation in Pyridin entstanden war. Eine kristallisierte Tricarbonylverbindung liess sich aber nicht fassen.

Der Versuch, Di-O-acetyl-SEF wieder zu verseifen, ermöglichte in der Folge die Konstitutionsaufklärung. Die papierchromatographische Analyse des Verseifungsproduktes ergab ausser dem Hauptprodukt, dem freien SEF, zwei weitere Stoffe, die sich mit Antimontrichlorid als blaue Flecken in schwächer polarer Stellung nachweisen liessen (Fig. 4, Flecken 5 und 6). Einer dieser Stoffe zeigte ausserdem bei der UV.-Photokopie der Chromatogramme Absorption im Bereich von 240 $\mu\mu$, hingegen keine gelbe Fluoreszenz mit Natronlauge. Aus einem gesättigten 3, x-Diacetoxy-20-ketosteroid ist also durch milde alkalische Behandlung bei Raumtemp. ein α,β -ungesättigtes 3-Hydroxy-20-keto-

steroid entstanden, was zur Versuchshypothese führte, SEF als 3,16-Dihydroxy-20-ketosteroid zu formulieren. (Vgl. hiezu die Wasserabspaltung aus 16 α -Hydroxy-20-ketosteroiden durch Aluminiumalkoholate²⁹⁾ und die noch leichter eintretende Abspaltung aus 16 β -Acyloxy-20-ketonen³⁰⁾).

Diese Annahme konnte auch die Bildung des komplexen Stoffgemisches durch Chromsäure-Oxydation in Essigsäure erklären, wobei primär ein unstabiles β -Diketon entstehen müsste, das weiter zu Säuren abgebaut würde. MARKER und Mitarb.³¹⁾ beobachteten solch einen weitgehenden Abbau bei der Chromsäure-Oxydation von Allopregnantriol-(3 β ,16 α ,20 β) (= MARRIAN's Triol³²⁾).

Es war nun noch die Konfiguration der Hydroxylgruppen in den wahrscheinlichen Stellungen 3 und 16 sowie diejenige des Steroidgerüsts abzuklären. Für die Hydroxylgruppe in 3-Stellung ergab sich aus den IR.-Spektren der freien und insbesondere der acetylierten Verbindung (s. Fig. 5) nach den Arbeiten von JONES und Mitarb.³³⁾, dass Hydroxyl an C-3 und Wasserstoff an C-5 *trans*- und nicht *cis*-ständig sein müssen; SEF würde also eine 3 α -Hydroxy-pregnan- oder eine 3 β -Hydroxy-allopregnan-Verbindung darstellen. Für die letztere Konfiguration sprachen sowohl der Umstand, dass reiner SEF mit Digonin eine schwerlösliche Komplexverbindung bildete, als auch die grosse Ähnlichkeit des Fingerprintgebietes im IR.-Spektrum von Di-O-acetyl-SEF mit demjenigen von 3 β -Acetoxy-allopregnan-on-(20), nicht aber von 3 α -Acetoxy-pregnan-on-(20)³⁴⁾. Ausserdem sind bisher aus Nebennieren im Unterschied zu Harn fast ausschliesslich Allopregnan- (= 5 α -Pregnan-)-Derivate isoliert worden³⁵⁾³⁶⁾. Die relativ leichte Abspaltbarkeit der 16-Acetoxygruppe aus Di-O-acetyl-SEF legte zwar eine 16 β -Gruppe nahe; da aber die bekannten 16-Hydroxy-C₂₁-Steroide tierischen Ursprungs³⁶⁾ alle 16 α -Konfiguration aufweisen, wurde auch für SEF die 16-Hydroxylgruppe provisorisch in α -Stellung angenommen. Somit ergab sich als *wahrscheinlichste Konstitution* für SEF aus Schweinenebennieren diejenige eines Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-ons (VII).

Verbindung VII oder eine solche mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften des SEF sind u.W. bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

²⁹⁾ a) R. E. MARKER & D. L. TURNER, J. Amer. chem. Soc. **62**, 2540 (1940); b) D. PERLMAN, E. TITUS & J. FRIED, *ibid.* **74**, 2126 (1952).

³⁰⁾ R. E. MARKER, D. L. TURNER, R. B. WAGNER, P. R. ULSHAFFER, H. M. CROOKS, JR. & E. L. WITTLE, J. Amer. chem. Soc. **63**, 779 (1941).

³¹⁾ R. E. MARKER & E. L. WITTLE, J. Amer. chem. Soc. **61**, 855 (1939).

³²⁾ G. A. D. HASLEWOOD, G. F. MARRIAN & R. F. SMITH, Biochem. J. **28**, 1316 (1934). Konstitution s. ³¹⁾, sowie H. HIRSCHMANN, F. B. HIRSCHMANN & M. A. DAUS, J. biol. Chemistry **178**, 751 (1949).

³³⁾ R. N. JONES, P. HUMPHRIES, F. HERLING & K. DOBRINER, J. Amer. chem. Soc. **73**, 3215 (1951); A. R. H. COLE, R. N. JONES & K. DOBRINER, *ibid.* **74**, 5571 (1952); s. auch H. ROSENKRANTZ & P. SKOGSTROM, *ibid.* **77**, 2237 (1955).

³⁴⁾ R. N. JONES & F. HERLING, J. Amer. chem. Soc. **78**, 1152 (1956).

³⁵⁾ T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Vitamines und Hormones **1**, 345 (1943).

³⁶⁾ R. I. DORFMAN & F. UNGAR, Metabolism of Steroid Hormones, Burgess, Minneapolis 1953. R. REUBER & J. SCHMIDT-THOMÉ in HOPPE-SEYLER-THERFELDER, Handbuch der physiol. und pathol. chem. Analyse, 10. Aufl. III/2, S. 1451, Springer 1955.

Hingegen fand sich bei HIRSCHMANN und Mitarbeitern³⁷⁾ eine Angabe über sein Diacetat XI, dessen Smp. von 177,5–178,5° gut mit demjenigen von Di-O-acetyl-SEF übereinstimmt^{37a)}.

Um ohne weiteren Einsatz des kostbaren, aus Nebennieren isolierten Materials gegebenenfalls direkt zu einem eindeutigen Konstitutionsbeweis zu gelangen, wurde nun das Diacetat des Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-ons (XI) nach³⁷⁾ sowie die entsprechende freie Dihydroxyverbindung VII als Vergleichsmaterial *partialsynthetisch hergestellt*. Zunächst reduzierten wir das aus Tigogenin über Verbindung I und IV gewonnene 3 β -Acetoxy-allopregnan-20-on-16 α ,17 α -epoxyd (V) mit Chrom(II)-acetat zum 3-Monoacetat (VIII) des Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on und acetylierten dieses zum Diacetat XI. Letzteres erwies sich nach Smp., Misch-Smp., IR.-Spektrum und papierchromatographischem Verhalten in der Tat als identisch mit Di-O-acetyl-SEF. Auf einem parallelen Weg wurde aus Tigogenin über die Δ^{16} -Verbindung I und das Epoxyd IV das noch unbekannte freie Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on (VII) vom Smp. 258–260° hergestellt. Diese synthetische Verbindung erwies sich in ihren physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften als identisch mit SEF aus Schweine-Nebennieren.

