

### Zusammenfassung.

Unter dem Namen Aminoacyl-Einlagerung wird ein neuer Umlagerungstypus beschrieben, welcher von O-aminoacylierten  $\beta$ -Hydroxysäureamiden zu  $\beta$ -Hydroxyacyl-aminosäureamiden führt. Die  $\beta$ -Hydroxysäure kann aliphatisch oder aromatisch sein. Da der Amidstickstoff substituiert sein darf, gestattet die Reaktion den Aufbau von Peptidketten. Peptide schienen bisher nur durch Aminoacyl-Anlagerungs-Reaktionen zugänglich zu sein. Die Aminoacyl-Einlagerungs-Reaktion weist einen prinzipiell neuen Weg.

Folgende Substanzen sind durch Aminoacyl-Einlagerung hergestellt worden: Salicoyl-glycin-amid, Salicoyl-phenylalanin-amid, Salicoyl-phenylalanyl-glycin, Salicoyl-glycyl-phenylalanyl-glycin und  $\beta$ -Hydroxybutyryl-glycin-amid.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

---

## 158. Untersuchungen über Organextrakte.

27. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Über die Konzentration des Testosterons in menschlichen Testes

von R. Anliker, M. Perelman<sup>2)</sup>, O. Rohr und L. Ruzicka.

Herrn Prof. Dr. T. Reichstein zum 60. Geburtstag gewidmet.

(3. VI. 57.)

Um einen tieferen Einblick in den Steroid-Stoffwechsel von hormonal aktiven Tumoren zu gewinnen, haben wir solche Geschwülste auf ihren Gehalt an androgen und östrogen wirksamen Hormonen untersucht<sup>1)3)4)5)</sup>. In den Fällen<sup>1)4)</sup>, bei welchen mit der Entwicklung des Tumors eine deutliche Virilisierung des betroffenen weiblichen Patienten parallel ging, konnte Testosteron in einer Konzentration nachgewiesen werden, die durchaus mit derjenigen in Testesgeweben des Stieres<sup>6)</sup> und des Hengstes<sup>7)</sup> vergleichbar ist (vgl. Tab.). Diese und andere Ergebnisse stützten die Vermutung, dass die Zeichen einer Virilisierung bzw. Feminisierung ihren Grund in „tumoreigenem“ Hormon haben könnten.

<sup>1)</sup> 26. Mitt. R. Anliker, O. Rohr & L. Ruzicka, Liebigs Ann. Chem. **603**, 109 (1957).

<sup>2)</sup> Fellow in Cancer Research of American Cancer Society.

<sup>3)</sup> M. Marti & H. Heusser, Helv. **37**, 327 (1954).

<sup>4)</sup> R. Anliker, O. Rohr & M. Marti, Helv. **39**, 1100 (1956).

<sup>5)</sup> Dissertation O. Rohr, ETH., Zürich 1956.

<sup>6)</sup> K. David, E. Dingemans, J. Freud & E. Laqueur, Z. physiol. Chem. **233**, 281 (1935).

<sup>7)</sup> E. Tagmann, V. Prelog & L. Ruzicka, Helv. **29**, 440 (1946).

Deshalb schien uns ein Vergleich der aufgefundenen Mengen von Testosteron bzw. von Oestradiol in den Geschwülsten mit solchen in der gesunden menschlichen Drüse, welche die eigentliche Produktionsstätte des Testosterons ist, wesentlich. Während *J. W. Goldzieher & J. S. Roberts*<sup>8)</sup> bereits im Jahre 1952 in normalen menschlichen Testes 6  $\gamma$  Oestradiol pro Kilo Gewebe nachwiesen, ist unseres Wissens eine entsprechende Bestimmung von genuinem Testosteron<sup>9)</sup> in dieser Drüse in der Literatur noch nicht beschrieben worden, was uns veranlasste, diese Lücke zu schliessen.

Gewebe	Testosteron in $\gamma$ pro kg Gewebe <sup>11)</sup>
Stiertestes <sup>6)</sup> . . . .	100
Hengsttestes <sup>7)</sup> . . .	200
Testes Mensch . . .	216
NNR-Tumor <sup>4)</sup> . . .	45—55
Ovarial-Tumor <sup>1)</sup> . .	90

Zur chemischen Bearbeitung gelangten 5 Hodenpaare im Gesamtgewicht von 133 g, welche geschlechtlich reifen Unfallpatienten entstammten<sup>10)</sup>. Die Drüsen wurden unmittelbar *post mortem* exstirpiert und nach dem bereits früher eingehend beschriebenen Schema<sup>1)</sup> und den Angaben im experimentellen Teil aufgearbeitet. Das nach den verschiedenen Verteilungsstufen erhaltene neutrale Konzentrat G (6 mg) sowie die phenolische Fraktion H (5,5 mg) wurden durch präparative Papierchromatographie weiter aufgetrennt. Die Menge des angereicherten Testosterons wurde einerseits durch visuelle Abschätzung der UV.-Fluoreszenz des Fleckens nach Behandlung mit 2-n. Natronlauge und anschliessendem Erhitzen, andererseits auf spektrographischem Wege durch Messung der Extinktion einer Lösung in Feinsprit bei 240 m $\mu$  (Maximum) ermittelt. Die gefundenen

<sup>8)</sup> *J. clin. Endocrin.* **12**, 143 (1952).

