

140. Untersuchungen über Organextrakte.

(12. Mitteilung¹)).

Über Keto-steroide aus Schweinetestes-Extrakten

von V. Prelog, E. Tagmann, S. Lieberman und L. Ruzicka.

(10. V. 47.)

In zwei früheren Mitteilungen²)³) haben wir bereits über Untersuchungen von Steroiden aus Schweinetestes-Extrakten berichtet. Es ist uns jedoch damals nicht gelungen, das androgene Hormon⁴) aus Schweinetestes zu isolieren oder zu identifizieren. Wir haben deshalb die Versuche zur Isolierung des androgenen Hormons aus Schweinetestes wieder aufgenommen und dabei unsere Aufmerksamkeit besonders den Keto-steroiden gewidmet, da es sich herausgestellt hat, dass der Hauptanteil des Wirkstoffes dieser Verbindungsgruppe angehört.

Die Aufarbeitung des Extraktes, welche unter Verwendung aller bisher an Organextrakten in unserem Laboratorium gesammelten Erfahrungen durchgeführt wurde, ist in den Tabellen 1 und 2 schematisch dargestellt.

Im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen⁵) haben wir diesmal die Aufarbeitung durch Bestimmung der androgenen Wirksamkeit der wichtigsten Fraktionen verfolgt. Die biologische Auswertung wurde nach dem Verfahren von *Fussgänger* von Hrn. Dr. E. Tschopp in der biologischen Abteilung der *Ciba* Aktiengesellschaft in Basel ausgeführt⁶)⁷).

Ein Blick auf die Tabellen 1 und 2 zeigt, dass sich der grösste Teil des androgenen Hormons in denjenigen Fraktionen befand, welche die mit Digitonin nicht fällbaren Ketone enthielten. Durch Chromatographie dieser Fraktionen an Aluminiumoxyd liess sich zwar der Wirkstoff anreichern; es ist jedoch nicht gelungen, aus den Konzentraten eine krystalline Verbindung zu erhalten. Die Eigenschaften der wirksamen Fraktionen wiesen darauf

¹) 11. Mitt. Helv. **30**, 113 (1947).

²) L. Ruzicka und V. Prelog, Helv. **26**, 975 (1943).

³) V. Prelog und L. Ruzicka, Helv. **27**, 61 (1944).

⁴) Als androgene Hormone bezeichnen wir solche Verbindungen, welche im Kapuunenkamm-Test wirksam sind.

⁵) Vgl. Helv. **26**, 976 (1943).

⁶) Wir danken der *Ciba*-Aktiengesellschaft für die Durchführung der biologischen Prüfung.

⁷) Vgl. Helv. **29**, 441, Fussnote 4 (1946). Die Wirksamkeit wird von uns in internationalen H.K.E. angegeben: 1 H.K.E. = 15 γ Testosteron.

hin, dass es sich um Testosteron oder um eine nahe verwandte Verbindung handeln könnte. Nachdem Vorversuche gezeigt haben, dass das Testosteron aus benzolischer Lösung praktisch quantitativ in kalte konz. Salzsäure¹⁾ übergeht, wurden die wirksamen Fraktionen nach diesem Verfahren behandelt. Aus dem hergestellten Konzentrat konnte wieder keine krystalline Verbindung erhalten werden. Durch das charakteristische Absorptionspektrum im Infrarot liess sich jedoch die Anwesenheit des Testosterons (I) in diesem Anteil sehr wahrscheinlich machen²⁾.

Tabelle 1.

209 kg Testes mit
Aceton extrahiert

Acetonextrakt: 3,54 kg
in ätherischer Lösung mit verd. Kalilauge gewaschen

ätherlösliche, saure Anteile: 0,88 kg

ätherlösliche, neutrale Anteile: 2,37 kg
mit Petroläther behandelt usw.

Cholesterin: 225 g

zwischen Petroläther und 70%
Alkohol verteilt

Rückstand aus der Petroläther-Lösung:
1,9 kg (0 H.K.E./kg)

Lösung in 70-proz. Alkohol im Vak.
eingedampft. Rückstand: 211,5 g
(30 H.K.E./kg) „molekular“ destilliert

Rückstand: 75 g

Destillat bis 150°
mit Petroläther behandelt usw.

