

## SUMMARY

For two series of tricyclic 1,3-diols (with tertiary-secondary and tertiary-tertiary hydroxy-groups) the existence of strong internal hydrogen bonding of the O-H $\cdots$ O type has been established by infrared spectrometry. The frequency shift  $\Delta\nu = \nu(\text{O}-\text{H})_{\text{free}} - \nu(\text{O}-\text{H}\cdots\text{O})_{\text{intern}}$  shows values in the range 110–130 cm $^{-1}$ . The influence of conformation of neighbouring groups and ring conformation on the frequency shift is discussed.

By assumption of usual bond lengths and bond angles the observed large  $\Delta\nu$  values cannot be explained by KUHN's relation; the introduction of a second parameter, as e.g. the angle  $\angle \text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ , seems to be appropriate.

Laboratorium für physikalische Chemie der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich

---

## 201. Steroide und andere Inhaltsstoffe aus Stierhoden

Über Steroide, 171. Mitteilung<sup>1)</sup>

von **R. Neher** und **A. Wettstein**

(28. VII. 60)

Seit der ersten Isolierung von Testosteron aus Stierhoden durch DAVID, DINGEMANSE, FREUD & LAQUEUR<sup>2)</sup> im Jahre 1935 wurden die männlichen Keimdrüsen wiederholt untersucht (s. Literaturangaben in Tab. 1). Von physiologischer und pathophysiologischer Seite sind zahlreiche Hinweise gegeben worden für das mögliche Vorkommen eines sogenannten zweiten Testikelhormones, welches man sich als oestrogenen oder oestrogenartigen Stoff vorstellt. Es sei hier nur auf die zusammenfassenden Darstellungen von FORBES<sup>3)</sup> und von SOHVAL<sup>4)</sup> hingewiesen.

Diese und andere Gründe haben uns veranlasst, die verschiedenen Inhaltsstoffe von Hoden, insbesondere deren Steroide, mit modernen Methoden chemisch und biologisch zu überprüfen. Über ein erstes, im Hinblick auf die Biogenese der Testes-Steroide überraschendes Ergebnis, die Isolierung von  $3\beta$ -Hydroxy-17-keto- $\Delta^5$ -androsten (DHA, Androstenolon), wurde bereits berichtet<sup>5)</sup>. Im folgenden beschreiben wir die übrigen *Neutralstoffe*, die wir in Ergänzung zu den bisher bekannten aus Extrakten von *Stierhoden* isolieren und identifizieren konnten.

**Extraktion und Auf trennung.** Als Ausgangsmaterial dienten 2000 kg tiefgefrorene Hoden von etwa 1–1½ Jahre alten Jungstieren. Die Lagerung in gefrorenem Zustand erstreckte sich über ca. 4–5 Monate. Die Extraktion und Entfettung erfolgte analog derjenigen von gefrorenen Schweine-Nebennieren, wie wir sie früher (Schemata 1

<sup>1)</sup> 170. Mitt. vgl. E. VISCHER & A. WETTSTEIN, Experientia 16, 355 (1960).

<sup>2)</sup> K. DAVID, E. DINGEMANSE, J. FREUD & E. LAQUEUR, Z. physiol. Chem. 233, 281 (1935).

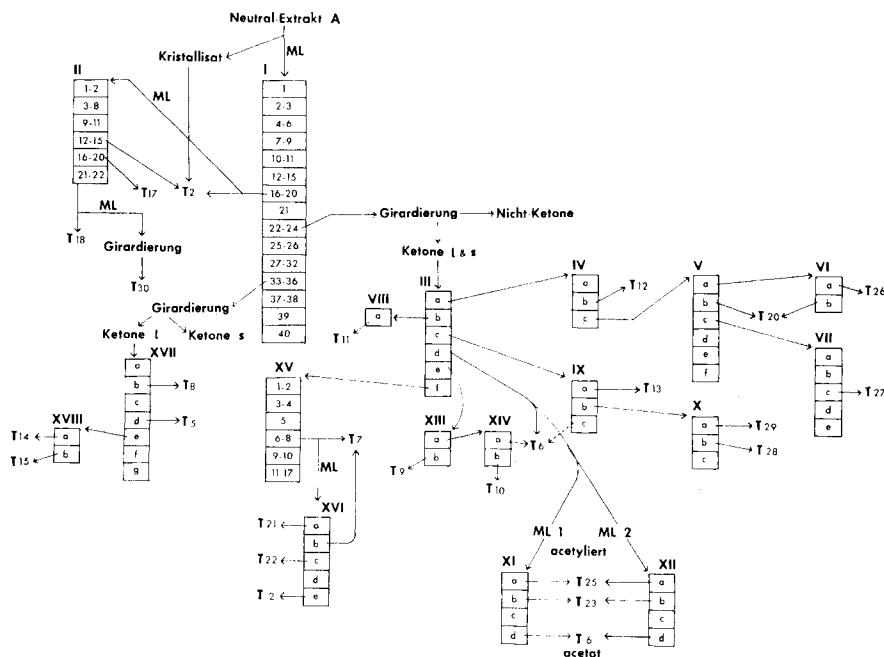
<sup>3)</sup> A. P. FORBES, in La Fonction endocrine du testicule, Masson, Paris 1957, p. 109.

<sup>4)</sup> A. R. SOHVAL, in VELARDO, ed., The endocrinology of reproduction, Oxford Univ. Press, New York 1958, p. 289.

<sup>5)</sup> R. NEHER & A. WETTSTEIN, Acta endocrinol. 35, 1 (1960).

und 2 in<sup>6</sup>) beschrieben hatten (s. auch exper. Teil). Auf diese Weise erhielten wir 2 Testes-Rohextrakte, A mit stärker polarem und B mit schwächer polarem Material.

Vor der chromatographischen Auftrennung wurde Extrakt A durch Waschen mit Hydrogencarbonat-Lösung und Kalilauge von sauren Bestandteilen befreit. Besonders bei der Lauge-Behandlung wirkte sich allerdings der hohe Gehalt an freien Fettsäuren durch Bildung äusserst stabiler Emulsionen sehr ungünstig auf die Trennoperation aus. Rund 60% des Extraktes A bestanden aus freien Fettsäuren, deren Jodzahl auf einen durchschnittlichen Gehalt von 1–2 Doppelbindungen hinwies. Nach gas-chromatographischer Analyse<sup>7</sup>) der Methylester lag ein Gemisch von 17 Säuren vor, das zu je ca. 31% aus Palmitin- und Ölsäure, zu 8% aus Stearinsäure und spurenweise aus Caprin- und Laurinsäure bestand; die restlichen 30% des Gemisches enthielten offenbar teils stärker ungesättigte, teils ungeradzahlige oder verzweigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12–21 C-Atomen. Zur Vermeidung starker Emulsionen wurde daher Extrakt B zuerst durch Girardierung<sup>8</sup>) in neutrale und



Schema der Auftrennung des von sauren Anteilen befreiten Testesextraktes A durch mehrfache Adsorptions- und Verteilungschromatographie

Silicagelsäule: I;  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säulen: II, XV; Verteilungschromatographie auf Papierblättern: III–XIV, XVI–XVIII.