Der geschilderte Zugangsweg aus Tigogenin, das seinerseits aus Diosgenin erhältlich ist^{29a)}, lieferte nicht nur den Konstitutionsbeweis, sondern gleichzeitig eine einfache und ergiebige Synthese, welche die Herstellung von VII in grossen Mengen gestattet. Sie gelang analog auch über das ebenfalls aus Diosgenin leicht erhältliche ungesättigte Epoxyd III³⁸⁾³⁹⁾ durch dessen katalytische Reduktion mit Palladium-Katalysator zu IV.

Weitere Synthesen (E. VISCHER & P. WIELAND) beruhten einerseits auf der mikrobiologischen Hydroxylierung in 16 α -Stellung von Allopregnanol-(3 β)-on-(20) (XIV) mit einer Kultur der *Streptomyces-Species A 7747*^{39a)}, andererseits auf der Umwandlung des bereits erwähnten MARRIAN'schen Triols (XV)³²⁾, das ein 20 β -Dihydro-SEF darstellt. XV wurde durch partielle Acetylierung in das 3,16-Diacetat XVI übergeführt, welches mit Chromtrioxyd in Essigsäure leicht zu Di-O-acetyl-SEF (XI) dehydriert werden konnte.

Allopregnanediol VII selbst liess sich durch überschüssiges Acetanhydrid in Pyridin bei Zimmertemp. wie erwähnt leicht in sein Diacetat XI überführen. Acetylierung mit nur 1,1 Äquiv. Acetanhydrid führte zu einem Gemisch von

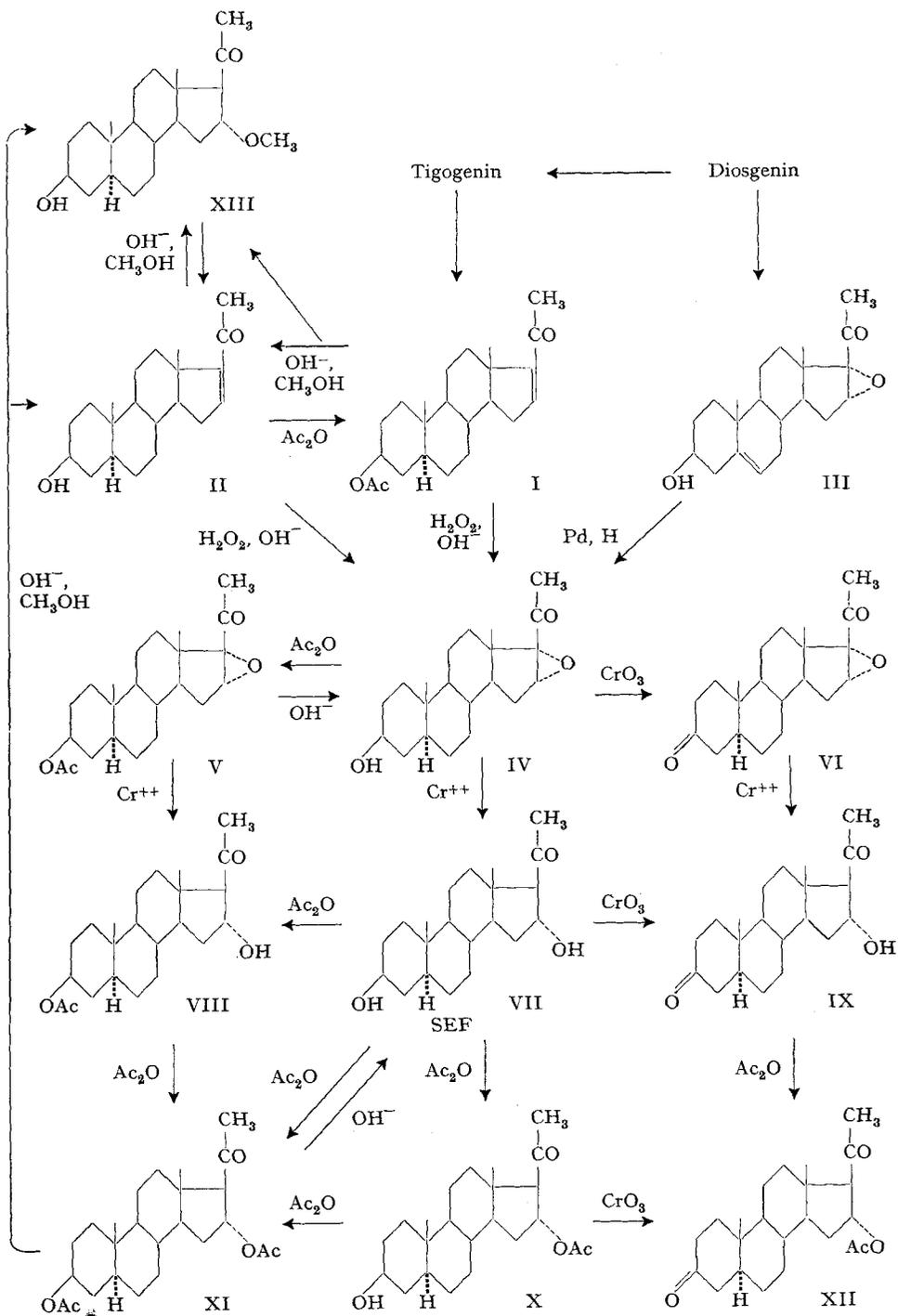
³⁷⁾ H. HIRSCHMANN, F. B. HIRSCHMANN & J. W. CORCORAN, J. org. Chemistry **20**, 572 (1955). Zur Herstellungsmethode vgl. A. R. H. COLE & P. L. JULIAN, *ibid.* **19**, 131 (1954).

^{37a)} Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen ist auch von tschechischen Autoren das Diacetat XI sowie das 3-Monoacetat VIII beschrieben worden: V. SCHWARZ, V. ČERNÝ & F. ŠORM, Coll. Czechosl. chem. Communications **23**, 940 (1958); siehe auch Chem. Listy **51**, 1362 (1957).

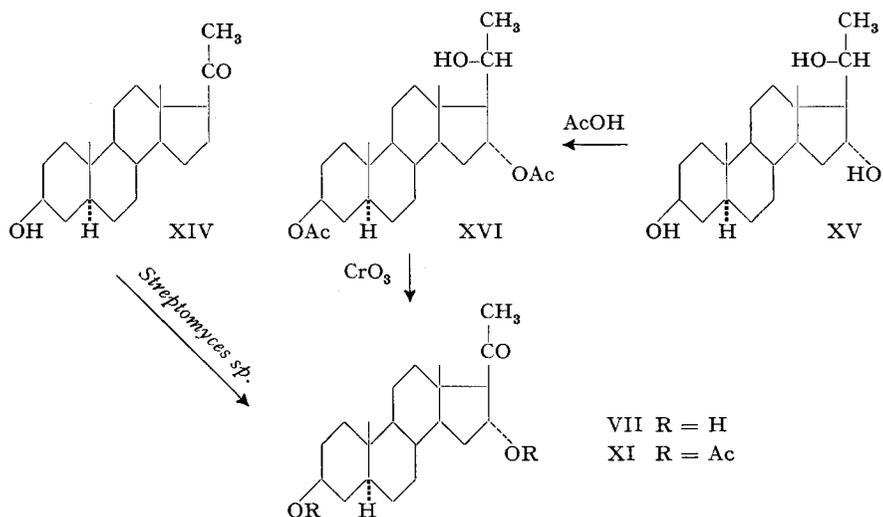
³⁸⁾ P. L. JULIAN, E. W. MEYER, W. J. KARPEL & I. R. WALLER, J. Amer. chem. Soc. **72**, 5145 (1950).