Cholesterin: 27,0 g

cholesterinarmes Destillat:
109,7 g (27 H.K.E./kg) 4-mal mit
Girard-Reagens T behandelt

nicht reagierende Anteile:
96,1 g (8—9 H.K.E./kg)

Ketone: 5,0 g (17—20 H.K.E./kg)
(vgl. Tabelle 2)

¹⁾ Ein ähnliches Verfahren, das Ausschütteln mit 70-proz. Schwefelsäure, wurde, U.S.A. Patent 2 175 963, von *K. David, E. Dingemanse, J. Freud* und *E. Laqueur*, Z. physiol. Ch. **233**, 281 (1935) bei der ersten Isolierung von Testosteron aus den Stiertestes verwendet.

²⁾ Für die Aufnahme und Interpretierung des Infrarotspektrums danken wir Hrn. Dr. *K. Dobriner* und Dr. *R. N. Jones* vom *Sloan-Kettering* Institute for Cancer Research, New York.

Tabelle 2.

Ketone: 5,0 g (17—20 H.K.E./kg) mit Digitonin gefällt

fällbare Anteile: 0,78 g (1-2 H.K.E./kg)
mit *Girard-Reagens T* behandelt

nicht fällbare Anteile: 2,97 g (17—20 H.K.E./kg)
Chromatogramm B

nicht fällbare Anteile: 2,97 g (17–20 H.K.E./kg)
Chromatogramm B

Ketone	Chromato-
A 5—6: Cholestan-	
A 8—24: Allo-preg-	
Δ^5 -Pregn-	

HCl-löslich (2 H.K.E./kg)
Chromatogramm F
in F 5-11 (2 H.K.E./kg):
Testosteron

Bemerkenswert ist der Unterschied zwischen Schweinetestes-Extrakten einerseits und Stiertestes-¹⁾ und Hengsttestes-Extrakten²⁾ anderseits. Während für die androgene Wirksamkeit der beiden letzteren Extrakte anscheinend in der Hauptsache Testosteron verantwortlich ist, welches daraus ohne grosse Schwierigkeiten isoliert werden kann, scheint das androgene Hormon des Schweinetestes komplexer Natur zu sein und die Isolierung des Testosterons ist durch Begleitstoffe ausserordentlich erschwert.

Von den Keto-steroiden mit 21 Kohlenstoffatomen konnten wir auch diesmal das Allo-pregnol-(3 β)-on-(20) (III) und das Δ^5 -Pregnol-(3 β)-on-(20) (II) isolieren. Wir möchten nochmals darauf hinweisen, dass das Δ^5 -Pregnol-(3 β)-on-(20) entweder auf direktem oder indirektem Wege eine physiologische Wirkung auf männliche Gonaden ausübt³⁾ und dass es daher zu den natürlichen männlichen sexuellen Hormonen zu zählen ist, obwohl es im Kapaunenkamm-Test und Samenblasen-Test keine Wirkung besitzt.

Neben den beiden schon früher erhaltenen Verbindungen konnte im Laufe der vorliegenden Untersuchung das Allo-pregnol-(3 α)-on-(20) (IV) isoliert und identifiziert werden⁴⁾. Diese Verbindung wurde bisher in der Natur nur im Harn schwangerer Frauen von *Marker* und Mitarbeitern⁵⁾ aufgefunden.

Ebenso wie aus anderen Organextrakten konnten wir auch aus Schweinetestes-Extrakten einige Keto-sterioide mit 27 Kohlenstoffatomen isolieren. Die schonende Aufarbeitung, bei welcher die Verseifung nicht verwendet wurde, führte dazu, dass wir statt des früher isolierten $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-ons-(7) das Δ^5 -Cholesten-on-(3 β)-on-(7) (VII) erhielten. Es liess sich weiter eine kleine Menge von Δ^4 -Cholestenon-(3) (V) isolieren, welches ebenfalls bereits aus anderen Organextrakten gewonnen werden konnte⁶⁾. Beide Verbindungen bilden sich verhältnismässig leicht durch Oxydation aus Cholesterin. Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, dass sie, trotz aller Sorgfalt, bei der Aufarbeitung entstanden sind.