ML = Mutterlauge; Ketone l und s = Ketone aus leicht bzw. schwer spaltbaren Girard-Hydrazonen.

Einzelheiten s. exper. Teil.

<sup>6</sup>) R. NEHER, P. DESAULLES, E. VISCHER, P. WIELAND & A. WETTSTEIN, Helv. 41, 1667 (1958).

<sup>7</sup>) Durchführung und Interpretation dieser Analyse verdanken wir Herrn Dr. H. ABEGG (CIBA).

<sup>8</sup>) A. GIRARD & G. SANDULESCO, Helv. 19, 1095 (1936).

Tabelle 1. Isolierung und Nachweis von Sterinen und Steroiden in natürlichem Hodengewebe und Hoden-Venenblut

	Hodengewebe	γ/kg	Hoden-Venenblut
<b>C<sub>27</sub>-Sterine</b>			
Cholesterin (T <sub>2</sub> )	Eber <sup>10)</sup> Stier*) und diverse Literaturstellen		
7β-Hydroxycholesterin (T <sub>18</sub> )	Stier <sup>2)</sup> *)		
7-Ketocholesterin (T <sub>30</sub> )	Eber <sup>9)</sup> Stier <sup>a)</sup> *)		Hund <sup>11)</sup>
7-Keto- $\Delta^{3,5}$ -cholestadien	Eber <sup>10)</sup>		
3-Keto- $\Delta^4$ -cholest	Eber <sup>9)</sup>		
3,6-Diketocholestan	Eber <sup>9)</sup>		
3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Trihydroxycholestan	Eber <sup>10)</sup>		
<b>C<sub>21</sub>-Steroide</b>			
Progesteron (T <sub>3</sub> )	Stier <sup>a)</sup> *)		Stierkalb <sup>a)</sup> <sup>12)</sup>
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (T <sub>23</sub> )	Stier*)	3,5	Stierkalb <sup>a)</sup> <sup>12)</sup>
3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (T <sub>11</sub> )	Stier*)	13,5	
3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen (T <sub>13</sub> )	Stier *)	4,4	
3 $\beta$ -Hydroxy-20-keto- $\Delta^5$ -pregnen (T <sub>17</sub> )	Eber <sup>9)</sup> <sup>10)</sup> <sup>13)</sup>		
3 $\beta$ -Hydroxy-20-keto-allopregn (T <sub>22</sub> )	Stier <sup>a)</sup> *)		
3 $\alpha$ -Hydroxy-20-keto-allopregn	Eber <sup>9)</sup>		
<b>C<sub>19</sub>-Steroide</b>			
Testosteron (T <sub>6</sub> )	Stier <sup>2)</sup> <sup>12)</sup> <sup>15)</sup> *)	251,5	Stier <sup>a)</sup> <sup>12)</sup> <sup>14)</sup> Hund <sup>11)</sup> a) <sup>17)</sup>
	Hengst <sup>16)</sup>		Eber, Hengst, Widder <sup>a)</sup> <sup>14)</sup>
	Eber <sup>a)</sup> <sup>13)</sup>		Mensch <sup>a)</sup> <sup>18)</sup>
<i>epi</i> -Testosteron (T <sub>9</sub> )	Stier*)	13	Stier <sup>a)</sup> <sup>12)</sup>
6 $\beta$ -Hydroxytestosteron (T <sub>20</sub> )	Stier*)	1,6	
15 $\alpha$ -Hydroxytestosteron (T <sub>8</sub> )	Stier*)	0,23	
16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron (T <sub>5</sub> )	Stier*)	1,95	
3,17-Diketo- $\Delta^4$ -androsten (Androstendion) (T <sub>7</sub> )	Stier <sup>12)</sup> *)	94,5	Stier <sup>a)</sup> <sup>12)</sup> <sup>14)</sup> Hund <sup>11)</sup> Eber, Hengst, Widder <sup>a)</sup> <sup>14)</sup>
3,11,17-Triketo- $\Delta^4$ -androsten (Adrenosteron) (T <sub>28</sub> )	Stier <sup>a)</sup> *)		
3 $\beta$ -Hydroxy-17-keto- $\Delta^5$ -androsten (Androstenolon, DHA) (T <sub>21</sub> )	Stier <sup>5)</sup> *)	8,05	
3 $\alpha$ -Hydroxy- $\Delta^{18}$ -androsten	Eber <sup>19)</sup>		
3 $\beta$ -Hydroxy- $\Delta^{18}$ -androsten	Eber <sup>19)</sup>		
3 $\beta$ -Hydroxy-17-keto-androstan (T <sub>22</sub> )	Stier <sup>a)</sup> *)		

## Fortsetzung von Tabelle 1

	Hodengewebe	$\gamma/\text{kg}$	Hoden-Venenblut
$\text{C}_{18}$ -Steroide			
Östron	Hengst <sup>20)</sup> Mensch <sup>a)</sup> <sup>21)</sup> [Sperma] <sup>a)</sup> <sup>22)</sup>		
Östradiol-(17 $\beta$ )	Hengst <sup>20)</sup> Mensch <sup>a)</sup> <sup>21)</sup> [Sperma] <sup>a)</sup> <sup>22)</sup> [Tumor] <sup>23)</sup>		
Östriol	Mensch [Sperma] <sup>a)</sup> <sup>22)</sup>		

<sup>a)</sup> nicht in Substanz isoliert, analytisch nachgewiesen  
<sup>\*</sup>) vorliegende Arbeit

saure Nicht-Ketone bzw. Ketone aufgetrennt. Alternativ wurde erst nach Silicagel-Chromatographie in neutrale und saure Anteile zerlegt.

Die weitere Auftrennung des von sauren Bestandteilen befreiten Testesextraktes A durch multiple Adsorptions- und Verteilungschromatographie sowie durch Girardierung ist im Schema S. 1629 dargestellt. Die einzelnen Chromatogramme sind mit römischen Ziffern, die abgetrennten Substanzen mit T-Nummern bezeichnet. Zunächst erwähnen wir hier die identifizierten Sterine und Steroide. Sie sind gemeinsam mit den bisher in der Literatur genannten Steroiden aus Hodengewebe und Hoden-Venenblut in Tab. 1 zusammengestellt, geordnet nach  $\text{C}_{27}$ -,  $\text{C}_{21}$ -,  $\text{C}_{19}$ - und  $\text{C}_{18}$ -Verbindungen. Für die in der vorliegenden Arbeit isolierten Steroide geben wir auch den Gesamtgehalt in den Extrakten A und B an, umgerechnet auf  $\gamma$  pro kg Gewebe; da die Aufarbeitung zweifellos gewisse Verluste bedingte, sind die Zahlen als Minimalwerte zu betrachten. Gegenüber Nebennierengewebe der gleichen Spezies fällt vor allem auf, dass der Steroidgehalt in Testesgewebe pro Gewichtseinheit etwa 2 Zehnerpotenzen niedriger ist. Dieser Unterschied verringert sich allerdings wesentlich bei der sinnvolleren Berechnung auf den Drüsengehalt pro Tier.