³⁹⁾ Für die Überlassung dieses Stoffes sind wir Herrn Dr. K. HEUSLER zu Dank verpflichtet.

^{39a)} E. VISCHER, J. SCHMIDLIN & A. WETTSTEIN, Helv. **37**, 321 (1954).



etwa 10% 3-Monoacetat VIII vom Smp. 183–185°, 40% 16-Monoacetat X vom Smp. 259–261° und 10% Diacetat XI; der Rest blieb unverestert. Die Verseifung des Diacetates XI zu VII gelang recht glatt mit Kaliumhydrogencarbonat, Kaliumcarbonat oder Natronlauge in wässrigem Methanol bei Zimmertemp. Als Nebenprodukt entstand stets die Δ^{16} -Verbindung II in einer Ausbeute von ca. 5–10%. Sie war auch immer bei der Reduktion von IV in den Mutterlaugen von VII nachweisbar, ebenso wie die Δ^{16} -Verbindung I in den Mutterlaugen von VIII, erhalten bei der Reduktion von V. Als weiterer Begleiter war bei der alkalischen Verseifung des Diacetates XI in Methanol neben II stets die 16 α -Methoxy-Verbindung XIII anzutreffen, die unter diesen Bedingungen leicht auch aus II oder I entstand⁴⁰).



Dass das einzige fassbare Produkt (vom Smp. 227–228°) bei der Oxydation von VII mit Chromtrioxyd in Pyridin tatsächlich die 3-Keto-Verbindung IX darstellte, ergab sich aus der Tatsache, dass sie ebenfalls durch milde Oxydation des Epoxyds IV und Reduktion des entstandenen VI mit Chrom(II)-acetat gewonnen wurde. Ihr 16-Acetat XII vom Smp. 145–147° liess sich sowohl durch Acetylierung von IX als auch durch milde Chromsäure-Oxydation des 16-Monoacetats X darstellen.

Zur weiteren Charakterisierung von VII wurden noch die Spektren in konz. Schwefelsäure⁴¹), in Schwefelsäure-Phosphorsäure⁴²) und «100-proz.» Phosphorsäure⁴³) aufgenommen. Die Kurven sind in Fig. 7 wiedergegeben.

⁴⁰) D. K. FUKUSHIMA & T. F. GALLAGHER, J. Amer. chem. Soc. **72**, 2306 (1950).

⁴¹) A. ZAFFARONI, J. Amer. chem. Soc. **72**, 3828 (1950); S. BERNSTEIN & R. H. LENHARD, J. org. Chemistry **18**, 1146 (1953); **19**, 1269 (1954).

⁴²) P. R. STEYERMARK & W. J. NOWACZYNSKI, Arch. Biochemistry Biophys. **59**, 1 (1955).

⁴³) W. J. NOWACZYNSKI & P. R. STEYERMARK, Arch. Biochemistry Biophys. **58**, 453 (1955); Can. J. Biochemistry Physiol. **34**, 592 (1956).

Durch Umsetzung von VII mit o,p-Dinitrophenylhydrazin unter Stehenlassen in salzsaurer äthanolischer Lösung erhielt man das 20-(o,p-Dinitrophenyl)-hydrazon vom Smp. 259–261° (Zers.). Unter energischeren Bedingungen, nämlich bei einstündigem Erhitzen in 4-n. Schwefelsäure auf 98°, bildete sich, unter Abspaltung von 2 Mol. Wasser, das ohne Zersetzung bei 258–260°

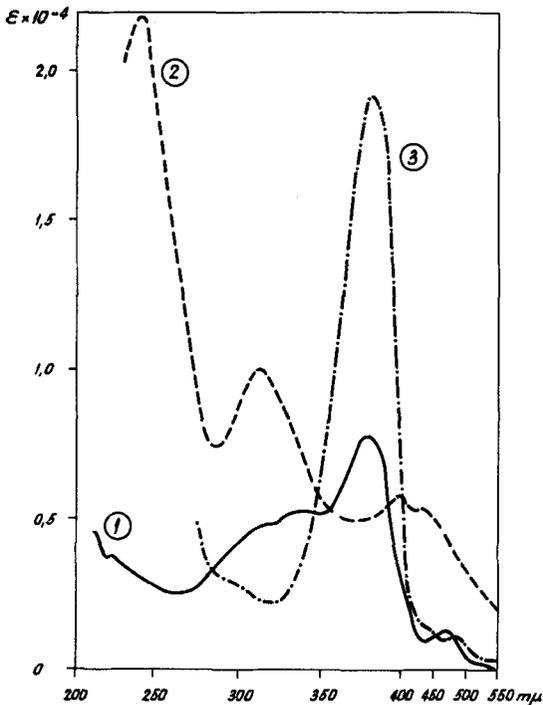


Fig. 7

Absorptionskurven von Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on (VII) in

- 1 konz. H₂SO₄: λ_{\max} 475 m μ ($\epsilon = 1250$), 381 m μ ($\epsilon = 7850$)
- 2 H₂SO₄-H₃PO₄: λ_{\max} 400 m μ ($\epsilon = 5900$), 311 m μ ($\epsilon = 10100$), 237 m μ ($\epsilon = 21900$)
- 3 «100-proz.» Phosphorsäure: λ_{\max} 380 m μ ($\epsilon = 19300$)

schmelzende 20-(o,p-Dinitrophenyl)-hydrazon des Δ^{16} -Allopregnen-3 β -ol-20-ons (II). Hierauf scheint sich eine recht spezifische Bestimmungsmethode für SEF aufbauen zu lassen, wie später gezeigt werden soll. Aus Fig. 8 sind die Absorptionskurven der beiden Hydrazone in Chloroform und alkoholischer Natronlauge ersichtlich. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums beim Übergang vom gesättigten zum α,β -ungesättigten Steroid-20-hydrazon einerseits und bei der Messung in neutraler bzw. alkalischer Lösung andererseits entspricht den in der Literatur⁴⁴⁾⁴⁵⁾ angegebenen Werten.

⁴⁴⁾ A. G. GORNALL & M. P. McDONALD, J. biol. Chemistry **201**, 279 (1953).

⁴⁵⁾ L. DORFMAN, Chem. Reviews **53**, 47 (1953); H. REICH, K. F. CRANE & S. J. SANFILIPPO, J. org. Chemistry **18**, 822 (1953).

Experimenteller Teil

Arbeitstechnik: Alle Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert.

Die Absorptionskurven im UV- und sichtbaren Bereich wurden mit einem selbstregistrierenden CARY Spektrophotometer, Mod. II MS 59, die IR.-Spektren mit einem PERKIN-ELMER double beam Instrument, Mod. 21, und die Rotationsdispersionskurve mit einem in unseren physikalisch-chemischen Laboratorien entwickelten photoelektrischen Polarospektrometer aufgenommen.