Daneben ist es uns gelungen, im Schweinetestes-Extrakt einen weiteren Vertreter der Ketone mit 27 Kohlenstoffatomen, das

¹⁾ Vgl. *F. Steinmann*, Diss. E.T.H. Zürich 1946.

²⁾ Vgl. *Helv.* **29**, 440 (1946).

³⁾ Vgl. die neueren Arbeiten von *P. Gasche* und *W. Schuler*, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **4**, C 11—12 (1946); *G. Masson*, *Am. J. Med. Sci.* **209**, 324 (1945), *Chem. Abstr.* **39**, 2792 (1945); *Am. J. Med. Sci.* **212**, 1 (1946), *Chem. Abstr.* **40**, 6144 (1946).

⁴⁾ Es ist interessant, dass sowohl das isolierte als auch das synthetische Allo-pregnol-(3 α)-on-(20) in der Wärme einen deutlichen moschusähnlichen Geruch besitzt.

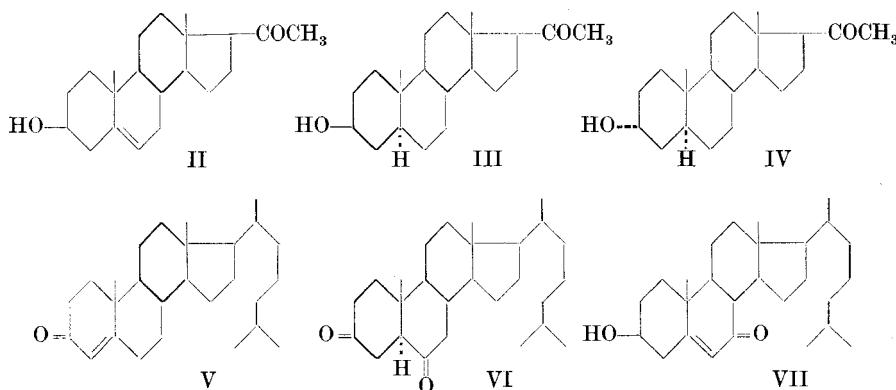
⁵⁾ *R. E. Marker*, *O. Kamm* und *R. V. McGrew*, *Am. Soc.* **59**, 616 (1937).

⁶⁾ Vgl. *Ann. Rev. Biochem.* **14**, 252 (1946) und *V. Prelog* und *H. C. Beyerman*, *Exper.* **1**, 64 (1945).

Cholestan-dion-(3, 6) (VI) aufzufinden. Diese Verbindung ist deshalb interessant, weil sie bisher u. W. weder in den Produkten der Autoxydation oder Photooxydation des Cholesterins noch in Organextrakten aufgefunden wurde. Da das Cholestan-dion-(3, 6) in grösseren Mengen als die andern Keto-steroide mit 27 Kohlenstoffatomen isoliert werden konnte, neigen wir zur Ansicht, dass es ein genuines Stoffwechselprodukt darstellt. Es sei daran erinnert, dass gerade in der Galle des Schweines ein anderes 3,6-disubstituiertes Steroid, die Hyo-desoxycholsäure (3,6-Dioxy-cholansäure) vorkommt.

Es wurden demnach bisher aus Schweinetestes-Extrakten folgende Keto-steroide isoliert:

- C₂₁-Reihe: Δ^5 -Pregnen-ol-(3 β)-on-(20) (II),
 Allo-pregnan-ol-(3 β)-on-(20) (III),
 Allo-pregnan-ol-(3 α)-on-(20) (IV),
 Testalolon (?)
- C₂₇-Reihe: Δ^4 -Cholesten-on-(3) (V),
 Cholestan-dion-(3, 6) (VI),
 Δ^5 -Cholesten-ol-(3 β)-on-(7) (VII) bzw.
 $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7).



Für die Durchführung dieser Arbeit konnten Mittel aus den *Eidg. Arbeitsbeschaffungskrediten* verwendet werden.

Experimenteller Teil¹⁾.

Als Ausgangsmaterial diente ein Acetonextrakt, welcher nach einer früher angegebenen Vorschrift²⁾ aus 209 kg frischen Schweinetestes von den *Wilson Laboratories Inc.*, Chicago, USA., hergestellt worden war.

Allgemeine Aufarbeitung.