- 9) E. TAGMANN, S. LIEBERMAN & L. RUZICKA, *Helv.* 30, 1080 (1947).
- 10) L. RUZICKA & V. PRELOG, *Helv.* 26, 975 (1943).
- 11) C. D. WEST, V. P. HOLLANDER, T. H. KRITCHEVSKY & K. DOBRINER, *J. clin. Endocrinol. Metabolism* 12, 915 (1952).
- 12) H. R. LINDNER, *Nature* 183, 1605 (1959).
- 13) W. J. HAINES, R. H. JOHNSON, M. P. GOODWIN & M. H. KUIZENGA, *J. biol. Chemistry* 174, 925 (1948).
- 14) H. R. LINDNER, *J. Endocrinology* 20, V (1960).
- 15) M. W. GOLDBERG, in RUZICKA & STEPP, *Ergebn. Vitamin Hormonforsch.* 7, 388 (1938).
- 16) E. TAGMANN, V. PRELOG & L. RUZICKA, *Helv.* 29, 440 (1946).
- 17) T. BRINK-JOHNSON & K. EIK-NES, *Endocrinology* 61, 676 (1957).
- 18) M. W. LUCAS, W. F. WHITMORE, Jr. & C. D. WEST, *J. clin. Endocrinol. Metabolism* 17, 465 (1957).
- 19) V. PRELOG & L. RUZICKA, *Helv.* 27, 61 (1944).
- 20) D. BEALL, *Biochem. J.* 34, 1293 (1940).
- 21) J. W. GOLDZIEHER & I. S. ROBERTS, *J. clin. Endocrinol. Metabolism* 12, 143 (1952).
- 22) E. DICZFALUSY, *Acta endocrinol.* 15, 317 (1954).
- 23) M. MARTI & H. HEUSSER, *Helv.* 37, 327 (1954).

**1. C<sub>27</sub>-Sterine.** Verbindung T<sub>2</sub> erwies sich als freies *Cholesterin*, wovon aus Extrakt A 17 g in reinster Form isoliert wurden. Entsprechend seinem gehäuften Vorkommen findet man immer eine Reihe seiner Oxydationsprodukte. In unserem Fall konnten wir aus den Cholesterin-Mutterlaugen *7β-Hydroxycholesterin* (T<sub>18</sub>)<sup>24)</sup> isolieren und in dessen Mutterlaugen nach Girardierung *7-Ketocholesterin* (T<sub>30</sub>) nachweisen. Letzteres ist sicher ein bei der Behandlung von *7β-Hydroxycholesterin* mit dem GIRARD-Reagens und mit Säure entstandenes Artefakt. Vermutlich stellen auch *7β-Hydroxycholesterin* und ähnliche, früher isolierte Cholesterin-Derivate<sup>9)</sup><sup>10)</sup> Kunstprodukte dar<sup>25)</sup><sup>26)</sup>.

**2. – Von den C<sub>21</sub>-Steroiden** liess sich *3β-Hydroxy-20-keto-Δ<sup>5</sup>-pregnen* (T<sub>17</sub>) in den rechromatographierten Cholesterin-Mutterlaugen von Extrakt A und B papierchromatographisch leicht nachweisen, während dies für *Progesteron* (T<sub>3</sub>) nur bei Extrakt B zutraf (s. exper. Teil). Ferner gelang es, nach Acetylierung und Rechromatographie (XI, XII) der Testosteron-Mutterlaugen *17α-Hydroxyprogesteron* (T<sub>23</sub>) in kleiner Menge erstmals aus Testesgewebe zu isolieren. Es ist kürzlich von LINDNER<sup>12)</sup> im Hoden-Venenblut von Stierkälbern nachgewiesen worden. Überdies liessen sich aus entsprechend höher polaren Anteilen nach Rechromatographie (VIII, IX) 2 Steroide isolieren, die als 20-Dihydro-Metaboliten von *17α-Hydroxyprogesteron* aufzufassen sind, nämlich *3-Keto-17α, 20α-dihydroxy-Δ<sup>4</sup>-pregnen* (T<sub>11</sub>) und *3-Keto-17α, 20β-dihydroxy-Δ<sup>4</sup>-pregnen* (T<sub>13</sub>), von welchen das erstere überwog. Das 20α-Epimere konnten wir bereits früher aus Schweine-Nebennieren isolieren<sup>27)</sup>, während LYNN & BROWN<sup>28)</sup> nachgewiesen haben, dass beide 20-Epimere durch Testes-Enzyme *in vitro* aus *17α-Hydroxyprogesteron* gebildet werden. Das die C<sub>21</sub>-Steroide zu C<sub>19</sub>-Steroiden abbauende Testes-Enzym soll aber, im Gegensatz zu Perjodsäure, am *17α-Hydroxyprogesteron* selbst und nicht an seinen 20-Dihydro-Metaboliten angreifen. Von weiteren C<sub>21</sub>-Steroiden konnte papierchromatographisch in einer Fraktion von Chromatogramm XVI noch *3β-Hydroxy-20-keto-allo pregnan* (T<sub>22</sub>) nachgewiesen werden.

**3. – Den mengenmässig bedeutendsten Anteil auch unserer Hodenextrakte bildete die Gruppe der C<sub>19</sub>-Steroide, allen voran das *Testosteron* (T<sub>6</sub>). Dieses liess sich nach dem angegebenen Schema leicht z. T. in freier Form kristallisiert gewinnen, z. T. als Ester nach Acetylierung der *17α-Hydroxyprogesteron*-haltigen Mutterlaugen. Die epimere Verbindung, das *3-Keto-17α-hydroxy-Δ<sup>4</sup>-androsten* (T<sub>9</sub>, *epi*-Testosteron) konnte ebenfalls isoliert werden, und zwar in einer Menge, die etwa 5% des Testosterongehaltes ausmachte. Damit ist wohl die kürzlich geäusserte Ansicht<sup>29)</sup>, dass *epi*-Testosteron ein spezifisches Produkt des Ovars sei, widerlegt. Auch die unmittelbare Vorstufe dieser beiden C<sub>19</sub>-Steroide, das *3,17-Diketo-Δ<sup>4</sup>-androsten* (T<sub>7</sub>, Androsten-dion) liess sich gewinnen, und zwar mit gegen 100 γ/kg in relativ reichlicher Menge.**

<sup>24)</sup> Herrn Prof. V. PRELOG, ETH Zürich, danken wir bestens für die Überlassung von 7-oxygenierten Cholesterin-Derivaten zu Vergleichszwecken.

<sup>25)</sup> S. BERGSTRÖM & O. WINTERSTEINER, J. biol. Chemistry 141, 597 (1941); 143, 503 (1942).

<sup>26)</sup> Zur leichten Verätherung von *7α-Hydroxycholesterin* in 7-Stellung unter milder saurer Katalyse vgl. H. B. HENBEST & E. R. H. JONES, J. chem. Soc. 1948, 1792, 1798.

<sup>27)</sup> R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. 43, 1171 (1960).

<sup>28)</sup> W. S. LYNN & R. H. BROWN, J. biol. Chemistry 232, 1015 (1958).

<sup>29)</sup> R. V. SHORT, J. Endocrinology 20, 147 (1960).