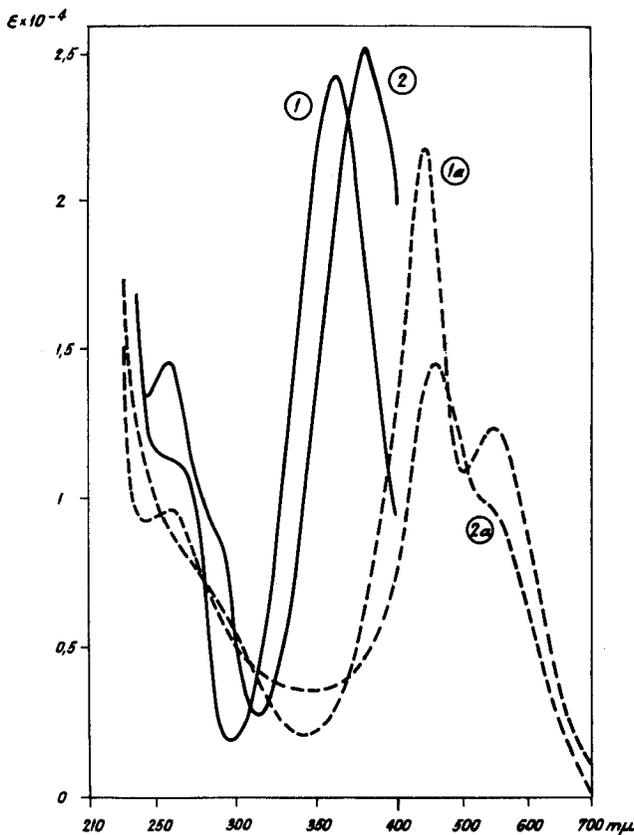


Fig. 8

Absorptionskurven der o,p-Dinitrophenylhydrazone von Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on ① und Δ^{16} -Allopregnen-3 β -ol-20-on (II) ②

1 und 2 in Chloroform

1a und 2a in wässrig-äthanol. 3-proz. Natronlauge

1 λ_{\max} 262 m μ ($\epsilon = 11400$), 363 m μ ($\epsilon = 24300$)

1a λ_{\max} 432 m μ ($\epsilon = 21900$), 542 m μ ($\epsilon = 12500$)

2 λ_{\max} 260 m μ ($\epsilon = 14700$), 384 m μ ($\epsilon = 25300$)

2a λ_{\max} 260 m μ ($\epsilon = 9700$), 455 m μ ($\epsilon = 14800$)

Papierchromatographie: Absteigend auf WHATMAN-Papier Nr. 1; Systeme nach ZAFFARONI⁴⁶⁾ bei 22°, solche nach BUSH⁴⁷⁾ bei 38°, wie in ²¹⁾ angegeben. Als weitere

⁴⁶⁾ A. ZAFFARONI, Recent Progr. in Hormone Res. **8**, 51 (1953).

⁴⁷⁾ I. E. BUSH, Biochem. J. **50**, 370 (1952).

Lösungsmittelsysteme wurden E₄ (Isooctan-Butanol-Methanol-Wasser 50:22,5:22,5:5)⁴⁸⁾ und DC (Isooctan-Toluol-Methanol-Wasser 5:15:16:4)⁴⁹⁾ bei 38° verwendet, sowie Phenylcellosolve/Heptan (Pc/Hp)⁵⁰⁾ bei 22°. Über die Ausführung der Farbreaktionen vgl. ²¹⁾ und der präparativen Papierchromatographie auf einzelnen, 19 cm breiten Blättern in Metalltrögen oder als Chromatoblock s. ²³⁾. Als roter Leitfarbstoff F₅ wurde 4-Nitro-2'-methyl-4'-diäthanolamino-azobenzol, als blauvioletter F₉, 1,4-Diamino-anthrachinon und als blauer F₁₃ gewählt, für die Markierung der Lösungsmittelfront diente Sudan III oder IV. F₁₃ bestand zur Hauptsache aus 2 Komponenten, 10a (1-Amino-4-phenylamino-anthrachinon) und 10b (1-Methylamino-4-phenylamino-anthrachinon, vgl. Fig. 4). Die Elution der Substanzen aus den Papierchromatogrammen erfolgte mit 20-proz. Methanol und Methanol nach dem in ¹³⁾ angegebenen Modus a.

Extraktion und Entfettung von Schweine-Nebennieren siehe Schema 1 und 2.

Neutralwaschen des entfetteten Nebennieren-Extraktes a₂ (vgl. Schema 2): Der im Vakuum bei max. 30° auf 70,7 kg eingeengte Chloroformextrakt a₂ (steroidreicher Anteil aus 2 Tonnen Schweine-Nebennieren) (Charge NN XI) wurde nach Abtrennung von 1,8 l einer wässrigen Schicht mit 2 l 0,5-n. HCl 10 Min. ausgerührt und nach neuerlicher Abtrennung von 5,7 l wässriger Phase mit 2 l 0,5-n. Sodalösung gewaschen. Es schied sich wiederum eine wässrige Phase von 4,7 l ab. Die Chloroformlösung wurde nun 10 Min. mit 2 l Wasser ausgerührt, wobei sich eine dicke Emulsion bildete, die durch Zugabe von 200 g Kochsalz weitgehend getrennt werden konnte, unter Abscheidung von nochmals 4,1 l wässriger Phase. Eine weitere Waschung der Chloroformschicht mit 2 l Wasser, enthaltend 250 g Kochsalz, lieferte nach langsamer Trennung noch 3,3 l wässrige Phase.

Die 5 abgetrennten wässrigen Phasen wusch man in Serie mit dreimal 500 ml Chloroform zurück und vereinigte letztere Lösungen mit der filtrierten Hauptmenge der Chloroformlösung. Im Schnellverdampfer wurde sie auf 2 l eingeengt; dieses Konzentrat enthielt, wie sich beim Eindampfen eines getrockneten aliquoten Teils zuletzt im Hochvakuum ergab, 257 g Neutralextrakt (= A). Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und zur späteren Extraktion eingefroren.

Silicagelchromatographie (vgl. Schema 3): Silicagel DAVISON through 200 (No. 922 oder 923) wurde zuerst 24 Std. bei 170° getrocknet und hierauf einige Std. mit 25 Gew-% Wasser equilibriert, so dass der Wassergehalt des desaktivierten Adsorbens schliesslich 20% betrug.

Ein Rohr von 7,5 cm Durchmesser und 142 cm Länge beschickte man mit etwas Chloroform und füllte es dann mit einer Aufschlämmung von 3,4 kg des desaktivierten Silicagels in Chloroform. Die Füllhöhe der fertigen Säule betrug 103 cm. Nach 10 cm hoher Übersichtung mit Silicagel-Celite (3:1), Sand und Glasperlen wurde der halbe Chloroform-Neutralextrakt A, enthaltend 128,5 g, in Form eines Konzentrates von 1 l aufgegeben. Durchlaufgeschwindigkeit 1 l/Std., Druck 0,2 atü. Die andere Hälfte von A wurde parallel in einer zweiten Säule aufgetrennt.

Bei diesen beiden Adsorptionschromatographien fielen die in Tab. 2 aufgeführten Eluate an. In Tab. 2 ist weiter angegeben, in welchen Fraktionen sich nach papierchromatographischer Analyse die Hauptmenge der wichtigen Corticosteroidhormone befanden. Nach dieser nur sehr groben Auftrennung vereinigte man die Fraktionen 2-5 von der Chromatographie der ersten Hälfte von A und die Fraktionen 3-4 von der zweiten Hälfte zu A I und rechromatographierte letzteres an einer neuen Säule von 3,4 kg Silicagel wie oben beschrieben (Eluate von je 3 l, siehe Tab. 3).

