

und 2 ml Acetanhydrid 1 $\frac{1}{2}$ Std. auf 50–55° erwärmt. Dann dampften wir im Wasserstrahlvakuum ein, lösten in Xylol, dampften wieder im Wasserstrahlvakuum ein und wiederholten diese Operation noch einmal mit Xylol und einmal mit Benzol. Das kristallisierte rohe 3-Äthyleneoxy-17 α -hydroxy-20-oxo-21-acetoxy- Δ^4 -pregnen wurde mit 5 ml Eisessig 3 Min. in ein Bad von 100° getaut und nach Zugabe von 0,5 ml Wasser weitere 8 Min. in diesem Bade belassen. Darauf extrahierten wir die abgekühlte und mit Wasser verdünnte Reaktionslösung dreimal mit Methylenechlorid und wuschen die organischen Lösungen mit Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser. Der Rückstand der getrockneten und im Vakuum eingedampften Methylenchloridlösungen wurde, gelöst in 5 ml Benzol, an 10 g Silicagel, enthaltend 15% Wasser, chromatographiert. Aus den mit Benzol-Essigester-(9:1)- und -(4:1)-Gemischen eluierten Fraktionen erhielten wir nach Umlösen aus Methylenchlorid-Äther-Gemisch 38 mg des Δ^4 -3-Ketons IX, das mit authentischem Vergleichsmaterial keine Erniedrigung des Smp. gab und auch ein identisches IR.-Spektrum aufwies.

Die Elementaranalysen, Spektralaufnahmen und Papierchromatogramme wurden in unseren Speziallaboratorien unter Leitung der Herren Dres. H. GYSEL, W. PADOWETZ, E. GANZ, R. ZÜRCHE, R. ROMETSCH und R. NEHER ausgeführt.

SUMMARY

The synthesis of *d,l*-17 α -hydroxyaldosterone 21-O-acetate is described.

The 17-hydroxyl group was introduced by osmium tetroxide hydroxylation of the 17,20 double bond in a 20-enolate-21-alkoxide salt.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

83. Zur Biosynthese des Aldosterons: Isolierung eines C₂₀-Steroid-Lactons aus Schweine-Nebennieren

Über Steroide, 165. Mitteilung¹⁾
von R. NEHER und A. WETTSTEIN

(19. I. 1960)

In Erweiterung und Bestätigung früherer Befunde verschiedener Gruppen²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ kommen AYRES *et al.*⁶⁾ in einer soeben erschienenen Studie zum Schluss, dass der Hauptweg der Biosynthese von Aldosteron in der *zona glomerulosa* der Nebenniere

¹⁾ 164. Mitteilung: P. WIELAND, K. HEUSLER & A. WETTSTEIN, *Helv.* **43**, 617 (1960).

²⁾ a) A. WETTSTEIN, F. W. KAHNT & R. NEHER, *CIBA Found. Coll. on Endocrinology* **8**, 160 (1954); F. W. KAHNT, R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Experientia* **11**, 446 (1955). – b) F. W. KAHNT, R. NEHER & A. WETTSTEIN, *Helv.* **38**, 1237 (1955).

³⁾ E. ROSENBERG, G. ROSENFIELD, R. UNGAR & R. I. DORFMAN, *Endocrinology* **58**, 708 (1956). – P. J. AYRES, R. P. GOULD, S. A. SIMPSON & J. F. TAIT, *Biochem. J.* **63**, 19 P (1956); P. J. AYRES, O. HECHTER, N. SABA, S. A. SIMPSON & J. F. TAIT, *ibid.* **65**, 22 P (1957); P. J. AYRES, O. HECHTER, N. SABA, J. F. TAIT & S. A. S. TAIT, *IV. International Congress of Biochemistry, Section 9, Nr. 113* (1958).

⁴⁾ a) C. J. P. GIROUD, J. STACHENKO & P. PILETTA, in: MULLER & O'CONNOR, *International Symposium on Aldosterone*, Churchill London (1958), 56. – b) J. STACHENKO & C. J. P. GIROUD, *Endocrinology* **64**, 730 (1959).