Das Verhältnis von Testosteron zu Androstendion betrug in unserer Testes-Charge 2,66; demgegenüber fand LINDNER<sup>12)</sup> ein Verhältnis von 0,7 in Hoden von weniger als 4 Monate alten Stierkälbern, von 15 in solchen von ausgewachsenen Stieren und von 3 in Hoden-Venenblut von 4–7 Monate alten Stierkälbern. Da somit Androstendion in Kälbern, Testosteron aber in Bullen vorherrscht, dürfte es sich bei unserem Material den obigen Zahlen entsprechend um überwiegend junge Tiere gehandelt haben.

Hydroxylierte Testosteron-Derivate, die normalerweise aus Testosteron in der Leber gebildet werden<sup>30)</sup>, konnten auch aus unserem Testesextrakt A isoliert werden; die Menge von  $6\beta$ - und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron ( $T_{20}$ ,  $T_5$ ) entsprach jedoch weniger als 1% derjenigen des Testosterons. Ob diese beiden Verbindungen tatsächlich in den Testes gebildet worden sind, bleibt deshalb zweifelhaft. Erstmals konnte auch  $15\alpha$ -Hydroxytestosteron ( $T_8$ ) in sehr kleiner Ausbeute isoliert werden.  $15\alpha$ -Hydroxysterioide und  $15\alpha$ -Hydroxylasen sind unseres Wissens bisher nicht im Tierreich aufgefunden worden. Mit Dr. F. W. KAHNT<sup>31)</sup> unter verschiedenen Bedingungen durchgeführte Inkubationsversuche von  $^{14}\text{C}$ -Testosteron ergaben keinen Anhaltspunkt für die Anwesenheit einer *in vitro* auf dieses Substrat ansprechenden  $15\alpha$ -Hydroxylase im Testesgewebe. Es scheint daher möglich, dass  $15\alpha$ -Hydroxytestosteron mikrobiell aus Testosteron entstanden ist.  $2\alpha$ -Hydroxytestosteron, das z. B. in Leber gebildet werden kann<sup>30)</sup>, haben wir dagegen in unseren Extrakten nicht nachweisen können.

Ein unerwartetes Resultat bei der Identifizierung der  $C_{19}$ -Sterioide war das Auffinden von *Androstenolon* ( $T_{21}$ ). Dessen Bedeutung für verschiedene mögliche Biosynthesewege der Androgene haben wir bereits an anderer Stelle diskutiert<sup>5)</sup>. Dagegen gelang es aber nicht, das Analoge zu  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron, also  $17\alpha$ -Hydroxy- $\Delta^5$ -pregnenolon in unseren Testesextrakten nachzuweisen. Über die Bildung beider erwähnter  $\Delta^5$ -Sterioide durch *normales* Testesgewebe *in vitro* soll jedoch später berichtet werden<sup>32)</sup>.

Von weiteren  $C_{19}$ -Steroiden wurden papierchromatographisch noch  $3\beta$ -Hydroxy- $17$ -keto-androstan ( $T_{22}$ ) und  $3,11,17$ -Triketo- $\Delta^4$ -androsten ( $T_{28}$ , Adrenosteron) in geringer Menge nachgewiesen. Während  $T_{22}$  einen gewöhnlichen Gewebe-Tetrahydrometaboliten von Androstendion darstellt, ist das Auftreten von Adrenosteron in normalem Testesgewebe überraschend, da diesem sowohl  $11\beta$ - wie  $21$ -Hydroxylasen zu fehlen scheinen. Dass aber Testesgewebe unter besonderen Umständen über diese Enzyme verfügt, dafür sprechen Befunde von SAMUELS<sup>33)</sup>: So wurde in einem Hodentumor die Bildung von Cortexon nachgewiesen, in Hodenschnitten bei der Inkubation von Progesteron diejenige von 11-Ketocortexon. Ähnliche Resultate erhielten kürzlich SAVARD *et al.*<sup>34)</sup>, die durch Inkubation von Acetat, Progesteron oder Testosteron mit Gewebe eines virilisierenden Testes-Tumors verschiedene 11-oxygenierte  $C_{19}$ -Sterioide gewinnen konnten. Möglicherweise stammt also das von uns nachgewiesene Adrenosteron aus einer Beimengung von pathologischem Drüsennaterial.

<sup>30)</sup> L. A. AXELROD, L. L. MILLER & F. HERLING, *J. biol. Chemistry* 219, 455 (1956).

<sup>31)</sup> F. W. KAHNT & R. NEHER, unveröffentlichte Versuche.

<sup>32)</sup> F. W. KAHNT, R. NEHER, K. SCHMID & A. WETTSTEIN, in Vorbereitung.

<sup>33)</sup> W. R. SLAUNWHITE JR. & L. T. SAMUELS, *J. biol. Chemistry* 220, 341 (1956); L. T. SAMUELS, *Cancer Res.* 17, 530 (1957).

4. – Ausser den erwähnten, identifizierten Steroiden isolierten wir noch verschiedene, UV.-absorbierende Produkte (250 m $\mu$ -Region). Bei ihnen könnte es sich ebenfalls um Steroide handeln; ihre Identifizierung war aber wegen der sehr geringen Ausbeute nicht möglich. Das Vorliegen von  $\Delta^4$ -3-Ketosteroiden ist wenigstens bei den 3 Substanzen wahrscheinlich, die sich durch eine gelbe Natronlauge-Fluoreszenz auszeichneten:  $T_{14}$ , das in der Polarität zwischen  $15\alpha$ - und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron liegt und ein Di-O-Acetyl-Derivat liefert;  $T_{15}$  mit ähnlichen Eigenschaften wie  $6\beta$ -Hydroxytestosteron, und  $T_{26}$  mit ähnlichem chromatographischem Verhalten wie  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron. Für eine Gruppe von 5 weiteren Verbindungen, die zwar im UV. absorbieren, aber keine gelbe Natronlauge-Fluoreszenz zeigten, ist der Steroidcharakter weniger wahrscheinlich:  $T_{10}$ ,  $T_{12}$ ,  $T_{25}$ ,  $T_{27}$  und  $T_{29}$  (s. Schema).

### Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER doublebeam Instrument, Mod. 21 aufgenommen.

*Papierchromatographie* (PCG): Ausführung wie früher beschrieben<sup>27)</sup>. Die für die Lösungsmittel benützten Abkürzungen bedeuten:  $\text{A}$  = Äther,  $\text{An}$  = Aceton,  $\text{Be}$  = Benzol,  $\text{Buac}$  = n-Butylacetat,  $\text{Cy}$  = Cyclohexan,  $\text{Di}$  = Dioxan,  $\text{Etac}$  = Äthylacetat,  $\text{F}$  = Formamid,  $\text{MCy}$  = Methylcyclohexan,  $\text{P}$  = Propylenglykol,  $\text{T}$  = Toluol; diejenigen für spezielle Lösungsmittelsysteme siehe<sup>27)</sup>. – *Dünnschichtchromatographie* (DS): Ausführung nach STAHL<sup>28)</sup> und NEHER<sup>29)</sup> in gesättigten Kammern mit Kieselsäure ( $\text{SiO}_2$ ) oder  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , unter Zusatz von je 5% Gips. – *Gas-Chromatographie*<sup>7)</sup>: Als stationäre Phase für die Fettsäureester-Analyse diente der Weichmacher Reoplex 400 der J. R. GEIGY AG<sup>37)</sup>.