SEF war, wie sich später herausstellte, besonders in Fr. 5 und 6 enthalten, lief also an dieser Silicagelsäule hauptsächlich mit 17-Hydroxycortexon (b).

Der aus dem steroidarmen Anteil b₂ der Charge NN XI analog erhaltene Neutralextrakt B betrug 185,5 g und wurde ebenso in zwei Hälften auf zwei Silicagelsäulen aufgetrennt. Eine anschliessende zweite Silicagelchromatographie war hier nicht nötig.

⁴⁸⁾ W. R. EBERLEIN & A. M. BONGIOVANNI, Arch. Biochemistry Biophys. **59**, 90 (1955).

⁴⁹⁾ D. DE COURCY, J. Endocrinol. **14**, 164 (1956).

⁵⁰⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. **35**, 276 (1952).

Tabelle 2. *Chromatographie von NN XI, Fraktion A, an Silicagel mit 20% Wasser*

Aus erster Hälfte A g	Enthaltene Corti-costeroide	Fr.	Lösungsmittel	Aus zweiter Hälfte A g	Enthaltene Corti-costeroide
21,123	a	1	5 l CHCl ₃	13,072	(a)
3,735	a, (b)	2	5 l CHCl ₃	3,528	a
9,791	a, b, c	3	5 l CHCl ₃ + 1% Aceton	18,738	a, b, c
7,444	b, c	4	5 l CHCl ₃ + 2% Aceton	6,856	c
2,366	(b), c	5	3 l CHCl ₃ + 3% Aceton	1,408	d
0,870	d	6	3 l CHCl ₃ + 4% Aceton	2,239	d
1,032	d	7	3 l CHCl ₃ + 5% Aceton	2,234	d
10,808	d, e, f	8	3 l CHCl ₃ + 5% Aceton	1,558	d
4,126	f	9	3 l CHCl ₃ + 6% Aceton	1,613	e
0,791	f	10	3 l CHCl ₃ + 6% Aceton	5,761	e, f
0,351	(f)	11	3 l CHCl ₃ + 8% Aceton	3,497	f
0,220		12	3 l CHCl ₃ + 10% Aceton	0,657	(f)
0,212		13	3 l CHCl ₃ + 15% Aceton	0,365	(f)
0,795		14	3 l CHCl ₃ + 20% Aceton	0,389	
5,788		15	5 l CHCl ₃ + 50% Aceton	7,680	
4,262		16	5 l Aceton	4,380	
1,479		17	5 l Aceton	0,606	
8,606		18	5 l Methanol	6,661	

a = 11-Dehydro-corticosteron; b = 17-Hydroxycortexon; c = Corticosteron; d = Cortison; e = Aldosteron; f = Hydrocortison; g = Fraktionen, welche vereinigt (Al) nochmals an Silicagel chromatographiert wurden.

Eine weitere Charge von 2 Tonnen Schweine-Nebennieren (NN XII) wurde im wesentlichen wie NN XI aufgearbeitet. Bei der Chromatographie an Silicagel verwendeten wir aber an Stelle von solchem mit 20% Wassergehalt eines mit nur 15% Wassergehalt, was die Elution der Steroide mit der gleichen Lösungsmittelreihe deutlich verlangsamte und den Trenneffekt verbesserte.

Papierchromatographische Aufarbeitung der Mutterlaugen-Fractionen A II und A III: Diese Aufarbeitung erfolgte ausnahmslos durch präparative Papierchromatographie nach Schema 3, und zwar zuerst im Chromatoblock, anschliessend auf Einzelblättern; vgl. theoretischer Teil sowie die dort zitierte Literatur.

Die Kristallisation von SEF aus den Eluaten der Zonen b vom zweiten Papierchromatogramm erfolgte leicht mit Hilfe von Aceton, Aceton-Äther oder wenig Methanol-Chloroform. Die Mutterlaugen enthielten ausser Resten des SEF noch kleine Mengen von zwei weiteren papierchromatographisch fassbaren Verbindungen, von denen die eine (X₁) schwächer polar, die andere (X₂) stärker polar als der SEF war. X₁ und X₂ sind vorläufig nicht weiter untersucht worden.

Eigenschaften von SEF aus Schweine-Nebennieren: Smp. 260–261°; $[\alpha]_D^{25} = +64 \pm 2^\circ$; $\lambda_{\max} 287 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 1,74$; Rotationsdispersion vgl. Fig. 3 [alle optische Messungen in Methanol-Chloroform (1:1)]; übrige physikalische Daten und papierchromatographisches Verhalten siehe theoretischer Teil.

C₂₁H₃₄O₃ (334,48) Ber. C 75,40 H 10,25% Gef. C 75,44 H 10,40%

3β, 16α-Diacetoxy-allopregnan-20-on (XI). – a) Durch Acetylierung von VII: 1,5 mg SEF aus Nebennieren wurden in 0,2 ml Pyridin abs. gelöst und mit 0,1 ml Acetanhydrid 20 Std. bei 20° stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung kristallisierte man das Roh-

produkt aus Aceton-Äther um und wusch mit Petroläther nach. Es wurden 1,5 mg Nadeln vom Smp. 175–177° erhalten. IR.-Spektrum vgl. Fig. 5. – Analog wurde auch aus Tigogenin synthetisch gewonnenes VII (s. unten) in sein Diacetat übergeführt, das im Gemisch mit dem «natürlichen» Präparat keine Smp.-Erniedrigung zeigte.

Tabelle 3. Weitere Chromatographie von NN XI, Fraktion A I, an Silicagel mit 20% Wasser

Fr.	Lösungsmittel	g	enthaltene Corti-costeroide	SEF
1	CHCl ₃	0,112		
2	CHCl ₃			
3	CHCl ₃ +1% Aceton	0,328	a a, b b c c (b, c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c)	++ } MI A II ++ } MI A I + } MI A III (+) } MI A III
4	CHCl ₃ +2% Aceton	5,686		
5	CHCl ₃ +2% Aceton	15,520		
6	CHCl ₃ +3% Aceton	15,438		
7	CHCl ₃ +3,5% Aceton	5,670		
8	CHCl ₃ +4% Aceton	6,887		
9	CHCl ₃ +4,5% Aceton	3,432		
10	CHCl ₃ +5% Aceton	1,727		
11	CHCl ₃ +6% Aceton	0,250		
12	CHCl ₃ +7% Aceton	0,172		
13	CHCl ₃ +8% Aceton	0,138		
14	CHCl ₃ +10% Aceton	0,084		
15	CHCl ₃ +10% Aceton	0,667		
16	CHCl ₃ +50% Aceton	0,091		
17	Aceton	0,031		
18	Methanol	0,074		

b) Aus 3 β -Acetoxy-allopregnan-20-on-16 α ,17 α -epoxyd (V)^{51,52} über VIII: Nach HIRSCHMANN *et al.*³⁷) durch Reduktion mit Chrom-(II)-acetat, Chromatographie des intermediär entstandenen 3-Monoacetates VIII an Silicagel (mit 15% Wassergehalt) und Acetylierung zu 3 β ,16 α -Diacetoxy-allopregnan-20-on (XI). Nadeln, Smp. 175–177°. Keine Depression im Gemisch mit einem gemäss a) aus SEF gewonnenen Produkt.