Der Extrakt, welcher 3,54 kg wog, wurde in 25 Liter peroxydfreien Äthers³⁾ gelöst und die Lösung durch eine Glasfilternutsche von einer kleineren Menge (55 g) eines unlöslichen Rückstandes abfiltriert.

¹⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

²⁾ *Helv.* **26**, 982 (1943).

³⁾ Es wurde darauf geachtet, dass während der ganzen Untersuchung nur peroxydfreier Äther verwendet wurde.

Die filtrierte ätherische Lösung wurde im Stickstoff-Atmosphäre nach dem früher beschriebenen Verfahren¹⁾ durch Durchtropfenlassen von verdünnter Kalilauge von sauren Anteilen befreit. Bei dem mit grösster Sorgfalt durchgeführten Waschen erhielten wir 2,035 kg neutraler Anteile. Die alkalischen Waschwasser wurden mit 4-n. Salzsäure angesäuert und mit Äther erschöpfend, zuletzt in einem Rühreextraktor, extrahiert. Die so erhaltenen ätherlöslichen sauren Anteile wurden wieder in 25 Liter Äther gelöst und nochmals mit verdünnter Kalilauge gewaschen. Im Äther blieben dabei 290 g neutraler Anteile, welche beim ersten Waschen mitgerissen wurden. Mit den sauren Anteilen wurde die Operation noch zweimal wiederholt, wobei noch 35,9 g und 10,7 g neutrale Anteile gewonnen werden konnten.

Die vereinten neutralen Anteile, welche 2,37 kg wogen, wurden mit 4 Liter tiefstiedendem Petroläther geschüttelt, wobei der Hauptanteil des Cholesterins ungelöst blieb. Das rohe Cholesterin wurde mehrmals aus Aceton umgelöst, bis es einen konstanten Smp. von 146,5—147,5° zeigte. Es liessen sich auf diese Weise 225 g reines Cholesterin abtrennen.

Die eingedampften Cholesterin-Mutterlaugen vereinigte man mit der Petroläther-Lösung der Hauptmenge der neutralen Anteile. Diese wurde mit Petroläther auf 12 Liter verdünnt und die verdünnte Lösung im Scheidetrichter 20-mal mit je 2 Liter 70-proz. Alkohol geschüttelt. Die wässrig-alkoholische Lösung dampfte man bei 25—38° in Kohlendioxyd-Atmosphäre im Vakuum ein.

Der Rückstand, welcher praktisch den ganzen androgenen Wirkstoff enthielt, wurde einer Molekular-Destillation unterworfen, wobei eine Kurzweg-Destillationsapparatur zur Verwendung kam, welche der von G. Utzinger²⁾ beschriebenen Apparatur nachgebildet wurde. Bis 150° gingen 136,9 g eines teilweise krystallinen Destillates über.

Durch Schütteln mit 200 cm³ tiefstiedendem Petroläther und Umkrystallisation des nicht gelösten Niederschlags aus Aceton konnten daraus 27,0 g reines Cholesterin vom Smp. 146,5—147,5° abgeschieden werden.

Der vom Hauptanteil des Cholesterins befreite Anteil wog 109,7 g und wurde 4-mal mit Girard-Reagens T behandelt, wobei nacheinander 3,78 g, 0,77 g, 0,33 g und 0,14 g, also insgesamt 5,0 g reagierende Anteile abgeschieden werden konnten, welche ungefähr $\frac{2}{3}$ der androgenen Wirksamkeit zeigten. Die nicht reagierenden Anteile wogen 96,1 g und zeigten ungefähr $\frac{1}{3}$ der androgenen Wirksamkeit. Dies ist um so bemerkenswerter, als wir diesmal bei der Behandlung mit Girard-Reagens T einen besonderen Wert auf die quantitative Erfassung aller Ketone legten, unter Verzicht auf eine scharfe Abtrennung der nichtketonischen Anteile³⁾.

Die mit Girard-Reagens T abgetrennten Ketone wurden in 240 cm³ Feinsprit heiß gelöst und mit einer heißen Lösung von 6 g Digitonin in 240 cm³ Feinsprit und 120 cm³ Wasser versetzt. Das schwer lösliche Digitonid begann sich sofort abzuscheiden und wurde nach 12 Stunden abfiltriert. Auf übliche Weise⁴⁾ wurden sowohl aus dem schwer löslichen Digitonid als auch aus der Mutterlauge davon mit Pyridin und Äther die Ketone regeneriert.