*Girardierungen*<sup>8)</sup>: Ketone 1 aus *leicht* spaltbaren (sofortige Extraktion nach Ansäuern mit 10 Vol.-proz. konz. HCl) und Ketone 2 aus *schwer* spaltbaren (2. Extraktion 24 Std. nach sofortiger Extraktion, 20°) GIRARD-Hydrazenen T.

Die **Extraktion** von 2000 kg Rindertestes nach Schema 1 in<sup>6)</sup> lieferte 17,0 kg Rohextrakt. Letzterer wurde zur *Entfettung* in 300 l Petroläther (50–70°) gelöst und nach Zusatz von 18 l gesättigter Kochsalzlösung mit 75 l 60-proz. Methanol extrahiert. Teilweise entstehende Emulsionen wurden getrennt aufgearbeitet. Nach 3 solchen Extraktionen (E 1–3 = 240 l wässriger-methanolische Lösung) folgten 3 analoge mit 80-proz. Methanol (E 4–6 = 245 l). Die Lösungen E 1–3 und E 4–6 wurden mit je 30, 25 und nochmals 25 l  $\text{CHCl}_3$  zurückextrahiert und schliesslich nach papierchromatographischer Kontrolle mit Chloroform im Gegenstromverfahren im Verhältnis 3:1 nachextrahiert. Nach schonendem Eindampfen der Chloroformlösungen erhielten wir aus E 1–3 insgesamt 330 g Extrakt A und aus E 4–6 680 g Extrakt B.

Zur ersten Reinigung wurde Extrakt A in 4 l  $\text{CCl}_4$ -Äther (95:5) gelöst und 4mal mit 400 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgerührt, wobei letztere mit 2mal 200 ml Lösungsmittelgemisch in Serie zurückgewaschen wurden. Die wässrigen Lösungen lieferten nach Ansäuern und Rückextraktion mit  $\text{CHCl}_3$  1,84 g ölichen Extrakt  $\text{AS}_1$ . Die Hauptlösung wurde mit 2 l Petroläther verdünnt und nach Zugabe von 3 l ges. Kochsalzlösung 4mal mit 1 l 1N KOH extrahiert, wobei sich schwere Emulsionen in der oberen wässrigeren Phase bildeten. Die untere organische Phase trennte man ab und wusch sie 4mal mit 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ ; die wässrigeren, sich nur mühsam trennenden Phasen wurden mit  $\text{CCl}_4$  zurückextrahiert und dann mit der emulgierten alkalischen Phase vereinigt. Letztere trennte sich erst nach weiterer Zugabe von 3 l Petroläther und 2 l Benzol (Phasenumkehr). Die obere organische Phase wurde nochmals mit Wasser gewaschen.

<sup>24)</sup> H. SAVARD, R. I. DORFMAN, B. BAGGETT, L. L. FIELDING, L. L. ENGEL, H. T. MCPHERSON, L. M. LISTER, D. S. JOHNSON, E. C. HAMBLEU & F. L. ENGEL, J. clin. Invest. 39, 534 (1960).

<sup>25)</sup> E. STAHL, Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958).

<sup>26)</sup> R. NEHER, in ENGEL, L. L. Ed. Physicochemical Properties of Steroids, New York (1960), im Druck.

<sup>27)</sup> C. H. ORR & J. E. CALLEN, J. Amer. chem. Soc. 80, 249 (1958); Ann. N. Y. Acad. Sci. 72, 649 (1959).

Tabelle 2. Dünn schicht-Chromatographie,  $R_f$ -Werte

Lösungsmittel (aufsteigend)	Cholesterin SiO <sub>2</sub>	7-Keto- cholesterin SiO <sub>2</sub>	Progesteron Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3 $\beta$ -Hydroxy- -20-keto-A <sub>5</sub> - -pregnen SiO <sub>2</sub>	Adrenosteron SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Be-CHCl <sub>3</sub> (1:1)	0,10					
CHCl <sub>3</sub> -An (95:5)	0,28		0,43	0,27	0,16	
Be-Etac (8:2)	0,41	0,68	0,30	0,28	0,10	0,56
CHCl <sub>3</sub> -Ä (8:2)	0,48		0,58	0,38	0,27	
Be-Ä (4:6)	0,53		0,52	0,44	0,27	
Be-An (8:2)	0,55		0,62	0,47	0,38	
Cy-Etac (2:8)	0,60		0,56	0,52	0,37	
Buac	0,69	0,58	0,54	0,59	0,24	0,40
Buac-CH <sub>3</sub> OH (99:1)	0,72		0,64	0,59	0,33	
Etac	0,73	0,67	0,54	0,66	0,60	0,51
Be-An (1:1)			0,83		0,70	0,67
UV.-Fluoreszenz mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	blauviolett	olivgrün	grün	blauviolett	hellblau	hellblau

Tabelle 3. Papierchromatographie,  $R_f$ -Werte

Substanzen	Progesteron = 1,0			Corticosteron = 1,0			Cortisol = 1,0			SbCl <sub>3</sub>		
	F/Cy	P/MCy	BuSH <sub>A</sub>	P/Tol	F/Be-CHCl <sub>3</sub>	BL <sub>1</sub>	P/Tol	F/Be	F/CHCl <sub>3</sub>	BuSH <sub>C</sub>	Farb- reaktion	UV.- Fluores- zenz
7-Ketocholesterin											–	
7 $\beta$ -Hydroxycholesterin	0,62	1,26									stark blau	hellblau (dunkelblau)
3 $\beta$ -Hydroxy-20-keto-allopregnan	0,32	0,90										
3 $\beta$ -Hydroxy-17-keto-androstan	1,02	0,62	0,90									
O-Acetyl-Testosteron	0,84	0,34	0,71									
	1,38	1,16										
6 $\beta$ -Hydroxytestosteron				0,21	0,37	0,56	0,58	2,55	5,15	2,38	1,54	
15 $\alpha$ -Hydroxytestosteron <sup>a)</sup>					0,34	0,31	1,05	2,22	1,98	0,83		
16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron					0,31	1,22	1,80	2,14	1,10			

<sup>a)</sup> Weitere R<sub>Cortisol</sub>-Werte BL<sub>1</sub> 1,00; Cy-Di I 0,77; F/BBW 0,84; F/Be-CHCl<sub>3</sub> (1:1) 2,91

schen; diese Waschwasser sowie die untere alkalische Phase reexstrihierte man mit Benzol-Petroläther (1:1) auf übliche Weise. Alle alkalischen wässrigen Phasen wurden vereinigt und dienten zur Gewinnung der sauren bzw. phenolischen Anteile ( $\text{As}_{2-3}$ ).