c) Aus Mono-16-O-acetyl-allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on (X): durch Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin bei Zimmertemp. analog a); Smp. 175–177°.

d) Aus Allopregnantriol-(3 β ,16 α ,20 β) (XV) über XVI: 650 mg Allopregnantriol-(3 β ,16 α ,20 β) (XV) (= MARRIAN'S Triol³²) wurden mit 65 ml Eisessig 4 Std. gekocht. Darauf dampften wir im Vakuum ein und entfernten die letzten Reste Eisessig durch wiederholtes Lösen des Rückstandes in Benzol und Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum. Bei der Chromatographie an 30 g Aluminiumoxyd (Aktivität I) wurde zunächst mit Benzol das 3 β ,16 α ,20 β -Triacetoxy-allopregnan eluiert, während sich in den 5% Essigester enthaltenden Benzolfractionen das 3 β ,16 α -Diacetoxy-allopregnan-20 β -ol (XVI) befand. Es schmolz nach Umlösen aus einem Methylenechlorid-Äther-Petroläther-Gemisch bei 168° (Kristallumwandlung zwischen 159,5 und 160°). $[\alpha]_D^{25} = -77 \pm 2^\circ$ (c = 1,253 in CHCl₃).

C₂₅H₄₀O₅ (420,57) Ber. C 71,39 H 9,59% Gef. C 71,23 H 9,51%

Zu einer Lösung von 25 mg 3 β ,16 α -Diacetoxy-allopregnan-20 β -ol (XVI) in 1 ml Eisessig gaben wir unter Kühlen eine Lösung von 11 mg Chromtrioxyd in 0,6 ml 95-proz.

⁵¹) Wir danken Herrn Dr. C. MEYSTRE für die Überlassung dieses Materials.

⁵²) a) Pl. A. PLATTNER, L. RUZICKA, H. HEUSSER & E. ANGLIKER, *Helv.* **30**, 385 (1947); b) Pl. A. PLATTNER, H. HEUSSER & M. FEURER, *Helv.* **31**, 2210 (1948).

Essigsäure. Nach vierstündigem Stehen bei Zimmertemp., Verdünnen mit Wasser und zweimaligem Extrahieren mit Äther wurden die ätherischen Lösungen mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Die Lösung des Rückstandes in Aceton wurde mit Carboraffin behandelt, filtriert, stark eingengt und mit Äther und Petroläther versetzt, worauf Kristallisation erfolgte. Nochmaliges Umlösen der erhaltenen Kristalle aus Aceton-Äther-Petroläther-Gemisch gab ein Präparat vom Smp. 175,5–177°, das nach Misch-Smp. und IR.-Spektrum mit 3 β ,16 α -Diacetoxy-allopregnan-20-on (XI) identisch war. $[\alpha]_D^{25} = +20 \pm 1,5^\circ$ ($c = 0,92$ in $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$ 1:1) Der molekulare Drehungsbeitrag der 16 α -Acetoxygruppe entspricht –204.

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_5$ (418,55) Ber. C 71,74 H 9,15% Gef. C 71,65 H 9,17%

Mono-3-O-acetyl- und Mono-16-O-acetyl-allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on (VIII bzw. X): Das 3-Acetat VIII wurde ausser auf die oben erwähnte Weise [s. b)] durch partielle Acetylierung von VII erhalten: 50,8 mg SEF wurden in 2 ml abs. Pyridin gelöst, mit 158 μl einer 10-proz. Lösung von Acetanhydrid (1,1 Äquiv.) in abs. Benzol versetzt und 65 Std. bei 20° stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung analysierte man den Eindampf-Rückstand von 51 mg im BUSH-System B₃. Neben ca. 40% Ausgangsmaterial waren rund 10% 3-Monoacetat VIII, 40% 16-Monoacetat X und 10% Diacetat XI vorhanden.

Eine vollständige Auftrennung gelang nicht durch Chromatographie an Silicagel. Das dadurch wenigstens vom Diacetat befreite Material trennte man auf 20 Blatt Papier im System BUSH B₃. Die einzelnen Zonen wurden entsprechend den Rf-Werten der Komponenten (s. Fig. 4) mit wässrigem Methanol eluiert. Das Eluat der Zone von VIII wurde aus Äther umkristallisiert und mit Äther-Hexan (1:1) gewaschen. Es liessen sich 1,4 mg von reinem *Mono-3-O-acetyl-allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on (VIII)* vom Smp. 184–186° isolieren; dieses war identisch mit dem aus V durch Reduktion gewonnenen Material. Aus dem stärker polaren Eluat wurden durch Umkristallisieren aus Äther 5,4 mg *Mono-16-O-acetyl-allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on (X)* in schönen Nadeln vom Smp. 259–261° gewonnen. Es zeigte im Gemisch mit dem 3-Monoacetat VIII eine starke Smp.-Erniedrigung (Smp. ab ca. 178°). Acetylierung zum Diacetat XI s. oben.

Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on (VII). – a) Aus Tigogenin (bzw. Diosgenin): 2 g Tigogenin kochte man in 4 ml Pyridin und 8 ml Acetanhydrid nach Zugabe von 0,8 g Monomethylamin-hydrochlorid 8 Std. unter Rückfluss bei 180–190°. Nach 2stündigem Verühren in 100 ml Wasser wurde das amorph abgeschiedene Produkt dreimal mit 100 ml Äther extrahiert, der Auszug mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser neutral gewaschen und eingedampft. Das rohe Pseudotigogenin (2,87 g) löste man in 20 ml Methylenchlorid und 20 ml 80-proz. Essigsäure und oxydierte es durch tropfenweise Zugabe unter Rühren von einer Lösung von 1 g Chromtrioxyd in 2,5 ml Wasser und 16 ml Eisessig bei 0–5° während 35 Min. Es wurde dann noch weitere 3 Std. bei 7–10° gerührt, mit 1,5 ml 30-proz. Natriumhydrogensulfid-Lösung versetzt und auf 100 g Eis gegossen. Nach Extraktion der Oxydationsprodukte mit dreimal je 100 ml Methylenchlorid und Waschen dieses Auszuges mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser destillierte man das Lösungsmittel ab und löste den öligen Rückstand in 50 ml Dioxan. Diese Lösung wurde 1 1/2 Std. mit 2 g Kaliumcarbonat in 25 ml Wasser gekocht, darauf das Dioxan abdestilliert, der Rückstand mit Wasser versetzt, ausgeäthert und der Auszug neutral gewaschen. Nach Eindampfen der ätherischen Lösung kristallisierten 530 mg *16 α -3 β -Acetoxy-allopregnen-20-on (I)*^{52a} aus Methanol-Hexan.

Gemäss dem Verfahren von JULIAN *et al.*⁸⁸) wurden 400 mg Verbindung I in 30 ml Methanol mit 0,8 ml 4-n. NaOH und 1,6 ml H₂O₂ (30-proz.) 60 Std. bei 5° stehengelassen. Der durch Versetzen mit 200 ml Wasser ausgeschiedene Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit 50 ml Wasser gewaschen, in Äther aufgenommen und nochmals mit Wasser gewaschen. Das nach Trocknen über wenig Natriumsulfat und Abdestillieren des Äthers erhaltene kristallisierte *Epoxyd IV* wurde in roher Form zur weiteren Reduktion verwendet.