Isolierung einzelner Keto-steroide.

Die mit Digitonin fällbaren Anteile im Gewicht von 0,78 g, welche praktisch keine androgen wirksamen Stoffe enthielten, wurden nochmals auf übliche Weise mit Girard-Reagens T behandelt, um die evtl. mitgerissenen nichtketonischen Anteile zu entfernen. Wir erhielten dabei 250 mg mit Girard-Reagens T nicht reagierende und 500 mg reagierende Anteile. Diese letzteren unterwarfen wir, in Petroläther gelöst, einer chromatographischen Analyse an 20 g Aluminiumoxyd (Aktivität II—III), wobei Fraktionen von 50 cm³ Eluat aufgefangen wurden (Chromatogramm A).

¹⁾ Helv. **28**, 586 (1945).

²⁾ Chemie **56**, 130 (1943); Chem. Techn. **16**, 61 (1943).

³⁾ Vgl. Helv. **26**, 986 (1943); **28**, 587 (1945).

Chromatogramm A.

Frakt.	Eluierungsmittel	Eluat mg	isierte Verbindung
1—4	Petroläther . . .	30	
5—6	Benzol	30	VI
7	Benzol	20	
8—20	Benzol	115	II und III
21—24	Benzol	15	II
25—26	Äther	25	
27—29	Äther	60	VII
30—35	Äther	5	
36—37	Methanol	30	

Cholestan-dion-(3,6) (VI)¹⁾.

Fraktion A 6 schmolz nach 4-maligem Umlösen aus Methanol bei 167—169⁰²⁾. Dasselbe Produkt wurde auch durch Umkrystallisation der Fraktion A 5 erhalten. Die Verbindung gab mit einem authentischen Vergleichspräparat keine Schmelzpunktserniedrigung. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 145—150⁰ sublimiert.

3,137 mg Subst. gaben 9,291 mg CO₂ und 3,152 mg H₂O
 $C_{27}H_{44}O_2$ Ber. C 80,94 H 11,07%
 Gef. „, 80,83 „, 11,24%

Allo-pregnano-ol-(3 β)-on-(20) (III) und Δ^5 -Pregnano-ol-(3 β)-on-(20) (II)³⁾.

Die krystallisierten Fraktionen A 8—20 wurden aus Chloroform-Petroläther umgelöst. Die erhaltenen derben Prismen schmolzen bei 184—188⁰ und gaben mit Tetranitromethan eine schwache Gelbfärbung. Das Drehungsvermögen, die Analyse und die Mischprobe dieser Fraktionen wiesen darauf hin, dass es sich um ein Gemisch von Allo-pregnano-ol-(3 β)-on-(20) und Δ^5 -Pregnano-ol-(3 β)-on-(20) handelt. Die Fraktionen A 8 und 9 besaßen z. B. ein $[\alpha]_D^{15} = +52^0 \pm 3^0$ (c = 0,833 in Chloroform).

Die Fraktionen A 21—24 gaben nach dreimaligem Umlösen aus Chloroform-Petroläther derbe Prismen vom Smp. 186—187⁰, welche zur Analyse im Hochvakuum bei 120⁰ sublimiert wurden. Wie das Drehungsvermögen und die Analyse zeigen, handelt es sich um das Δ^5 -Pregnano-ol-(3 β)-on-(20).

$[\alpha]_D^{15} = +34^0 \pm 5^0$ (c = 0,412 in Chloroform)
 3,622 mg Subst. gaben 10,579 mg CO₂ und 3,319 mg H₂O
 $C_{21}H_{32}O_2$ Ber. C 79,70 H 10,19%
 Gef. „, 79,71 „, 10,25%

 Δ^5 -Cholesten-ol-(3 β)-on-(7) (VII).

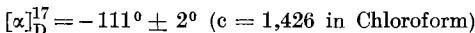
Die Fraktionen A 27—29 wurden aus Aceton-Petroläther 4-mal umkrystallisiert. Die erhaltenen Nadeln schmolzen bei 158—170⁰ und gaben mit einem authentischen Ver-

¹⁾ Der grösste Teil des Cholestan-dions-(3,6) wurde in dem mit Digitonin nicht fällbaren Anteil gefunden (vgl. weiter unten). Über die Fällbarkeit von 3-Keto-steroiden mit Digitonin vgl. L. Velluz, A. Petit und M. Pesez, Bl. 1946, 558.