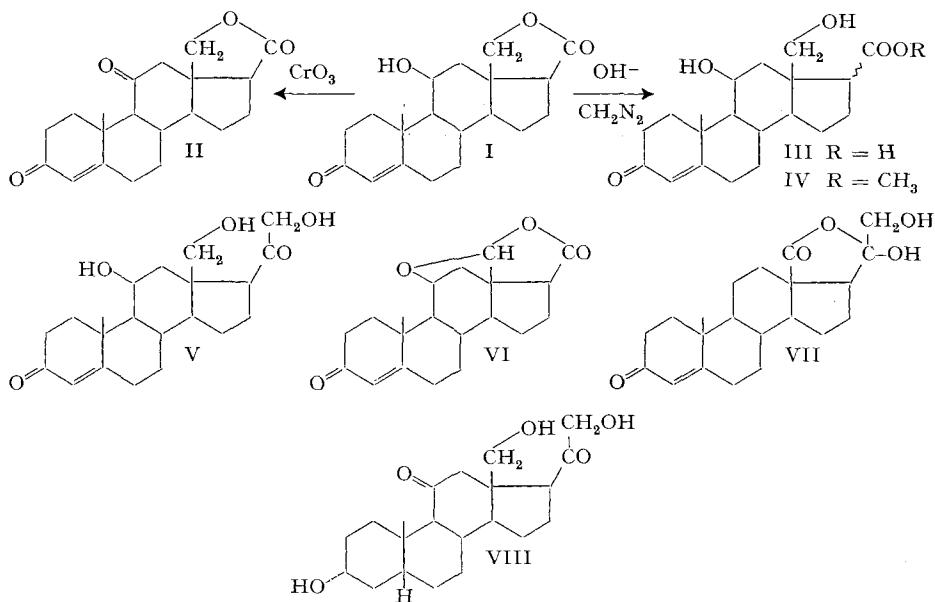
⁵⁾ R. H. TRAVIS & G. L. FARRELL, *Endocrinology* **63**, 832 (1958).

⁶⁾ P. J. AYRES, J. EICHHORN, O. HECHTER, N. SABA, J. F. TAIT & S. A. S. TAIT, *Acta endocrinol.* **33**, 27 (1960).

ausgehend von Progesteron über Cortexon und Corticosteron verläuft. Hierbei steht als letztes Glied zwischen Corticosteron und Aldosteron theoretisch das 18-Hydroxycorticosteron zur Diskussion, sowie die Möglichkeit, dass dieser Übergang durch Glomerulotropin⁷⁾ beeinflusst werde. Diese Diskussion sowie die Tatsache, dass bei der experimentellen Biosynthese von Aldosteron aus Corticosteron bedeutende Mengen von anderen Steroiden gebildet werden, veranlassen uns, über ein neues Steroid I zu berichten, das wir schon vor einiger Zeit in relativ guter Ausbeute aus Schweine-Nebennieren isolieren konnten und das sich direkt von 18-Hydroxycorticosteron ableitet.

In rohen Corticosteron-Fraktionen aus Nebennierenextrakten fiel bei der papierchromatographischen Analyse öfters eine ähnlich wie Corticosteron laufende, steroidartige Verbindung an (interne Bezeichnung A 59), die sich mit keinem der bisher aus Nebennieren isolierten Steroide identifizieren liess. Sie besass keine reduzierenden, wohl aber UV.-absorbierende Eigenschaften (240 μ -Region) und zeigte gelbe Natronlauge-Fluoreszenz. Ihre Isolierung erfolgte durch mehrfache Adsorptions- und Verteilungs-Chromatographie. Die Gesamtausbeute betrug etwa 80 mg pro Tonne tiefgefrorener Schweine-Nebennieren und entsprach somit derjenigen von Aldosteron.

Die Analyse der leicht kristallisierenden Substanz A 59 stimmte am besten auf $C_{20}H_{28}O_4$. Das IR.-Spektrum wies typische Banden für Hydroxyl-, α, β -ungesättigte Keto- und γ -Lacton-Gruppen auf. Die Verbindung liess sich unter milden Bedingungen weder acetylieren noch mit Perjodsäure oxydieren; die einzige Hydroxylgruppe



wurde hingegen mit Chromtrioxyd zu einer, nach dem IR.-Spektrum aliphatischen oder Sechsring-Ketogruppe dehydriert. Das Oxydationsprodukt II war erwartungsgemäss im Papierchromatogramm bedeutend weniger polar als A 59; seine Farb-

⁷⁾ G. L. FARRELL, Physiol. Review 38, 709 (1958).