Die vereinigten organischen Phasen trocknete man über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrierte über Celite und engte im Vakuum ein. Der gallertartige Rückstand wurde mit 3 l Aceton 2 Std. geschüttelt, abgenutscht und mit Aceton nachgewaschen. Das Filtrat ergab einen braunen, schmierigen Rückstand von 68 g (= *Neutraleextrakt A*), während der aceton-schwerlösliche Teil im wesentlichen die K-Salze eines in Wasser leicht löslichen Fettsäuregemisches darstellte (184 g  $\text{As}_4$ ). Von letzterem löste man 5 g in 50 ml Wasser, säuerte mit 10 ml 2N HCl an, extrahierte mit 4 mal 20 ml Äthylacetat, wusch letzteres mit Wasser zurück und destillierte die Lösung im Vakuum ab. Der ölige Rückstand, dem eine Jodzahl von 123,8 zukam, wurde in acetonisch-ätherischer Lösung mit Diazomethan verestert und gas-chromatographisch untersucht (vgl. theoret. Teil).

**Faktionierung des Neutraleextraktes A** (s. Schema). – Durch mehrmalige Umkristallisation aus Methanol und Äthanol erhielten wir daraus ca. 17 g reinstes *Cholesterin* ( $\text{T}_2$ ) vom Smp. 146–147° (Misch-Smp. PCG, DS). Die amorphen Mutterlaugen von insgesamt 44 g wurden an 2,7 kg Silicagel (DAVISON through 200) mit 10-proz. Wassergehalt auf übliche Weise mit Gemischen von Petroläther, Benzol,  $\text{CHCl}_3$ , Aceton und Methanol chromatographiert (s. Chromatogramm I).

Weitere Mengen Cholesterin erhielten wir aus *Fr. 16–20*, eluiert mit Benzol- $\text{CHCl}_3$  (1:1); insgesamt 4,33 g Mutterlaugen des hier und weiter oben gewonnenen Cholesterins wurden an 150 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Aktivität II) mit Petroläther, Benzol, Äther,  $\text{CHCl}_3$  und Äthylacetat sowie Gemischen davon rechromatographiert (Chromatogramm II). Neben Cholesterin in *Fr. II/12–15* konnten wir wenig  $3\beta$ -*Hydroxy-20-keto- $\Delta^5$ -pregnen* ( $\text{T}_{17}$ ) im ketonischen Teil von *Fr. 16–20* (Benzol-Äther 1:1, Äther) nach PCG und DS mit  $\text{SbCl}_3$  bzw.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  nachweisen (PCG s. in <sup>27</sup>), DS s. Tab. 2). Aus den letzten, mit  $\text{CHCl}_3$  und Äthylacetat eluierten Fraktionen 21 und 22 liessen sich mit Aceton-Petroläther 10,8 mg  $7\beta$ -*Hydroxycholesterin* ( $\text{T}_{18}$ ) mit dem Smp. 173–175° isolieren und nach Misch-Smp. mit authentischem Material (Smp. 173–178°), optischer Drehung (freie Substanz positiv, Acetat negativ, s. S. 100 und 154–157 in <sup>38</sup>)) sowie nach PCG und DS identifizieren (Tab. 2 und 3). Als charakteristisches Nachweisreagens diente  $\text{SbCl}_3$ , welches mit 7-Hydroxy- $\Delta^5$ -Steroiden eine starke *blaue* Farbreaktion gibt<sup>39</sup>). Die noch viel  $\text{T}_{18}$  enthaltenden Mutterlaugensubstanzen (87,6 mg) wurden auf übliche Weise girardiert, wobei der ketonische wie der nicht-ketonische Anteil qualitativ sehr ähnlich zusammengesetzt waren; vermutlich findet eine reversible Umwandlung von 7-Hydroxy in 7-Keto-cholesterin<sup>25</sup>) statt. Eine zweite Girardierung führte zum gleichen Ergebnis, nur dass sich diesmal tatsächlich 7-Keto-cholesterin im ketonischen Anteil nachweisen liess. Die Komponenten des letzteren wurden an 20 Blatt im System Bush A getrennt und chromatographisch (PCG, DS, s. Tab. 2 und 3) mit 7-Ketocholesterin ( $\text{T}_{30}$ ) und 7 $\beta$ -*Hydroxycholesterin* identifiziert. Von den weiteren Nebenprodukten reagierte noch eines mit  $\text{SbCl}_3$  blau, war aber etwas schwächer polar und stellte vermutlich 7 $\alpha$ -Äthoxycholesterin dar<sup>28</sup>).

Der Hauptteil der Steroide befand sich nach PCG in *Fr. 22–24 (16,3 g)* des Chromatogramms I. Die vereinigten Fraktionen (15,19 g) setzte man in 500 ml abs. Äthanol und 50 ml Eisessig mit 10 g GIRARD-Reagens T um und trennte auf übliche Weise in Nichtketone (11,72 g), und nach Zusatz von 10 Vol.-proz. konz. HCl in Ketone I (2,114 g, sofortige Extraktion nach Ansäuern) und Ketone s (71,2 mg 2. Extraktion 24 Std. nach Ansäuern). Die mit 2N Sodalösung und  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschenen Ketone I und s wurden vereinigt und 500 mg davon auf 170 Blatt im Block mit F/Cy-Be (1:1) chromatographiert (Chromatographie III, s. Schema). Auf Grund der UV-Absorption wurden Zonen mit folgenden Rf-Werten eluiert: a) 0–0,175 (72,9 mg); b) 0,175–0,255 (30,8 mg); c) 0,255–0,57 (173,8 mg); d) 0,57–0,675 (170,7 mg); e) 0,675–0,75 (56,0 mg); f) 0,75–1,0 (1,24 g inkl. Reste von Formamid).

Die einzelnen Eluate wurden unter ständiger analytischer Kontrolle (PCG) folgendermassen rechromatographiert:

<sup>38</sup>) L. F. FIESER & M. FIESER, Steroids, New York 1959.

<sup>39</sup>) T. BARR, T. M. HEILBRON, E. G. PARRY & F. S. SPRING, J. chem. Soc. 1936, 1437; J. J. SCHNEIDER & M. L. LEWBART, Recent Progr. Hormone Res. 15, 201 (1959).

IIIa auf 20 Blatt mit F/CHCl<sub>3</sub> (= IV); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0,1–0,3 (4,0 mg); b) 0,3–0,45 (3,2 mg); c) 0,45–1,0 (36,7 mg).

IVc auf 20 Blatt mit BL<sub>1</sub> (= V); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0–0,275 (6,7 mg); b) 0,275–0,375 (6,0 mg); c) 0,375–0,675 (7,8 mg); d) 0,675–0,775 (4,9 mg); e) 0,775–1,0 (21,0 mg).

Va auf einem Blatt mit Bush C (= VI); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0,425–0,55 (2,2 mg); b) 0,55–0,675 (1,8 mg).

Vc auf einem Blatt mit F/Be-CHCl<sub>3</sub> (1:1) (= VII); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0,31–0,42 (2,0 mg); b) 0,42–0,50 (2,2 mg); c) 0,50–0,575 (2,0 mg); d) 0,575–0,65 (2,0 mg); e) 0,65–0,775 (2,1 mg).

IIIb auf 20 Blatt mit F/Be (= VIII); Rf-Werte der eluierten Zone a) 0,43–0,575 (10,2 mg).

IIIc auf 20 Blatt mit F/Cy-Be (1:2) (= IX); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0,475–0,57 (6,7 mg); b) 0,57–0,675 (7,5 mg); c) 0,675–0,80 (6,6 mg).