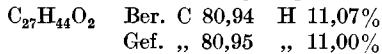
²⁾ I. M. Heilbron, E. R. H. Jones und F. S. Spring, Soc. 1937, 804: Smp. 169⁰; B. Ellis und V. A. Petrow, Soc. 1939, 1082: Smp. 169—171⁰; L. Ruzicka und Mitarb., Helv. 19, 1150 (1936), geben einen etwas höheren Smp. von 174—175⁰ an.

³⁾ Vgl. Helv. 26, 989 (1943).

gleichspräparat keine Schmelzpunktserniedrigung¹⁾. Zur Analyse wurde bei 75° im Hochvakuum getrocknet.



3,686 mg Subst. gaben 10,933 mg CO₂ und 3,621 mg H₂O



Durch Acetylierung mit Acetanhydrid-Pyridin bei Zimmertemperatur wurde ein aus Methanol in Blättchen krystallisierendes Acetat vom Smp. 154—156° hergestellt, welches mit Δ^5 -Cholesten-ol-(3 β)-on-(7)-acetat keine Schmelzpunktserniedrigung gab.

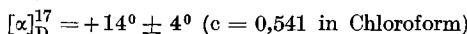
Die mit Digitonin nicht fällbaren Anteile wogen 2,97 g und enthielten praktisch alle androgen wirksamen Ketone. Sie wurden in Petroläther gelöst und an 100 g Aluminiumoxyd (Aktivität II—III) chromatographiert. Pro Fraktion hat man 50 cm³ Eluat aufgefangen (Chromatogramm B).

Chromatogramm B.

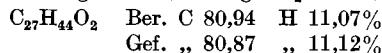
Frakt.	Eluierungsmittel	Eluat mg	
1—10	Petroläther . . .	70	
11—14	Benzol	550	Chromatogramm C
15—24	Benzol	160	VI
25—39	Benzol	140	Chromatogramm D
40—42	Äther	470	Chromatogramm E
43—48	Äther	260	
49—58	Äther	145	
59—61	Methanol	800	

Cholestan-dion-(3,6) (VI).

Die Fraktionen B 15—20 waren krystallin und schmolzen bei 163—164°. Nach 4-maligem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther stieg der Schmelzpunkt auf 166—167°. Die Verbindung gab mit einem authentischen Cholestan-dion-(3,6) keine Schmelzpunktserniedrigung. Zur Analyse wurde bei 150° im Hochvakuum sublimiert.

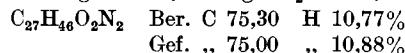


3,681 mg Subst. gaben 10,907 mg CO₂ und 3,659 mg H₂O



Das Dioxim des Cholestan-dions-(3,6) schmolz nach 4-maligem Umlösen aus Methanol bei 203—205°²⁾. Zur Analyse wurde bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

3,682 mg Subst. gaben 10,119 mg CO₂ und 3,581 mg H₂O



Die Fraktionen B 11—14 zeigten eine starke positive Drehung. Sie wurden vereinigt und in Petroläther gelöst erneut an 25 g Aluminiumoxyd (Aktivität I—II) chromatographiert (Chromatogramm C), Eluatmenge pro Fraktion 25 cm³.

¹⁾ S. Bergström und O. Wintersteiner, J. Biol. Chem. 141, 602 (1941) geben an: Smp. 170—172°, $[\alpha]_D^{23} = -104^\circ$ (in Chloroform).

²⁾ I. M. Heilbron und Mitarb., Soc. 1937, 804: Smp. 202°.

Chromatogramm C.

Frakt.	Eluierungsmittel	Eluat mg	$[\alpha]_D$
1—13	Petroläther	152	+ 2°
14—30	Petroläther	66	+ 17°
31—35	Petroläther-Benzol 5:1	68	+ 40° bis + 48°
36—54	Äther	219	+ 13°

 Δ^4 -Cholesten- α -(3) (V).

Die Fraktionen C 31—35 wurden vereinigt und im Hochvakuum „molekular“ destilliert.