reaktionen entsprachen aber letzterem, mit Ausnahme der Natronlauge-Fluoreszenz, die einen bläulichen Ton annahm. Die erwähnten Befunde sprachen dafür, dass A 59 neben einer Δ^4 -3-Ketogruppe eine 11β -Hydroxygruppe besitzt. Die 2 restlichen Sauerstoffatome waren in einer Fünfring-Lactongruppe festzulegen; diese blieb bei der Einwirkung von Diazomethan in neutraler Lösung unverändert. Bei der Behandlung mit methanolischer Natronlauge entstand eine Säure III, die von unverändertem A 59 papierchromatographisch abgetrennt und mit Diazomethan in einen relativ schwach polaren Ester IV übergeführt werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen sich am besten interpretieren, wenn der Substanz A 59 die Konstitution eines *3-Oxo-11 β ,18-dihydroxy- Δ^4 -ätiensäure-lactons-(20 \rightarrow 18) (I) zugeschrieben wird, wobei sich für ihre Umwandlungsprodukte die Formeln II, III und IV ergeben. Der Beweis für diese Konstitution konnte durch Vergleich mit den totalsynthetischen, racemischen Verbindungen I und II⁸⁾ erbracht werden: Sie stimmten in ihren R_S -Werten, Farbreaktionen und Spektren im IR. mit unseren Substanzen überein. Das Diketolacton II wurde schon früher von HAM *et al.*⁹⁾ durch Partialsynthese aus natürlichem Aldosteron gewonnen; eine Übertragung dieser Reaktionen auf die racemische Reihe führte jedoch bisher nicht zu den gewünschten Produkten⁸⁾.*

Diskussion

Das Lacton I stellt gewissermassen eine durch Seitenkettenabbau stabilisierte Form von 18-Hydroxycorticosteron (V) dar. Letzteres ist bisher noch nicht in Nebennieren nachgewiesen worden, sei es aus Stabilitätsgründen an sich⁸⁾, sei es, weil die Verbindung als Zwischenprodukt schnell weiterreagiert. Ob dieses Lacton seine Bildung einer biochemischen oder artifiziellen Reaktion verdankt, kann vorerst nicht entschieden werden; wir halten ersteres für wahrscheinlicher, da das durch oxydative Abbau von Aldosteron sehr leicht entstehende Lacton VI¹⁰⁾ bisher nicht aus dieser Nebennierencharge isoliert werden konnte^{10a)}. Ein anderes Lacton (VII), das bereits früher aus tiefgefrorenen Schweine-Nebennieren gewonnen worden war¹¹⁾, stellt die Halbketalform der Cortexon-18-säure dar.

Die Gewinnung von Lacton I aus Nebennieren-Extrakten weist auf das Vorkommen von 18-Hydroxycorticosteron hin, womit die Lücke auf dem Wege von Corticosteron zu Aldosteron in erwarteter Weise geschlossen wäre. Wenn auch gute Gründe dafür bestehen, dass der Hauptweg der Aldosteron-Biosynthese über Corticosteron führt⁶⁾ und das Vorkommen von 18-Hydroxycorticosteron nun sehr wahrscheinlich ist, so muss letzteres nicht vorwiegend oder nur aus Corticosteron entstanden sein; es könnte sich z. B. nach Fig. 1 aus Progesteron auch über 18-Hydroxy-

⁸⁾ J. SCHMIDLIN & A. WETTSTEIN, Helv. 43 (1960), in Vorbereitung. Die beiden racemischen Verbindungen I und II sind in anderem Zusammenhang synthetisiert worden.

⁹⁾ E. A. HAM, R. E. HARMAN, N. G. BRINK & L. H. SARETT, J. Amer. chem. Soc. 77, 1637 (1955).

¹⁰⁾ S. A. SIMPSON, J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. v. EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. 37, 1200 (1954).

^{10a)} Nach Mitteilung von Herrn Prof. T. REICHSTEIN konnte das Aldosteron-lacton VI 1955 von Herrn von EUW aus einer Charge tiefgefrorener Rinder-Nebennieren in einer Ausbeute von 1 mg/500 kg isoliert werden.

¹¹⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. 39, 2062 (1956).

cortexon durch 11β -Hydroxylierung oder über 11β -Hydroxyprogesteron und $11\beta,18$ -Dihydroxyprogesteron durch 21-Hydroxylierung bilden. Für die erste dieser Möglichkeiten als alternativer Weg kann die Bildung von 18-Hydroxycortexon in Nebennieren^{2b)} angeführt werden, für die zweite die Umwandlung von 11β -Hydroxyprogesteron in Aldosteron^{4a)}, die allerdings auch über Corticosteron als Zwischenstufe führen kann. Hierbei ist zu erwähnen, dass es nun erstmals gelang, aus genuinem Schweine-Nebennierengewebe 11β -Hydroxyprogesteron und 11 -Ketoprogesteron in einer Ausbeute von ca. 23 bzw. 25 mg pro Tonne zu isolieren (vgl. experimenteller Teil).