<sup>9)</sup> *K. Savard, R. I. Dorfmann & E. Poutasse*, *J. clin. Endocrin.* **12**, 935 (1952), konnten schon durch Perfusion von menschlichen Testes mit <sup>14</sup>C-Acetat-haltigem Blut zeigen, dass die Drüse Testosteron und  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion unter Ausnützung dieser Kohlenstoffquelle aufbaut. Allerdings entstammte die Drüse einem Patienten mit Prostata-Karzinom. Angaben über die Testosteron-Konzentration in entsprechenden Geweben von gesunden Menschen wurden keine gemacht.

<sup>10)</sup> Wir danken Herrn Dr. *R. Siebenmann* (Pathologisches Institut der Universität Zürich, Leitung Prof. Dr. *E. Uehlinger*) für die Überlassung des Gewebematerials. Die Patienten standen im Alter von 29, 29, 43, 53 und 53 Jahren.

<sup>11)</sup> Diesen Mengenangaben haften selbstverständlich die schwer abzuschätzenden Fehler an, welche durch die verschiedenen Extraktions- und Bestimmungsverfahren bedingt sind. Über Versuche mit <sup>14</sup>C-Steroiden zur Ermittlung der genauen Grösse des Hormonverlustes bei der Aufarbeitung solcher Gewebe nach der hier beschriebenen Methode werden wir später berichten.

Werte zeigen eine befriedigende Übereinstimmung (180  $\gamma$  nach der Fluoreszenz und 216  $\gamma$  nach der UV.-Absorption pro Kilo Gewebe), wobei der letztere Wert der genaueren Methode<sup>12)</sup> wegen der effektiven Konzentration am nächsten kommen dürfte. Die Identität des Testosterons wurde durch seine Überführung in  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion mit Chrom(VI)-oxyd in Eisessig sichergestellt. Weiter liessen sich in der Drüse 15  $\gamma$   $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion pro Kilo Gewebe auffinden, während Androsteron und Progesteron nicht nachgewiesen werden konnten. Dagegen gelang der Nachweis von ca. 8  $\gamma$  Oestradiol pro Kilo Gewebe, womit die Messung von Goldzieher & Roberts<sup>8)</sup> eine Bestätigung erfuhr.

Wir danken der Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil<sup>13)</sup>.

*Extraktion der Testes.* Die innerhalb von 14 Tagen gesammelten und bei  $-20^{\circ}$  in Feinsprit aufbewahrten Hoden (133 g) wurden genau in der schon früher beschriebenen Weise<sup>1)</sup> aufgearbeitet, so dass auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet wird. Aus dem Acetonextrakt B (3,10 g) konnte schliesslich neben 5,5 mg phenolischen Anteilen (H) eine neutrale Fraktion G (6 mg) gewonnen werden.

*Papierchromatographische Auftrennung der Fraktion G.* Mit dem Extrakt wurden jeweils Testosteron, Androsteron,  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion und Progesteron als Markiersubstanzen parallel laufen gelassen und mittels UV.-Photokopie und Phosphormolybdänsäure-Reaktion<sup>14)</sup> (Androsteron) sichtbar gemacht. Die den einzelnen Verbindungen entsprechenden Zonen auf dem Papier (Whatman Nr. 1) wurden ausgeschnitten<sup>15)</sup>, eluiert und die Eluate weiter konzentriert. Nach einer Folge der Systeme Bush C<sup>16)</sup> (Chromatogramm i), Propylenglykol-Toluol<sup>17)</sup> (ii), zweimal Bush B 3 (iii und iv) und Propylenglykol-Toluol (v) wurde im so gewonnenen Testosteron-haltigen Eluat die Hormonmenge gemessen.

*Nachweis und Bestimmung von Testosteron.* Die eine Hälfte des Eluates wurde im System Bush B 3 parallel mit 1, 2, 4, 6, 8 und 10  $\gamma$  Testosteron chromatographiert. Die Intensität des auf der Höhe der Testsubstanz liegenden Fleckens wurde auf der UV.-Photokopie und an Hand seiner gelben UV.-Fluoreszenz nach Behandlung mit 2-n. Natronlauge und 5-minütigem Erhitzen auf  $90^{\circ}$  durch visuellen Vergleich unabhängig von zwei Personen abgeschätzt. Durchschnittswert: 12  $\gamma$ , was 180  $\gamma$  pro kg Gewebe entspricht.