Analog wie die beschriebene Umwandlung von Tigogenin über I zu IV verlief diejenige von Diosgenin zu III⁵⁹), aus dem durch Hydrierung mit Palladium-Katalysator IV erhalten wurde⁵⁹).

1,07 g rohes Epoxyd IV wurden in 75 ml Eisessig gelöst und mit einer durch Petroläther überschichteten Suspension von 55 ml Chrom(II)-acetat-Reagens³⁷), entsprechend 10 Äquiv. Cr⁺⁺, versetzt. Nach Entfernung des Petroläthers im Vakuum und Verschluss des evakuierten Kolbens schüttelte man ihn 8 Std. bei 20°. Der Inhalt wurde dann in 200 ml Wasser gegossen, die Fällung dreimal mit 200 ml Chloroform extrahiert und dieser Auszug mehrmals mit je 30 ml Wasser, 0,1-n. HCl, 0,5-n. Natriumcarbonat und Wasser neutral gewaschen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels nahm man den Rückstand in Methanol-Chloroform (1:1) auf, filtrierte und engte bis zur Kristallisation ein. Durch Umkristallisieren aus Methanol und Äthylacetat (oder Aceton oder Dioxan) erhielt man 497 mg *Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on* (VII) in Form feiner Blättchen vom Smp. 256–260°; starke Sublimation ab ca. 230°; keine Smp.-Erniedrigung im Gemisch mit SEF aus Nebennieren.

b) Durch Verseifung des Diacetates XI. – 1. 1 mg Diacetat XI wurde in 0,5 ml Methanol und 0,1 ml 2-n. NaOH 15 Min. bei 20° stengelassen. Nach Neutralisieren mit 0,1 ml 2-n. HCl engte man im Vakuum ein und extrahierte den Rückstand mit Äther-Chloroform (3:1). Gemäss papierchromatographischer Analyse bestand das Hauptprodukt aus VII; Nebenprodukte waren die Verbindungen II und XIII.

2. 1 mg Diacetat XI wurde in 1 ml Methanol mit 0,3 ml Wasser und 0,1 ml gesätt. Natriumhydrogencarbonat-Lösung 16 Std. bei 20° stengelassen. Einengen im Vakuum und Aufarbeiten ergab ein sehr ähnlich zusammengesetztes Reaktionsprodukt wie bei 1.

3. 10 mg Diacetat XI wurden in 2 ml Methanol mit 0,5 ml 2-proz. Kaliumcarbonatlösung 16 Std. bei 20° stengelassen. Das Hauptprodukt war wiederum VII, begleitet von den Substanzen II und XIII.

Die Produkte der Ansätze 1–3 wurden vereinigt und auf 10 Blatt WHATMAN-Papier Nr. 1 mit dem System BUSH A aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit wässrigem Tetrahydrofuran statt wässrigem Methanol. Die Zone vom Rf 0,0 bis 0,1 enthielt *Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on* (VII), das, aus Methanol-Chloroform und Aceton umkristallisiert, bei 260–262° schmolz. Das Eluat der nächsten Zone gab nach Versetzen mit Äther langsam 0,5 mg Kristalle vom Doppel-Smp. 166–168°/173–175°. Nach Misch-Smp. und papierchromatographischem Vergleich erwiesen sie sich als *16 α -Methoxy-allopregnan-3 β -ol-20-on* (XIII), welches auch aus der Δ^{16} -Verbindung I synthetisiert wurde (s. unten). Die nächste Zone (s. auch Fig. 4) enthielt schliesslich *\Delta^{16}-Allopregnen-3 β -ol-20-on* (II); es kristallisierte aus Äther-Hexan in gebogenen Blättchen vom Smp. 198–206° und erwies sich mit ebenfalls aus Verbindung I hergestelltem Material (s. unten) nach Misch-Smp. und chromatographischem Verhalten als identisch.

c) Durch 16 α -Hydroxylierung von *Allopregnan-3 β -ol-20-on* (XIV): Vier ERLÉNMEYER-Kolben von je 500 ml Fassungsvermögen wurden mit je 100 ml einer Nährlösung beschickt, die auf einen Liter Leitungswasser folgende Zusätze enthielt: 10 g Rohglucose, 5 g Pepton, 3 g Fleischextrakt (Oxo Lab Lemco), 5 g NaCl und 10 g CaCO₃. Die Kolben wurden im Autoklaven sterilisiert und dann mit der *Streptomyces species A 7747* beimpft^{39a}). Die Kulturen schüttelte man bei 26° mechanisch, wobei sie sich innerhalb 26 Std. gut entwickelten.

Nun wurde zu jeder Kultur unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 30 mg *Allopregnan-3 β -ol-20-on* (XIV) in 1 ml Aceton zugegeben, worauf man sie weitere 48 Std. bei 26° schüttelte. Man trennte vom Mycel ab und extrahierte das vereinigte Kulturfiltrat dreimal mit je 100 ml Äthylacetat. Die Extrakte wurden mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die papierchromatographische Analyse des erhaltenen Rückstandes (145 mg) zeigte, dass neben Ausgangsmaterial und einigen Nebenprodukten die Verbindung VII vorhanden war. Diese wurde durch präparative Papierchromatographie im System Propylenglykol/Toluol, wie bei der Isolierung aus Nebennieren beschrieben,

⁵⁹) R. A. MICHELI & C. U. BRADSHAW, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4788 (1955).

abgetrennt. Es kristallisierte aus Methanol in Blättchen vom Smp. 258–260° und erwies sich mit dem gemäss a) und b) erhaltenen Präparat als identisch.

o,p-Dinitrophenylhydrazon von Allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on (VII): 200 mg VII in 40 ml Äthanol wurden mit 200 mg *o,p*-Dinitrophenylhydrazin in 19 ml Äthanol und 2 ml konz. HCl 16 Std. bei 20° stehengelassen, wobei sich reichlich Kristalle abschieden. Sie wurden abgetrennt und gründlich mit Äthanol gewaschen. Das orange gefärbte Dinitrophenylhydrazon schmolz nach 8-stündigem Trocknen bei 60° im Hochvakuum, nach Umwandlungen zwischen 150 und 160° sowie 220 und 230°, bei 249–252° unter starker Gasentwicklung.

$C_{27}H_{38}O_6N_4$ (514,61) Ber. C 63,01 H 7,44% Gef. C 63,02 H 7,73%

Absorptionskurven in Chloroform und wässerig-äthanolischer (1:1) 3-proz. Natronlauge vgl. Fig. 8: λ_{\max} 262 $m\mu$ ($\epsilon = 11400$), 363 $m\mu$ ($\epsilon = 24300$) in Chloroform; λ_{\max} 432 $m\mu$ ($\epsilon = 21900$), 542 $m\mu$ ($\epsilon = 12500$) in äthanol. Natronlauge.

o,p-Dinitrophenylhydrazon von Δ^{16} -Allopregnen-3 β -ol-20-on (II): 100 mg VII in 100 ml Äthanol erhitzte man mit 200 mg *o,p*-Dinitrophenylhydrazin in 100 ml 4-n. H_2SO_4 1 Std. auf 100°, nutschte nach Abkühlen das Präzipitat ab und wusch es mit 4-n. H_2SO_4 und Wasser. Aus Äthanol-Wasser erhielt man feine, orange gefärbte Kristallnadeln vom Smp. 257–260°.