IXb auf 5 Blatt mit Bush B<sub>3</sub> (= X); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0,25–0,34 (2,1 mg); b) 0,34–0,425 (2,8 mg); c) 0,425–0,57 (4,2 mg).

IIId. Nach Abscheidung eines ersten Kristallisates (T<sub>6</sub>, 52,1 mg, Smp. 151–153°) wurden die Mutterlaugen ML<sub>1</sub> und ML<sub>2</sub>, welche noch Testosteron und 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron enthielten, acetyliert und rechromatographiert: ML<sub>1</sub> auf 7 Blatt und ML<sub>2</sub> auf 10 Blatt mit Bush B<sub>3</sub> (= XI und XII); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0,35–0,45 (2,9 mg); b) 0,45–0,525 (5,9 mg); c) 0,67–0,77 (2,5 mg); d) 0,77–1,0 (50,1 mg).

IIIe auf 50 Blatt mit F/Cy im Durchlauf (ca. 7 Std. = XIII); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0,25–0,35 (9,0 mg); b) 0,35–0,45 (9,1 mg).

XIIId auf 10 Blatt mit F/Cy-Be (1:1) (= XIV); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0,50–0,625 (3,1 mg); b) 0,625–0,75 (4,6 mg).

IIIIf an 30 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Aktivität II) (= XV); Elution mit Petroläther, Be, Ä, CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>OH und Mischungen davon; Fr. 6–8 mit Be und Be-Ä (9:1) (72,3 mg). Nach Abscheidung eines ersten Kristallisates (T<sub>7</sub>, 14,5 mg, Smp. 170–172°) wurde die Mutterlauge von XV/6–8 rechromatographiert. ML von XV/6–8 auf 20 Blatt mit Bush A (= XVI); Rf-Werte der eluierten Zonen a) 0–0,37 (5,7 mg); b) 0,37–0,48 (12,9 mg); c) 0,48–0,60 (6,1 mg); d) 0,60–0,82 (7,7 mg); e) 0,82–1,0 (4,4 mg).

Höher polare Steroide traten im Chromatogramm I erst wieder in den mit CHCl<sub>3</sub>-Aceton (7:3) und (1:1) eluierten Fraktionen 33–36 (510 mg) auf. Nach entsprechender Girardierung mit 500 mg Reagens T wurden die Ketone I (59,2 mg) auf 20 Blatt mit Bush C rechromatographiert (= XVII); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0–0,255 (18,3 mg); b) 0,255–0,31 (4,3 mg); c) 0,31–0,37 (3,7 mg); d) 0,37–0,425 (7,4 mg); e) 0,425–0,60 (7,2 mg); f) 0,60–0,77 (8,5 mg); g) 0,77–1,0 (22,4 mg).

XVIIe auf 3 Blatt mit F/CHCl<sub>3</sub> (= XVIII); Rf-Werte der eluierten Zonen: a) 0,45–0,65 (4,2 mg); b) 0,65–0,80 (2,9 mg).

**Identifizierung der aus den Chromatogrammen III–XVIII isolierten Verbindungen.** – 1. Testosteron (T<sub>8</sub>) aus IIId, Reste aus IXc und XIVa, umkristallisiert aus Aceton-H<sub>2</sub>O, Smp. 151–153°; O-Acetyltestosteron aus XI und XIIId, Smp. 140–145°; Identifizierung durch Misch-Smp., PCG und IR.-Spektren (s. Tab. 1 in <sup>27</sup>)).

2. epi-Testosteron (T<sub>9</sub>) aus XIIId mit Aceton-Petroläther, Smp. 216–218°; liess sich mit CrO<sub>3</sub> in Pyridin zu Androstendion (PCG) oxydieren. Vergleich in freier und acetylierter Form im PCG (s. Tab. 1 in <sup>27</sup>)) mit authentischem Material, Misch-Smp. und IR.-Spektrum. Besonders auffallend ist die trotz Abwesenheit einer 3 $\beta$ -Hydroxy- $\Delta^5$ -Struktur starke rote SbCl<sub>3</sub>-Farbreaktion, die den 17 $\alpha$ -Hydroxy-C<sub>19</sub>-Steroiden eigen zu sein scheint<sup>27</sup>).

3. 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron (T<sub>20</sub>) aus Vb in sehr kleiner Menge; gab ein Diacetat (PCG). Identifizierung durch PCG (Tab. 3) mit authentischem, durch Hydroxylierung von Testosteron mit einem Stamm von *Gibberella saubinetti* erhaltenem Material (Smp. nach völliger Umwandlung zu Prismen 255–258°), vgl. <sup>40</sup>.

<sup>40</sup>) S. H. EPPSTEIN, P. D. MEISTER, H. M. LEIGH, D. H. PETERSON, H. C. MURRAY, L. M. REINEKE & A. WEINTRAUB, J. Amer. chem. Soc. 76, 3174 (1954). Herrn Dr. E. VISCHER danken wir für seine Hilfe bei der mikrobiologischen Hydroxylierung.

4. *15 $\alpha$ -Hydroxytestosteron* ( $T_8$ ) aus XVIIb, ebenfalls in sehr kleiner Ausbeute, mit dem Smp. 107–112°; lieferte bei der Chromsäureoxydation in Pyridin genau wie authentisches Material<sup>41)</sup> zwei Oxydationsprodukte, von welchen eines offensichtlich *15 $\alpha$ -Hydroxyandrostendion* (ZIMMERMANN-Reaktion positiv aber blaustrichig, Monoacetat), das andere *15-Ketotestosteron* (ZIMMERMANN-Reaktion negativ, Monoacetat) darstellte. Die *15 $\alpha$ -Acetoxy-17-keto*-Verbindung verhielt sich dabei im PCG etwas höher polar als die *15-Keto-17 $\beta$ -acetoxy*-Verbindung. Ausserdem erwies sich das papierchromatographische Verhalten von freiem und acetyliertem  $T_8$  in 8 verschiedenen Systemen mit demjenigen von *15 $\alpha$ -Hydroxytestosteron* bzw. -Acetat als identisch (Tab. 3).

5. *16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron* ( $T_5$ ) aus XVIIId mit Aceton-Äther in Nadeln, Smp. 186–188° nach Umwandlung. Identitätsbeweis mit authentischem Material<sup>42)</sup> nach PCG (Tab. 3), Misch-Smp. und IR.-Spektren.

6. *Androstendion* ( $T_7$ ) aus XV/6–8 und XVIb mit Aceton-Petroläther, Smp. 170–172°; Vergleich mit synthetischem Material durch Misch-Smp., PCG (vgl. Tab. 1 in <sup>27</sup>) und IR.-Spektren.

7. *3,11,17-Triketo- $\Delta^4$ -andosten* ( $T_{28}$ ) aus Xb, in sehr kleiner Menge, nur nach PCG identifiziert (vgl. Tab. 1 in <sup>27</sup>); ZIMMERMANN-Reaktion positiv).

8. *3 $\beta$ -Hydroxy-17-keto- $\Delta^5$ -andosten* (DHA,  $T_{21}$ ) aus XVIa mit Aceton-Äther, Smp. 148–149°; Identifizierung durch Vergleich in PCG (s. Tab. 1 in <sup>27</sup>) und DS, in freier und acetylierter Form, mit authentischem Material, Chromsäureoxydation zu Androstendion (PCG), IR.-Spektren.