Badtemperatur	Menge mg	$[\alpha]_D$
bis 75°	16	+ 23°
75—120°	36	+ 60°
Rückstand	12	—

Das Öl, welches zwischen 75 und 120° destillierte, wurde in Petroläther gelöst und nochmals an 0,8 g Aluminiumoxyd (Aktivität I) chromatographiert. Die Petroläther-Benzol-Eluate krystallisierten nach Zugabe von Methanol und schmolzen bei 76—79°, $[\alpha]_D^{19} = + 81^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,570 in Chloroform). Das Produkt zeigte in alkoholischer Lösung im U.V. ein für α, β -ungesättigte Ketone charakteristisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 2450 Å und $\log \epsilon = 4,2$.

Zur weiteren Charakterisierung wurde das o-Tolyl-semicarbazon vom Smp. 229—230° hergestellt, welches mit einem Vergleichspräparat keine Schmelzpunktserniedrigung zeigte. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

2,460 mg Subst. gaben 7,111 mg CO₂ und 2,196 mg H₂O

C₃₅H₅₃ON₃ Ber. C 79,04 H 10,05%
Gef. „ 78,89 „ 9,99%

Die vereinigten Fraktionen B 25—39 wurden im Hochvakuum „molekular“ destilliert.

Badtemperatur	Menge mg	$[\alpha]_D$	Wirksamkeit/kg
bis 80°	80	+ 23°	1 H.K.E.
80—130°	45	— 9°	0 H.K.E.
Rückstand	10	—	

Das bis 80° übergehende ölige Destillat löste man in Petroläther und chromatographierte an 3,0 g Aluminiumoxyd (Aktivität II—III) (Chromatogramm D). Pro Fraktion wurden 25 cm³ Eluat aufgefangen.

Chromatogramm D.

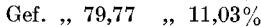
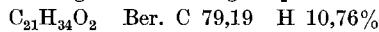
Frakt.	Eluierungsmittel	Eluat mg	
1—4	Petroläther	15	
5—8	Benzol	30	IV
9—12	Äther	Spuren	
13	Methanol	20	

Allo-pregnano-l-(3 α)-on-(20) (IV).

Nach 3-maligem Umlösen der krystallinen Fraktionen D 5—8 aus Aceton-Petroläther erhielten wir feine Nadeln vom Smp. 168—170°, welche mit Allo-pregnano-l-(3 α)-on-(20)¹⁾²⁾ keine Schmelzpunktserniedrigung zeigten. Die Verbindung gab keine Gelbfärbung mit Tetranitromethan. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 120—125° sublimiert.

$$[\alpha]_D^{16} = +96^0 \pm 4^0 \quad (c = 0,477 \text{ in Chloroform})$$

2,014 mg Subst. gaben 5,887 mg CO₂ und 1,985 mg H₂O



Das auf übliche Weise hergestellte Acetat schmolz bei 138—140° und gab mit Allo-pregnano-l-(3 α)-on-(20)-acetat keine Schmelzpunktserniedrigung.

Nachweis des Testosterons.

Die biologische Prüfung hat ergeben, dass sich der grösste Teil der androgen wirksamen Verbindungen in den Fraktionen B 40—42 befindet. Diese Fraktionen wurden zuerst „molekular“ destilliert.

Badtemperatur	Menge mg	$[\alpha]_D$	Wirksamkeit
bis 80° . . .	80	+3°	3 H.K.E./kg
80—130° . . .	240	+8°	8 H.K.E./kg
Rückstand . . .	140	—	

Die beiden Destillate wurden vereinigt und in Petroläther-Lösung an 10 g Aluminiumoxyd (Aktivität III) chromatographiert (Chromatogramm E). Für die Eluierung verwendete man 30 cm³ Lösungsmittel pro Fraktion.

Chromatogramm E.

Frakt.	Eluierungsmittel	Eluat mg	Wirksamkeit
1—4	Petroläther	27	
5—8	Petroläther-Benzol 9 : 1.	5	
9—12	Petroläther-Benzol 2 : 1.	33	
13—19	Petroläther-Benzol 1 : 1.	90	
20—30	Petroläther-Benzol 1 : 2.	75	
31—34	Benzol-Äther 2 : 1 . . .	25	
35—37	Benzol-Äther 1 : 2 . . .	4	
38—39	Äther	1	
40—43	Äther, Methanol	44	

¹⁾ Für die Herstellung eines Vergleichspräparates aus Allo-äti-cholan-ol-(3 α)-säure danken wir Hrn. Dr. H. Heusser.