Die andere Hälfte wurde im selben System chromatographiert. Die das Hoden-Testosteron enthaltende Fläche wurde ausgeschnitten und eluiert. Das im Vakuum ein-

<sup>12)</sup> In Reihenversuchen mit bekannten Mengen von Testosteron betrugen die grössten Abweichungen nach Chromatographie im System Bush B 3 im Konzentrationsbereich von 5–20  $\gamma$  pro Fleck  $\pm 10\%$ ; vgl. dazu experim. Teil.

<sup>13)</sup> Für die Einzelheiten der Methodik der Aufbereitung und der Papierchromatographie verweisen wir auf die vorangehenden Mitt. dieser Reihe.

<sup>14)</sup> D. Kritschewsky & M. R. Kirk, Arch. Biochem. Biophysics **35**, 346 (1952).

<sup>15)</sup> Der Tatsache, dass die Verbindungen in Gemischen durch Ablöseeffekte in der Regel etwas kleinere Rf-Werte zeigen, wurde wie in früheren Arbeiten durch Ausschneiden einer entsprechend breiten Zone Rechnung getragen; vgl. dazu K. Savard, Recent Progr. Hormone Res. **9**, 188 (1954).

<sup>16)</sup> I. E. Bush, Biochem. J. **50**, 370 (1952).

<sup>17)</sup> A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, Science (New York) **111**, 6 (1950); R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann, J. biol. Chemistry **188**, 763 (1951).

gedampfte Eluat wurde in 10 cm<sup>3</sup> Äther aufgenommen und zweimal mit je 1 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschen. Den Rückstand der organischen Phase löste man in 3 cm<sup>3</sup> Feinsprit und bestimmte die Extinktion bei 240 m $\mu$ , wo die Lösung das für Testosteron typische Absorptionsmaximum zeigte. Als Blindlösung diente ein ebenso behandeltes Eluat eines gleichgrossen Papierstückes, welches auf der Höhe des Testosteronfleckens dem gleichen Chromatogramm entnommen wurde. Auf Grund des Extinktions-Wertes eines reinen Präparates von Testosteron liess sich eine Menge von 14,3  $\gamma$  berechnen, was 216  $\gamma$  pro kg Gewebe entspricht.

Das aus den Testes stammende Testosteron (14,3  $\gamma$ ) wurde nach dem Verdampfen des Feinsprits in 0,5 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und mit 1 Tropfen einer Lösung von 0,9 g Chrom-(VI)-oxyd in 9 cm<sup>3</sup> 90-proz. Essigsäure bei 0° während 1 Min. oxydiert. Nach Zerstörung des Reagens mit etwas Methanol verdünnte man mit 1 cm<sup>3</sup> Wasser und ätherte aus. Die organischen Phasen wurden mit 1 cm<sup>3</sup> ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 1 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschen. Das Oxydationsprodukt zeigte im System A von *Bush* denselben Rf-Wert wie authentisches  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion. Testosteron liess sich nicht mehr nachweisen.

*Nachweis von  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion.* Das Eluat der dem  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion entsprechenden Zone im Chromatogramm iv wurde weiter in den Systemen *Bush* A, Propylenglykol-Toluol, *Bush* A und *Bush* B3 konzentriert und mittels UV.-Photokopie und Natronlauge-Reaktion lokalisiert. Der visuelle Vergleich der Intensitäten des Fleckens mit solchen bekannter Konzentration ergab 2  $\gamma$   $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion, was 15  $\gamma$  pro kg Gewebe entspricht.

*Nachweis von Oestradiol.* Analog der neutralen Fraktion wurden die Phenole (5,5 mg) angereichert. Nach Chromatographie im System Formamid-Benzol wurde das Papier in drei dem Oestron, Oestradiol und Oestriol entsprechenden Zonen aufgeteilt. Das Eluat der mittleren Zone wurde noch zweimal im System *Bush* B3 chromatographiert. Durch Sprühen mit einer wässrigen Lösung von Ferrichlorid und Kaliumferricyanid konnte auf der Höhe von parallel mitgelaufenem Oestradiol ein Fleck mit einer ebenfalls blauen Farb-reaktion sichtbar gemacht werden. Die Gehaltsbestimmung durch visuellen Vergleich der Intensitäten ergab im Mittel 1,5  $\gamma$  Oestradiol, was 8  $\gamma$  pro kg Gewebe entspricht.

### Zusammenfassung.

In menschlichen Testes wurde, neben sehr geringen Mengen  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion und Oestradiol, Testosteron in einer Menge von 216  $\gamma$  pro Kilo frisches Gewebe nachgewiesen.

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

---