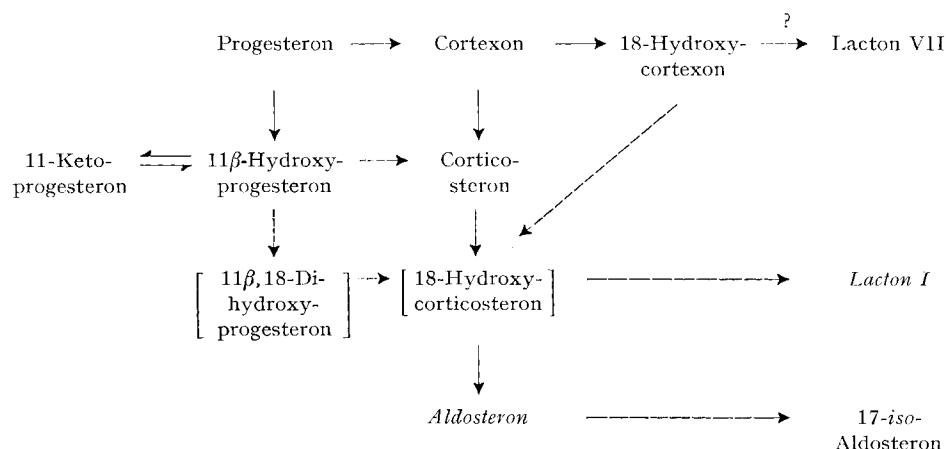


Fig. 1. Einige Möglichkeiten zur Biosynthese des Aldosterons

Ausser den in Fig. 1 skizzierten bestehen noch zwei weitere mögliche Biosynthesewege, die nicht über Corticosteron führen. Sie setzen eine primäre 18-Hydroxylierung von Progesteron voraus, wofür aber zur Zeit keinerlei experimentelle Befunde angeführt werden können.

Formal kann 18-Hydroxycorticosteron – und damit das Lacton I – natürlich auch als erster Katabolit auf dem Wege von Aldosteron zu dem Tetrahydro-Derivat VIII von ULLICK & LIEBERMAN¹²⁾ aufgefasst werden; dagegen spricht vorläufig sein Fundort, die Nebenniere, deren Funktionen überwiegend aufbauender und nicht abbauender Natur sind. Es ist immerhin denkbar, dass in den Nebennieren ein Gleichgewicht zwischen Aldosteron und 18-Hydroxycorticosteron besteht.

Ausser den genannten isolierten Verbindungen, die für die Abklärung der Biosynthese des Aldosterons von Interesse sind, haben wir aus vereinigten Aldosteron-Mutterlaugen nach mehrfacher Chromatographie noch eine weitere Aldosteron-ähnliche Verbindung in einer Gesamtmenge von ca. 250 µg nachweisen können. Sie liess sich durch genaue papierchromatographische Vergleiche¹³⁾ als 17-iso-Aldosteron identifizieren. Das einheitliche, aber immer noch amorphe Produkt zeigte keinerlei Natrium-retinierende Eigenschaften in den bei Aldosteron wirksamen Dosen. Wir

¹²⁾ S. ULLICK & S. LIEBERMAN, J. Amer. chem. Soc. 79, 6567 (1957).

¹³⁾ Die hierfür verwendeten totalsynthetischen, racemischen Verbindungen 17-iso-Aldosteron, 11-Dehydroaldosteron und 18-Hydroxycorticosteron verdanken wir Herrn Dr. J. SCHMIDLIN.

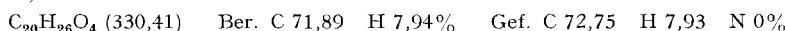
glauben, dass die gefundene Menge 17-*iso*-Aldosteron (0,1–0,2% des in dieser Charge vorhandenen Aldosterons) ein während der langwierigen Aufarbeitung¹⁴⁾ entstandenes Artefakt des natürlichen Aldosterons darstellt.