²⁾ R. E. Marker und Mitarb., Am. Soc. **59**, 617 (1937): Smp. 162—164°; $[\alpha]_D^{30} = +91^0$ ($c = 1$ in Alkohol); Acetat Smp. 139—140°; Am. Soc. **62**, 2624 (1940); Smp. 172—174°, Acetat Smp. 138—140°; A. Bartenandt und A. Heusner, Z. physiol. Ch. **256**, 242 (1938); Smp. 173—174°, Acetat Smp. 139—140°; G. Fleischer, B. Whitman und E. Schwenk, Am. Soc. **60**, 79 (1938): Smp. 176—178°, $[\alpha]_D = +87,7^0$ (in abs. Alkohol), Acetat Smp. 141—142°.

Die Hälfte des Materials, also 83 mg, aus den vereinigten Fraktionen E 13—30 wurde in 2 cm³ Benzol gelöst und 5-mal mit 0,5 cm³ konz. Salzsäure ausgeschüttelt. Die salzsäuren Auszüge verdünnte man mit 25 cm³ Eiswasser und schüttelte 2-mal mit 20 cm³ Äther aus. Die mit verdünnter Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschenen ätherischen Auszüge hinterliessen 25 mg eines gelblichen, ölichen Rückstandes, welcher in Petroläther-Lösung an 0,8 g Aluminiumoxyd (Aktivität III) chromatographiert wurde (Chromatogramm F). Pro Fraktion wurden 4 cm³ Eluierungsmittel verwendet.

Chromatogramm F.

Frakt.	Eluierungsmittel	Eluat mg	Wirksamkeit
1—4	Petroläther-Benzol 4:1.	2	
5—11	Petroläther-Benzol 1:1.	13	2 H.K.E./kg
12—16	Benzol	5	
17—22	Äther und Methanol . .	5	

Alle Fraktionen waren ölig und liessen sich nicht zur Krystallisation bringen. Die Fraktionen E 5—11 wurden vereinigt und bildeten ein fast farbloses Öl mit folgenden Eigenschaften: $[\alpha]_D = +28^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,42$ in Chloroform); das in alkoholischer Lösung aufgenommene Absorptionsspektrum im U.V. zeigte ein für α, β -ungesättigte Ketone charakteristisches Absorptionsmaximum bei 2400 Å mit einem $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 19$. Da nach der biologischen Auswertung in den Fraktionen F 5—11 im ganzen höchstens 3 mg, etwa $1/4$ des Gesamtgewichtes an Testosteron, enthalten sein könnten, stehen diese Daten nicht im Widerspruch mit der Annahme, dass die androgene Wirksamkeit dieses Konzentrates hauptsächlich durch Testosteron¹⁾ verursacht ist.

Im Infrarot-Spektrum, welches in Schwefelkohlenstoff-Lösung mit *Elmer-Perkin-Infrarot-Spektrophotometer* aufgenommen wurde, zeigen mehrere Banden die Anwesenheit von Testosteron an. Neben den Banden, welche für die Anwesenheit einer Hydroxyl-Gruppe (3610 cm⁻¹) und einer α, β -ungesättigten Keto-Gruppe in Stellung 3 des Steroid-Gerüstes (1678 cm⁻¹) sprechen, zeigt das Spektrum des Konzentrates auch im charakteristischen Gebiet zwischen 1180—875 cm⁻¹ mehrere starke Banden, die auch im Spektrum des Testosterons vorkommen. Daneben findet man im Spektrum des Konzentrates weitere schwache Banden, welche auf die Anwesenheit von Keto-steroiden mit nichtkonjugierten Carbonyl-Gruppen hinweisen²⁾.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. *W. Manser* ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

¹⁾ *L. Ruzicka* und *A. Wettstein*, Helv. **18**, 1268 (1935): $[\alpha]_D = +109^\circ$ (Alkohol); $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ bei 2380 Å = 45.

²⁾ Vgl. *R. N. Jones* und *K. Dobriner*, Federation Proceed. **6**, 265 (1946).