9. *3 $\beta$ -Hydroxy-17-keto-androstan* ( $T_{22}$ ) aus XVIc, wie  $T_{28}$ ; PCG s. Tab. 3).

10. *17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron* ( $T_{29}$ ) aus XI + XIIb mit Äther, Smp. 216–218°; keine Depression im Misch-Smp. mit authentischem Material und identisches Verhalten im PCG, nicht acetylierbar und nicht oxydierbar unter milden Bedingungen. Ausserordentlich schwache NaOH-Fluoreszenz (s. Tab. 1 in <sup>27</sup>).

11. *3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen* ( $T_{11}$ ) aus VIIa mit Aceton-Äther, Smp. 206–210°;  $HJO_4$ -Abbau zu Androstendion, IR.-Spektrum und papierchromatographische Vergleiche führten zur angegebenen Struktur, die sich durch Misch-Smp. bestätigen liess. Identisch mit der aus Nebennieren isolierten Substanz A<sub>60</sub><sup>27</sup>.

12. *3-Keto-17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnen* ( $T_{13}$ ) aus IXa mit Aceton-Äther, Smp. 201–203°; Strukturaufklärung wie bei  $T_{11}$  angegeben, unter Verwendung des partialsynthetisch hergestellten 20 $\beta$ -Epimeren vom Smp. 203–204°<sup>27</sup>) als Vergleichsmaterial; PCG s. ebendort in Tab. 2.

13. *3 $\beta$ -Hydroxy-20-keto-allo pregnan* ( $T_{22}$ ) aus XVIc, in sehr kleiner Menge, nur nach PCG identifiziert (s. Tab. 1 in <sup>27</sup>); gelbe Farbreaktion mit Dinitrophenylhydrazin.

**Nachweis von Progesteron ( $T_3$ ) im Testesextrakt B.** – 580 g des nicht neutral gewaschenen Extraktes B wurden mit GIRARD-Reagens T auf übliche Weise in Nicht-Ketone, Ketone I und Ketone s zerlegt. Letztere lieferten nach Waschen der ätherischen Lösung mit 2N NaOH und Wasser 250 mg Neutralstoffe; 94 mg davon wurden auf 10 Blatt mit F/Cy-Be (1:1) chromatographiert, wobei sich in den Zonen a–c Testosteron, *epi*-Testosteron, Androstenolon und Androstendion abtrennten. Progesteron befand sich in der Frontzone f (Rf 0,82–1,0) und wurde nach Rechromatographie auf 3 Blatt mit BUSH A von noch beigemischtem Pregnenolon abgetrennt und aus Zone b eluiert. Die Identifizierung erfolgte chromatographisch (PCG s. Tab. 1 in <sup>27</sup>), DS s. Tab. 2) in 6 verschiedenen Systemen.

Die Analysen verdanken wir Herrn Dr. W. PADOWETZ, die IR.-Spektren Herrn Dr. R. ZÜRCHER. Für die Ausführung der Gas-Chromatographie sind wir Herrn Dr. H. ABEGG und für die Hilfe bei der Papierchromatographie Herrn E. VON ARX dankbar.

<sup>41)</sup> Wir verdanken Herrn Dr. J. URECH eine Vergleichsmenge von *15 $\alpha$ -Hydroxytestosteron*.

<sup>42)</sup> Herr Dr. J. FRIED hat uns freundlicherweise eine Probe von mikrobiell hergestelltem *16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron* überlassen.

## SUMMARY

The neutral lipophilic ingredients of deep frozen testicular tissue of young bulls have been reinvestigated. Besides steroids known to occur in this type of tissue the following have been isolated for the first time:  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone, 3-keto- $17\alpha$ ,  $20\alpha$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnene, 3-keto- $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy- $\Delta^4$ -pregnene, *epi*-testosterone,  $6\beta$ -hydroxytestosterone,  $15\alpha$ -hydroxytestosterone,  $16\alpha$ -hydroxytestosterone and  $3\beta$ -hydroxy- $17$ -keto- $\Delta^5$ -androstene (DHA). In addition the chromatographic identification of four other steroids has been accomplished for the first time:  $7\beta$ -hydroxycholesterol, progesterone,  $3,11,17$ -triketo- $\Delta^4$ -androstene and  $3\beta$ -hydroxy- $17$ -keto-androstane.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung

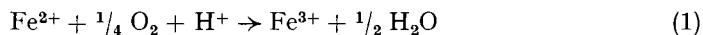
202. Reaktivität von Koordinationsverbindungen IV<sup>1)</sup>

## Über die Autoxydation von Eisen(II)-Salz-Lösungen

von Th. Kaden, D. Walz und S. Fallab

(29. VII. 60)

Beim Arbeiten mit Lösungen, die freie oder komplex gebundene Fe<sup>II</sup>-Partikeln enthalten, stellt sich oft die Frage der Haltbarkeit an der Luft. Wir unternahmen es daher, das Problem der Autoxydationsgeschwindigkeit von Fe<sup>II</sup>-Partikeln systematisch zu studieren. Verschiedene Autoren haben sich mit der Geschwindigkeit von



in stark saurer Lösung in Gegenwart von Cl<sup>-</sup><sup>2)</sup>, F<sup>-</sup><sup>3)</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup><sup>4)</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup><sup>5)</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup><sup>6)</sup> und H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup><sup>7)</sup> befasst. Von diesen Anionen zeigt H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup> den stärksten katalytischen Effekt. So ist in einer 10<sup>-4</sup> M Fe<sup>2+</sup>-Lösung, die Pyrophosphorsäure in einer 10<sup>-2</sup> M Konzentration enthält, bei pH 2 und 30°  $d[\text{Fe}^{3+}]/dt = 10^{-7}$  Mol l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, währenddem in einer 10<sup>-3</sup> M Fe<sup>2+</sup>-Lösung in 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter sonst gleichen Bedingungen in Abwesenheit von Pyrophosphorsäure diese Geschwindigkeit ca.  $4 \cdot 10^{-10}$  Mol l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> beträgt<sup>5)</sup>.

In der vorliegenden Arbeit interessierten wir uns für die Geschwindigkeit von (1) in schwach saurem bis neutralem Milieu, und wir untersuchten zunächst das Verhalten von verdünnten, ungepufferten Lösungen von MOHRSchem Salz (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O ohne Zusatz irgendwelcher Komplexbildner.

1) D. WALZ & S. FALLAB, Helv. 43, 540 (1960).

2) A. M. POSNER, Trans. Farad. Soc. 49, 382 (1953).

3) J. WEISS, Experientia 9, 61 (1953).

4) P. GEORGE, J. chem. Soc. 1954, 4349.

5) A. LAMB & L. W. ELDER, J. Amer. chem. Soc. 53, 137 (1931); R. E. HUFFMAN & N. DAVIDSON, *ibid.* 78, 4836 (1956).

6) M. CHER & N. DAVIDSON, J. Amer. chem. Soc. 77, 793 (1955).

7) J. KING & N. DAVIDSON, J. Amer. chem. Soc. 80, 1542 (1958).