Experimenteller Teil

Isolierung von 3-Oxo-11 β ,18-dihydroxy- Δ^4 -ätiensäure-lacton-(20 \rightarrow 18) (I): Diese Verbindung A 59 wurde aus verschiedenen Fraktionen der Charge NN XI (Extrakt aus 2 Tonnen tiefgefrorener Schweine-Nebennieren, der früher zur Gewinnung anderer Steroide gedient hatte¹⁴⁾), isoliert. Aufgearbeitet wurde z. B. in folgender Weise:

Aus den Corticosteron-Mutterlaugen A II erhielt man nach 2maliger präparativer Papierchromatographie mit Formamid/Benzol-Chloroform (1:1) und Propylenglykol/Toluol nach dem früher^[14] S. 1673] beschriebenen Schema das Abtropf eluat g. Ein Teil davon (782 mg) wurde auf 60 Blatt (19 \times 37 cm) WHATMAN-Papier Nr. 1 mit Formamid/Benzol rechromatographiert, wobei Verbindung I von noch reichlich vorhandenem 11-Dehydrocorticosteron und anderen Verbindungen abgetrennt und aus dem Eluat c (unmittelbar hinter 11-Dehydrocorticosteron) in kristallisierter Form in einer Ausbeute von 11,2 mg gewonnen werden konnte. Die Abtrennung gelang auch im System Formamid/Benzol-Chloroform (1:1).

Substanz I kristallisiert aus Aceton-Äther in Körnchen vom Smp. 272–274° (Zers.) (Subl. ab ca. 250°).



Die schlechte Übereinstimmung des C-Wertes dürfte durch die sehr kleine Einwage zu erklären sein.

UV.-Spektrum (C₂H₅OH): λ_{max} 241 μ , ϵ = 15800. IR.-Spektrum (CH₃Cl₂, CHCl₃, KBr): Banden bei 2,72 μ (Hydroxyl), 5,67 μ (Lacton), 5,98 μ , 6,16 μ (α,β -unges. Keton); typische Absorption für CH₃CO-Seitenkette fehlte.

Papierchromatographie: Zur Durchführung vgl. ¹⁴⁾¹⁵⁾; Abkürzungen für Lösungsmittel: P = Propylenglykol, F = Formamid, Be = Benzol, Cy = Cyclohexan, Di = Dioxan, Tol = Toluol, BW = Butanol-Wasser. R_S-Werte von A 59 (S = Corticosteron):



P/Tol eignet sich für Lactone vom Typ I wegen zu geringer Löslichkeit (lange Flecke) weniger gut als die anderen Systeme. – Farbreaktionen: Natronlauge-Fluoreszenz gelb, Dinitrophenylhydrazin sehr schwach gelb; negativ mit Blautetrazolium, m-Dinitrobenzol, SbCl₃ und H₃PO₄.

3,11-Dioxo-18-hydroxy- Δ^4 -ätiensäure-lacton-(20 \rightarrow 18) (II): Nach Oxydation von Lacton I mit CrO₃ in Pyridin, aus Aceton-Pentan in farblosen Prismen vom Smp. 214–219° erhalten. Die Farbreaktionen entsprachen denjenigen von Substanz I mit Ausnahme der gelben NaOH-Fluoreszenz, die einen charakteristischen bläulichen Ton aufwies. Die R_S-Werte (S = Corticosteron) sind: P/Tol 3,60; F/Be 2,34; BUSH B₃^{38\circ} 1,78; BL₁^{38\circ} 1,31. Aus dem IR.-Spektrum konnte der Verlust der OH-Bande und das Auftreten einer zusätzlichen Keto-Bande bei 5,83 μ abgeleitet werden.

Isolierung von 11 β -Hydroxy- und 11-Keto-progesteron: Die Isolierung der 11 β -Hydroxyverbindung gelang zuerst ebenfalls aus einer Fraktion der Nebennieren-Charge NN XI. Aus der dort beschriebenen Unterfraktion 4 von A I¹⁶⁾ wurde durch 2malige Rechromatographie auf Papier ein einheitliches Kristallisat abgetrennt, das sich nach Papierchromatographie, Misch-Smp. und IR.-Spektrum als identisch mit authentischem 11 β -Hydroxyprogesteron¹⁷⁾ erwies. Die Gesamtausbeute betrug mindestens 23 mg in der ganzen Fraktion.

11 β -Hydroxy- ebenso wie 11-Keto-progesteron konnte auch aus den B-Fraktionen der genannten Extrakte¹⁸⁾ erhalten werden, und zwar auf Grund mehrfacher Chromatographie, wie sie

¹⁴⁾ R. NEHER, P. DESAULLES, E. VISCHER, P. WIELAND & A. WETTSTEIN, Helv. 41, 1667 (1958).

¹⁵⁾ R. NEHER, J. Chromatogr. 1, 205 (1958).

¹⁶⁾ Siehe Schema 3 auf S. 1672 und Tab. 3 auf S. 1688 in ¹⁴⁾.

¹⁷⁾ Für die freundliche Überlassung von Vergleichsmengen 11 β -Hydroxyprogesteron danken wir den Herren Prof. T. REICHSTEIN und J. v. EUW bestens.

¹⁸⁾ Siehe S. 1671 in ¹⁴⁾.

im Zusammenhang mit der Isolierung weiterer Nebennieren-Steroide demnächst genauer beschrieben wird¹⁹⁾. In F/Cy-Be (2:1) wanderte 11-Ketoprogesteron hierbei in einer Zone vom Rf-Wert 0,49–0,59 und liess sich nach Rechromatographie im System BUSH A (Zone Rf 0,22–0,29) leicht kristallisiert erhalten. Der Vergleich mit authentischem Material in Misch-Smp., Papierchromatographie und IR.-Spektren ergab Identität.

R_S-Werte (S = Cortexon):

	P/Cy-Be (1:1)	P/Tol	F/Cy-Be (1:1)	F/Be	BUSH B3 (38°)
11-Ketoprogesteron	1,00	1,22	1,35		1,15
11 β -Hydroxyprogesteron	0,52	0,81	0,74	0,95	0,80
17 α -Hydroxyprogesteron	0,64	0,86	0,93	1,01	0,90

Die NaOH-Fluoreszenz der 11-oxygenierten Derivate ist etwas schwächer als normal, diejenige von 17 α -Hydroxyprogesteron praktisch nicht vorhanden.

Nachweis von 17-iso-Aldosteron: Die vereinigten Aldosteron-Mutterlaugen aus der Charge NN XI wurden zur Abtrennung noch vorhandener Reste von Aldosteron mit P/Tol rechromatographiert. Die knapp hinter dem Farbstoff F 14 laufende Hauptzone enthielt neben viel C 1 (vgl. ¹⁹⁾) noch etwas reduzierendes Material, das durch weitere Chromatographie in F/CHCl₃ von ersterem abgetrennt werden konnte. Die sich zunächst wie Aldosteron verhaltende Verbindung kristallisierte nicht und wurde im System BUSH C rechromatographiert, worauf ein einheitliches aber immer noch amorphes Produkt resultierte; es liess sich nur in 2 von 6 Systemen, nicht aber nach seinen Farbreaktionen von Aldosteron unterscheiden. Die Gesamtausbeute an reinem Steroid, berechnet auf Grund der UV.-Absorption im Vergleich zu Aldosteron, betrug nur ca. 250 μ g.

R_S-Werte (S = Cortisol):

	P/Tol	F/Be	F/CHCl ₃	F/BW ²⁰⁾	BUSH C	Cy-Di I ²¹⁾
Aldosteron	2,55	1,20	2,25	0,40	0,97	1,03
17-iso-Aldosteron	1,83	1,26	2,22	0,41	0,92	0,73
Cortison	2,51	1,95	2,39	0,95	1,38	1,08

Die Analyse verdanken wir Herrn Dr. H. GYSEL, die IR.-Spektren den Herren Dr. E. GANZ und Dr. R. ZÜRCHER. Für die biologische Prüfung danken wir Herrn Dr. P. DESAULLES und für die Hilfe bei der Papierchromatographie Herrn E. VON ARX bestens.

SUMMARY

The isolation of a C₂₀-steroid lactone from hog adrenals and its structural elucidation as 3-oxo-11 β ,18-dihydroxy- Δ^4 -etienic acid lactone-(20 \rightarrow 18) is described. From the same source 11 β -hydroxyprogesterone, 11-ketoprogesterone, and 17-iso-aldosterone have been obtained for the first time.

The relationship of the new lactone to 18-hydroxycorticosterone and the rôle of the latter as hypothetical intermediate in the biosynthesis of aldosterone are discussed, as well as the significance of the occurrence of the other compounds isolated.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

¹⁹⁾ R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. 43 (1960), in Vorbereitung.

²⁰⁾ V. R. MATTOX & M. L. LEWBART, Arch. Biochemistry Biophysics 76, 362 (1958).

²¹⁾ P. S. CHEN, H. P. SCHEDL, G. ROSENFIELD & F. C. BARTTER, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 97, 683 (1958).