$C_{27}H_{38}O_5N_4$ Ber. C 65,30 H 7,31 N 11,28%
(496,59) Gef. „ 65,01 „ 7,57 „ 11,18%

Absorptionskurven s. Fig. 8: λ_{\max} 260 $m\mu$ ($\epsilon = 14700$), 384 $m\mu$ ($\epsilon = 25300$) in $CHCl_3$; λ_{\max} 260 $m\mu$ ($\epsilon = 9700$), 455 $m\mu$ ($\epsilon = 14800$) in Äthanol-Natronlauge.

16 α -Methoxy-allopregnan-3 β -ol-20-on (XIII). – a) Bei Verseifung des Diacetates XI: s. oben. b) Bei Verseifung von Δ^{16} -3 β -Acetoxy-allopregnen-20-on (I): 100 mg der Δ^{16} -Verbindung I wurden in 10 ml Methanol mit 0,5 g Kaliumhydroxyd 16 Std. bei 20° stehengelassen und dann in 30 ml Wasser gegossen; nach dreimaliger Extraktion mit je 30 ml Äther und Neutralwaschen des Auszuges mit Wasser, Filtrieren und Eindampfen wurden 20 mg des Rückstandes (93,7 mg) auf 20 Blatt Papier im System Bush A aufgetrennt. Die oberen Zonen (Rf-Werte s. Fig. 4) ergaben 14,1 mg Eluat, wovon 5,3 mg aus Äther kristallisierten und Nadeln vom Doppel-Smp. 170/173° lieferten. Sie erwiesen sich mit der gemäss a) gewonnenen Substanz XIII als identisch.

Die nächste Zone mit etwas höherem Rf-Wert enthielt Δ^{16} -Allopregnen-3 β -ol-20-on (II) vom Smp. 206–208° (aus Methanol-Hexan und Aceton-Äther). Es zeigte gelegentlich einen zweiten Smp. bei 230–234°. Durch Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin bei Zimmertemp. wurde II in sein Acetat I zurückverwandelt.

Allopregnan-16 α -ol-3,20-dion (3-Dehydro-SEF, IX). – a) Aus VII durch CrO_3 -Oxydation in Pyridin: 11,3 mg SEF wurden in 0,5 ml Pyridin mit 2 ml einer 1-proz. Lösung von Chromtrioxyd in Pyridin 16 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde mit Wasser verdünnt, mit Chloroform-Äther (1:3) extrahiert und die organische Lösung von Pyridin mit n. HCl befreit und mit 0,1-n. NaOH und Wasser neutral gewaschen. Die alkalischen Waschlösungen extrahierte man nach Ansäuern durch 2-n. H_2SO_4 mit Chloroform zurück. Durch Eindampfen wurden eine neutrale und eine saure Fraktion gewonnen; die letztere (0,2 mg) war papierchromatographisch leer. Den Neutralteil (8,6 mg) chromatographierte man auf 500 mg Silicagel in Benzol (Eluate von 2 ml). Die Chloroform-Eluate wurden vereinigt und zweimal aus Aceton-Äther umkristallisiert. Sie gaben Verbindung IX in Form rhomboedrischer Kristalle vom Smp. 226–228°; nach Misch-Smp., papierchromatographischem Verhalten und IR.-Spektrum war das Präparat identisch mit dem gemäss b) und c) gewonnenen Produkt.

b) Aus VII durch CrO_3 -Oxydation in Essigsäure: 15 mg SEF wurden in 0,85 ml Eisessig und 0,5 ml Chloroform gelöst und mit 14,8 mg Chromtrioxyd in 1,1 ml 65-proz. Essigsäure (entsprechend 5 O-Äquiv.) 42 Std. bei 20° stehengelassen, worauf die Chromsäure verbraucht war. Nach Zugabe von 0,3 ml Methanol wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, dreimal mit Äther-Chloroform (3:1)

extrahiert und mit 0,5-n. Sodalösung auf übliche Weise in 57% neutrale und 43% saure Anteile zerlegt.

Die neutralen und sauren Anteile des Oxydationsgemisches wurden separat präparativ papierchromatographisch im System Bush B₃ aufgetrennt. Aus dem Neutralteil wurde in der obersten Zone unverändertes VII, dann weiter nur noch aus der 3. Zone ein kristallisiertes Produkt (4,7 mg) erhalten. Es schmolz nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther bei 227–228° und erwies sich mit dem unter a) beschriebenen 3-Dehydro-SEF (IX) als identisch.

c) Aus Allopregnan-3 β -ol-20-on-16 α ,17 α -epoxyd (IV) über VI: 20 mg des Epoxyds IV wurden analog wie unter a) beschrieben in 2 ml Pyridin mit 2 ml 1-proz. Chromtrioxyd-Pyridin-Lösung 16 Std. bei 20° dehydriert. Der Neutralteil (20 mg) bestand zu 60% aus dem Epoxyd VI (violette Fluoreszenz mit Antimontrichlorid) und zu 40% aus Ausgangsmaterial (gelbe Fluoreszenz mit Antimontrichlorid). Bei der Chromatographie an 1 g Silicagel (mit 15% Wassergehalt) in Benzol wurden die drei ersten Benzolfractionen (je 5 ml) vereinigt und aus Methanol-Äther umkristallisiert. Das *Allopregnan-3,20-dion-16 α ,17 α -epoxyd* (VI) schmolz bei 210–213°.

10 mg VI wurden mit 10 Äquiv. Chrom(II)-acetat in insgesamt 2,25 ml Eisessig auf die übliche Weise (s. oben) reduziert. Das Rohprodukt (10,6 mg) chromatographierte man in Benzol an 1 g Silicagel (enthaltend 15% Wasser) und vereinigte die Fraktionen 7–12, erhalten durch Elution mit Chloroform und Chloroform-Aceton (9:1). Aus Aceton-Äther erhielt man wiederum das Allopregnan-16 α -ol-3,20-dion (IX) vom Smp. 226–227°.

16 α -Acetoxy-allopregnan-3,20-dion (XII). – a) Aus IX: Die Acetylierung erfolgte in Pyridin auf übliche Weise. Nach zweimaliger Kristallisation aus Äther-Hexan erhielt man XII in feinen Nadeln vom Smp. 145–147°.

b) Aus Mono-16-O-acetyl-allopregnan-3 β ,16 α -diol-20-on (X): Die Oxydation mit Chromtrioxyd in Pyridin wurde in üblicher Weise durchgeführt. Das aus Äther-Hexan kristallisierte Produkt XII war nach Smp., Misch-Smp., IR.-Spektrum und papierchromatographischem Verhalten identisch mit der gemäss a) erhaltenen Verbindung.

Die Mikroanalysen verdanken wir Herrn Dr. H. GYSEL, die Aufnahme der IR.-Spektren Herrn Dr. E. GANZ, die Ausführung der andern physikalischen Messungen den Herren Dr. R. ROMETSCH und Dr. F. W. WOOD. Für Hilfe bei der Papierchromatographie sind wir Herrn E. VON ARX dankbar.

SUMMARY

A new crystalline substance has been isolated from hog adrenals in a yield of about 30 mg per 1000 kg glands. It appears to act under certain biological conditions as a sodium excreting factor. This compound is shown to be 3 β ,16 α -dihydroxy-allopregnan-20-one; several syntheses of it as well as a number of derivatives are described.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung
