

Zur Kenntnis der Lipoide aus Hypophysenvorderlappen

VON DER
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG
DER WÜRDE EINES DOKTORS DER
TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE
PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON
HUGO C. BEYERMAN

dipl. Ingenieur-Chemiker
aus Den Haag (Holland)

Referent: Herr Prof. Dr. L. Ruzicka
Korreferent: Herr Prof. Dr. V. Prelog

BASEL
Buchdruckerei E. Birkhäuser & Cie., A. G.
1945

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. L. Ruzicka,

unter dessen grosszügiger Leitung die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, danke ich herzlich für sein Wohlwollen und die Unterstützung, die er mir stets zuteil werden liess.

Herrn Prof. Dr. V. Prelog

danke ich herzlich für die vielen wertvollen Ratschläge und das lebhafteste Interesse, das er mir jederzeit entgegenbrachte.

MIJN OUDERS

Inhalt.

I. Einleitung	5
1. Die physiologischen Funktionen der Lipide aus Hypophyse	5
2. Über die chemische Zusammensetzung der Lipide aus Hypophyse	8
II. Theoretischer Teil	
A. Aufarbeitung des Acetonextraktes aus Hypophysenvorderlappen	
a) Allgemeines	9
b) Trennung durch Molekulardestillation.	11
c) Weitere Aufteilung (mit Übersicht I)	12
d) Abtrennung der Ketone	13
e) Chromatographische Auftrennung	13
B. Über die isolierten Verbindungen	14
C. Über die androgenen und oestrogenen Wirkstoffe aus Hypophysenvorderlappen	17
a) Wirkung der Gonaden auf den Hypophysenvorderlappen	17
b) Über die Anreicherung der androgenen und oestrogenen Wirkstoffe aus Hypophysenvorderlappen	18
III. Experimenteller Teil	
1. Das Ausgangsmaterial	21
2. Herstellung des Ätherextraktes	22
3. Herstellung der cholesterinarmen neutralen Anteile (mit Übersicht II)	22
4. Molekulardestillation der neutralen Anteile	
a) Destillation	24
b) Aufarbeitung des Destillates (mit Übersicht III)	25
c) Aufarbeitung des Rückstandes (mit Übersicht IV)	28
5. Aufarbeitung der sauren Anteile.	30
6. Isolierung einzelner Verbindungen	32
7. Anreicherung der androgenen und oestrogenen Wirkstoffe	35
8. Zusammenfassung	38
Summary	39

I. Einleitung.

Im Zusammenhang mit verschiedenen anderen Untersuchungen über Organextrakte¹⁾, welche in unserem Laboratorium ausgeführt werden, untersuchte ich die acetonlöslichen Lipide aus Hypophysenvorderlappen (H.V.L.)²⁾ des Rindes.

Eine gründliche chemische Untersuchung der Lipide aus H.V.L. schien um so mehr gerechtfertigt, als die Hypophyse zu den wichtigsten endokrinen Drüsen gehört. Die bisher aufgefundenen Wirkstoffe der H.V.L. besitzen jedoch ausnahmslos Eiweisscharakter, wodurch das Interesse für die Lipide herabgesetzt wurde und deshalb über diese wenig bekannt ist.

Vor der Besprechung der eigenen Arbeit sollen zuerst die bisher bekannten lipoiden Inhaltstoffe der Hypophyse und ihre physiologischen Wirkungen kurz besprochen werden.

1. Die physiologischen Funktionen der Lipide aus Hypophyse.

Obwohl die Hypophyse für die Tiere³⁾⁴⁾ nicht unbedingt lebensnotwendig ist — frühere gegenteilige Behauptungen⁵⁾ finden ihre Ursache wahrscheinlich in nicht beachteten Gehirnverletzungen bei der Exstirpation der Drüse⁶⁾ — gehört sie doch zu den wichtigsten Drüsen mit endokriner Sekretion.

Anatomisch lassen sich bei der Hypophyse (*Hypophysis cerebri*) zwei Teile unterscheiden, der Vorderlappen, Prae- oder Adenohypophyse, auch Hauptlappen genannt, und der Hinterlappen, den man auch als Neurohypophyse bezeichnet, weil er vorwiegend aus Nervensubstanz besteht. Zwischen beiden Teilen befindet sich ein je nach

¹⁾ Inhaltsstoffe des Blutes, *L. Ruzicka, M. W. Goldberg und H. Meister*, *Helv.* **23**, 559 (1940). Zur Kenntnis der Lipide aus Schweinetestes, *L. Ruzicka und V. Prelog*, *Helv.* **26**, 975 (1943). Zur Kenntnis der unverseifbaren Lipide aus arteriosklerotischen Aorten, *E. Hardegger, L. Ruzicka und E. Tagmann*, *Helv.* **26**, 2205 (1943). Zur Kenntnis der unverseifbaren Lipide aus Schweinemilz, *V. Prelog, L. Ruzicka und P. Stein*, *Helv.* **26**, 2222 (1943). Über zwei moschusartig riechende Steroide aus Schweinetestes-Extrakten, *V. Prelog und L. Ruzicka*, *Helv.* **27**, 61 (1944). Über die Isolierung von Chimyl-alkohol aus Testesextrakten und seine Identität mit „Testriol“, *V. Prelog, L. Ruzicka und F. Steinmann*, *Helv.* **27**, 674 (1944).

²⁾ Im folgenden wird H.V.L. als Abkürzung für Hypophysenvorderlappen benützt.

³⁾ *M. Reiss*, Die Hypophyse, in *Carl Oppenheimer*, Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere, Erg.-Werk, Bd. III, 1020 (1936).

⁴⁾ Beim Menschen ist die Frage noch nicht ganz sichergestellt, vgl. *A. Jores*, Klinische Endokrinologie, S. 20 (1939).

⁵⁾ *H. Cushing*, *Bull. John Hopkins Hosp.* (1909), cit. n. *G. Peritz*, l. c., S. 446.

⁶⁾ *B. Aschner*, Handbuch der inneren Sekretion, II, 277 (1929).

der untersuchten Tiergattung mehr oder wenig ausgeprägter Mittel- oder Zwischenlappen (Pars intermedia). Die Verbindung der Hypophyse mit dem Hirn erfolgt durch den Hypophysenstiel (Infundibularteil), der ein Bindeglied zwischen dem Hinterlappen und dem Zwischenhirn darstellt.

Die anatomisch verschiedenen Teile der Hypophyse: Vorder-, Mittel- und Hinterlappen, üben verschiedene physiologische Funktionen aus, wobei sich besonders der Vorderlappen durch die Mannigfaltigkeit seiner Wirkungen auszeichnet.

Der Hypophysenvorderlappen ist ein zentrales Regulationsorgan, von welchem andere, ihm untergeordnete Organe hormonal gesteuert werden. Zu den durch den Vorderlappen der Hypophyse beeinflussbaren Organen rechnet man die Gonaden, die Schild- und Nebenschilddrüse, die Nebennieren, die Bauchspeicheldrüse und die Milchdrüsen.

Die Wirkstoffe, welche diese Organe beeinflussen, nennt man die „glandotropen Hormone“; daneben beeinflusst der H.V.L. auch den Stoffwechsel durch die Ausscheidung von „Stoffwechselhormonen“.

Die glandotropen Hormone des H.V.L. werden nach der ihr untergeordneten Drüse in gonadotrope Hormone (Prolan A und B)¹⁾, thyreotropes Hormon²⁾, parathyreotropes Hormon³⁾, pankreatotropes Hormon⁴⁾ und Laktationshormon (Prolactin⁵⁾) eingeteilt.

Nach ihrer Funktion im Körperhaushalt unterscheidet man folgende Stoffwechselhormone des H.V.L.: das Wachstumshormon⁶⁾, die Kohlehydratstoffwechsel-Hormone (das diabetogene Prinzip von *Houssay*⁷⁾ und *Young*⁸⁾, das Kohlehydratstoffwechsel-Hormon von *Anselmino* und *Hoffmann*⁹⁾, das kontrainsulinäre Hormon¹⁰⁾, das Fettstoffwechsel-Hormon¹¹⁾ und das Eiweißstoffwechsel-Hormon¹²⁾.

Insgesamt sind in der Hypophyse 28 mehr oder weniger definierte Wirkstoffe nachgewiesen worden. Allgemein wird heute die Eiweißnatur dieser H.V.L.-Hormone anerkannt¹³⁾, obwohl mehrmals mitge-

1) *B. Zondek*, Die Hormone des Ovariums und des Hypophysenvorderlappens, 2. Aufl., Wien (1935).

2) *L. Loeb* und *R. B. Bassett*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **26**, 860 (1929).

3) *K. J. Anselmino*, *F. Hoffmann* und *L. Herold*, Klin. Wschr. **13**, 45 (1934).

4) *K. J. Anselmino* und Mitarbeiter, ebenda, **12**, 1245, 1435 (1933).

5) *H. E. Voss*, Ergebn. der Physiol. **44**, 96 (1941).

6) *H. M. Evans* und *J. A. Long*, Anat. Rec. **21**, 61 (1921).

7) *A. B. Houssay*, Klin. Wschr. **11**, 1529 (1932); **12**, 773 (1933).

8) *F. G. Young*, Lancet **1937**, II, 372.

9) *K. J. Anselmino* und *F. Hoffmann*, Arch. exp. Path. u. Pharm. **179**, 273 (1935); *K. J. Anselmino*, Schweiz. Med. Wschr. **18**, 1061 (1937).

10) *H. Lucke*, Ergebn. inn. Med. **46**, 94 (1934).

11) *K. J. Anselmino* und *F. Hoffmann*, Klin. Wschr. **10**, 2380 (1931); „Lipoitrin“, *W. Raab*, Klin. Wschr. **5**, 1516 (1926), **13**, 281 (1934).

12) *K. Paschki* und *A. Schwoner*, Wien. Klin. Wschr. **50**, 1516 (1937).

13) *M. Reiss*, l. c., 1055.

teilt wurde, dass auch die Lipoidextrakte bestimmte Wirkungen ausüben. Über physiologische und physiologisch-chemische Untersuchungen der Hypophyse besteht eine sehr umfangreiche Literatur¹⁾. Da die vorliegende Arbeit sich nur mit den Lipoiden des Hypophysenvorderlappens befasst, sollen hier nur die physiologischen Wirkungen der Lipoide besonders erwähnt werden.

In einer älteren Untersuchung gibt *Launois*²⁾ an, dass die Lipoide der Hypophyse ein Sekretionsprodukt sind und von der Drüse in die Blutbahn ausgeschieden werden. Dagegen betrachtet *E. J. Kraus*³⁾ die Lipoide der Hypophyse als normale Zellbestandteile. *H. Iscovesco*⁴⁾ isolierte aus Hypophyse ein in Äther-Alkohol lösliches Lipoid, welches durch Aceton gefällt wurde. Chemisch wurde dieses Präparat nicht weiter untersucht, dagegen hat *Iscovesco* seine biologischen Wirkungen genau beschrieben. Es wirkt funktionsanregend auf die Hypophyse selbst, sowie auf die Nebennieren, und nach längerer Behandlung werden Veränderungen der Haut und des Haarkleides der Versuchstiere beobachtet. Im Acetonextrakt von Hypophysenvorderlappen wollen *B. Lustig* und *H. K. Wachtel*⁵⁾ einen Faktor nachgewiesen haben, welcher bei Pflanzen und Tieren wachstumsbeschleunigend wirken soll. Angeblich ist der Wirkstoff nicht identisch mit dem somatotropen Hormon von *Evans*⁶⁾, da es kein Albumin enthält und gegen Hitze und Alkali stabil ist. Ebenso schrieb man einem Extrakt, welcher durch Extraktion mit Äther-Methanol gewonnen wurde, eine Wirkung auf das Wachstum der Brustdrüse der Ratte zu⁷⁾. Wie

¹⁾ Übersichten und Zusammenfassungen der letzten Jahre, in Handbüchern: *Chr. Bomskow*, Methodik der Hormonforschung, Bd. 2, XXIX, S. 1016 (Leipzig). *A. E. Severinghaus*, *P. E. Smith*, *P. Ancel*, *S. Aschheim*, *F. G. Young*, Les Hormones Sexuelles, III, L'Hypophyse (Paris) (1938). *G. Peritz*, Die Hypophyse, in *Carl Oppenheimer*, Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere, IX, 435—496 (1927), *M. Reiss*, Die Hypophyse, in *Oppenheimer*, l. c., Erg.-Werk, Bd. III, 1020 (1936). *K. J. Anselmino* und *F. Hoffmann*, Die Wirkstoffe des Hypophysenvorderlappens, im Handbuch der exp. Pharmakol., Erg.-Werk, Bd. IX, Berlin, *J. Springer* (1941).

In Monographien: *H. B. van Dyke*, The Physiology and the Pharmacology of the Pituitary Body, Chicago, *University of Chicago Press* (1936), 593 S. *Walter Timme*, The Pituitary Gland, Baltimore, *Williams and Wilkins* (1938), 788 S. *A. Jores*, Klinische Endokrinologie, Berlin, *J. Springer* (1939).

In Zeitschriften: *J. B. Collip*, *Edinburg med. J.* **45**, 782—804 (1938), *C.* **1939**, I, 2806. *D. L. Thomson* und *J. B. Collip*, *Ann. Rev. Physiol.* **2**, 304 (1940). *E. C. Dodds*, *Lancet* **237**, 800 (1939). *A. Jores*, *Vit. u. Horm.* **1**, 165 (1941). (Wechselbeziehungen zwischen Hypophyse und Gonaden.) *W. Berblinger*, *Ergebn. Vit. u. Hormonf.* **1**, 191 (1941). Über die Pathophysiologie der Hypophyse, *J. Bauer*, *Wien. Klin. Wschr.* **49**, 673 (1936). Über die H.V.L.-Therapie, *W. Lindemann*, *Z. Gynäkol.* **62**, 635 (1938).

²⁾ *Launois*, *C. r.* **1904**, cit. nach *G. Peritz*, l. c. S. 444.

³⁾ *Beitr. Path. Anat.* (Ziegler) **54**, 520 (1912).

⁴⁾ *Bull. de la Soc. méd. du Hôp. de Paris*, 20 Déc. 1912, cit. nach *G. Peritz*, l. c., *C. r. Soc. Biol.* **1911**, II, 700, **1912**, I, 228, 258, *C.* **1913**, I, 314.

⁵⁾ *Nature* **143**, 602 (1939).

⁶⁾ l. c. S. 6.

⁷⁾ *A. A. Lewis*, *C. W. Turner* und *E. T. Gomez*, *Endocrin.* **24**, 157 (1939), *C.* **1939**, II, 884. Siehe auch *C.* **1940**, II, 2910.

vorsichtig man in der Beurteilung solcher Befunde sein muss, zeigen spätere Untersuchungen, in welchen nachgewiesen wurde, dass sich der Wirkstoff, der die Brustdrüse beeinflusst, in den Proteinfraktionen befindet¹⁾ und wahrscheinlich Eiweissstruktur besitzt²⁾. In den Lipoidextrakten aus der Hypophyse schwangerer Rinder wurde kein Progesteron gefunden³⁾.

Es sind also eindeutige physiologische Wirkungen der Lipide aus Hypophyse nicht bekannt. Wie im folgenden gezeigt wird, sind auch die Kenntnisse über ihre chemische Zusammensetzung gering.

2. Über die chemische Zusammensetzung der Lipide aus Hypophyse.

Eine der Ursachen unserer geringen Kenntnisse über die Lipide der Hypophyse ist wahrscheinlich die schwierige Beschaffung der grossen Materialmengen, die für eine chemische Untersuchung benötigt werden⁴⁾.

Die älteren Untersuchungen über die chemischen Bestandteile der Hypophyse sind deshalb meist mit histologischen Methoden durchgeführt worden, wie z. B. die ausführlichen Arbeiten von *E. J. Kraus*⁵⁾, über die Doppelbrechung und das Verhalten der Lipide aus Hypophyse gegen verschiedene Farbstoffe. Über die Arbeiten von *H. Iscovesco*⁶⁾ wurde schon berichtet.

Ausführliche analytisch-chemische Untersuchungen an Hypophysenvorderlappen sind von *C. G. MacArthur*⁷⁾ durchgeführt worden. Von ihm stammen folgende Zahlenangaben, die sich auf das frische Organ beziehen.

Gesamtlipide	3,16%
Cholesterin	0,375%
Phosphatide	2,45%
Kephalin	1,45%
Lecithin	0,84%
Cerebroside	0,55—0,60%.

Der H.V.L. besitzt demnach eine ähnliche Zusammensetzung wie die graue Hirnrinde.

In neuerer Zeit ist nur eine Untersuchung über die Lipide des Hypophysenvorderlappens, und zwar von *R. E. Marker* und *E. L. Wittbecker*⁸⁾ durchgeführt worden. In dieser Arbeit wurden aus 1000

¹⁾ *R. O. Greep* und *H. E. Stavelly*, *Endocrin.* **29**, 18. Juli (1941), C. **1942**, I, 767.
²⁾ *J. J. Trentin*, *A. A. Lewis*, *A. J. Berman* und *C. W. Turner*, *Endocrin.* **33**, 67 (1943), B. A. **1943**, III, 886.
³⁾ *J. J. Trentin*, *J. P. Mixner*, *A. A. Lewis* und *C. W. Turner*, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **46**, 440 (1941), B. A. **1942**, III, 765.
⁴⁾ Das Gewicht der menschlichen Hypophyse beträgt z. B. nur 500—800 mg, *G. Peritz*, *l. c. S.* 7, 438.
⁵⁾ *Beitr. Path. Anat. (Ziegler)* **54**, 520 (1912).
⁶⁾ *H. Iscovesco*, *l. c. S.* 7.
⁷⁾ *Am. Soc.* **41**, 1225 (1919). ⁸⁾ *Am. Soc.* **63**, 1031 (1941).

„pound“ Rinder-H.V.L. 3,5 kg Acetonextrakt hergestellt. Bei der Untersuchung des Extraktes, die mit spezieller Beachtung der Sterinfraktionen durchgeführt wurde, konnten neben Cholesterin keine anderen Steroide nachgewiesen werden. Die weiteren isolierten Verbindungen oder Krystallisate waren: 1. Natriumstearat, 2. ein wasserlösliches Produkt $C_8H_{10}N_4O_4$ oder $C_{10}H_{13}N_5O_5$, 3. eine Substanz Smp. 79—81°, welche 76,47 % C und 12,53 % H enthielt, Mol.-Gew. 551,7, 4. eine Substanz Smp. 96—98° mit 76,5 % C und 12,4 % H ($C_{20}H_{40}O_2$?), Mol.-Gew. 324, 5. ein Kohlenwasserstoff.

II. Theoretischer Teil.

A. Aufarbeitung des Acetonextraktes aus Hypophysenvorderlappen.

a) Allgemeines.

Der von mir untersuchte H.V.L.-Extrakt war durch Extraktion der frischen Hypophysenvorderlappen mit Aceton hergestellt worden.

Die Acetonextrakte aus Organen enthalten als Hauptbestandteile: 1. Fette (Fettsäureglyceride) und andere neutrale Fettsäureester, 2. freie Fettsäuren, 3. Phospholipoide und verwandte Verbindungen (die meisten Phospholipoide sind nur wenig löslich in Aceton), 4. neutrale unverseifbare Verbindungen, wie Sterine, Vitamine, höhere Alkohole, Äther und Kohlenwasserstoffe. Das Ziel dieser Arbeit war besonders diese letztere Gruppe von Verbindungen, die meistens als „Unverseifbare“ bezeichnet wird, zu untersuchen. Die Isolierung des Unverseifbaren bei der Verarbeitung grösserer Mengen von Organextrakten ist jedoch eine Operation, die mit verschiedenen Schwierigkeiten verbunden ist, besonders wenn es sich um die Isolierung der in kleinen Mengen vorkommenden Inhaltsstoffe handelt.

Die Entfernung der freien Fettsäuren und Phospholipoide wurde dadurch erreicht, dass der Extrakt in ätherischer Lösung in einer Stickstoffatmosphäre mit sehr verdünnter Lauge gewaschen wurde. Hierbei muss man die Bildung von Emulsionen, welche durch die entstehenden Seifen verursacht werden, zu verhindern suchen. Diese Schwierigkeit wurde durch Anwendung einer speziellen Apparatur umgangen, welche im experimentellen Teil (S. 22) näher beschrieben ist¹⁾. Aus 0,70 kg H.V.L.-Ätherextrakt wurden auf diese Weise 410 g neutrale Anteile und 215,1 g saure Anteile erhalten.

¹⁾ Eine weitere Möglichkeit für die Entfernung der Säuren ohne Emulsionsbildung ist in einem Patent der *Schering A. G.* beschrieben worden (D.R.P. 105323 (1938)). Hierbei wird der in einem wasserfreien Lipoidlösungsmittel gelöste Extrakt mit festen Alkalien, wie z. B. Calciumhydroxyd, dem eventuell ein Trocknungsmittel, wie entwässertes Natriumsulfat, zugegeben wird, behandelt. Diesem Verfahren prinzipiell ähnlich ist die Entfernung der freien Fettsäuren durch Adsorption der Säuren aus der Lösung in Petroläther oder ähnlichen Lösungsmitteln an ein basisches Adsorptionsmittel wie z. B. Alu-

Nachdem sowohl die freien Säuren als auch andere saure Anteile, wie z. B. Phospholipoide, entfernt worden waren, mussten noch die Fette von dem Unverseifbaren getrennt werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch Molekulardestillation erreicht. Die Fettsäure-glyceride und die meisten anderen in der Natur vorkommenden Ester, wie Fettsäure-sterinester, besitzen einen sehr niedrigen Dampfdruck, und es ist deshalb möglich, durch Destillation bei niedrigem Druck, unter den Bedingungen der sogenannten Molekulardestillation, die leichter flüchtigen, unverseifbaren Neutralstoffe abzutrennen.

Auf diese Weise lassen sich verschiedene Nachteile der anderen möglichen Verfahren umgehen. So wurde bei der Untersuchung der Lipide des Hypophysenvorderlappens von *R. E. Marker* und *E. L. Wittbecker*¹⁾ der Hauptanteil der Triglyceride durch mehrmaliges Ausfrieren aus Petroläther entfernt. Dass dabei neben den Fetten auch andere Stoffe mitgerissen werden, lässt sich jedoch schwer vermeiden. Auch die Verteilung zwischen verschiedenartigen Lösungsmitteln, die zur Isolierung der Harn-²⁾ und der Nebennierenrindensteroiden³⁾ und des Testosterons aus Testesextrakten⁴⁾ diente, wollte ich nicht anwenden. Sie kann mit Vorteil dort gebraucht werden, wo man sich durch physiologische Testmethoden über die anzuwendenden Lösungsmittel und den Grad der erreichten Trennung orientieren kann, was bei dem H.V.L.-Extrakt nicht der Fall war.

Eine vollständige Entfernung der Fettsäureester, der Phosphatide und der freien Säuren kann durch alkalische Verseifung erreicht werden. Die Verseifung ist mit dem schwerwiegenden Nachteil verbunden, dass durch das Kochen mit Lauge die alkaliempfindlichen Verbindungen, wie α , β -ungesättigte Ketone, α -Oxyketone, Aldehyde usw., zerstört werden. Die Entfernung der mitgerissenen unverseifbaren Verbindungen aus den Seifen ist sehr schwierig, ausserdem bietet die Verarbeitung der Seifen eine Gelegenheit zur Oxydation der empfindlichen Inhaltsstoffe, wie z. B. Cholesterin, durch Luft-sauerstoff⁵⁾.

miniumoxyd (*M. Lowry*, Bull. Mat. grasses Inst. colon. Marseille **27**, 151—161 (1943), C. **1944**, I, 906). Eine Entfernung der freien Fettsäuren durch Durchleiten von überhitztem Wasserdampf, eventuell unter vermindertem Druck, wie es in der Technik angewandt wird, ist ein zu energisches Verfahren, um bei der Bearbeitung von Organextrakten Anwendung zu finden. (Vgl. D.R.P. 397332, *Lurgi Gesellschaft für Wärmetechnik*, E. P. 242316, *Levers Brothers Ltd.*, E.P. 438056 *Imperial Chemical Industries*.)

¹⁾ Am. Soc. **63**, 1031 (1941).

²⁾ *A. Butenandt* und *K. Tscherning*, Z. physiol. Ch. **229**, 175 (1934).

³⁾ *J. J. Pfiffner*, *H. M. Vars* und *A. R. Taylor*, J. Biol. Chem. **106**, 625 (1934). *T. Reichstein*, Helv. **19**, 29, 1107 (1936), **20**, 953 (1937).

⁴⁾ *E. Laqueur*, *K. G. David*, *E. Dingemans* und *J. Freud*, U.S.P. 2175963 (1937).

⁵⁾ Vgl. *V. Prelog*, *L. Ruzicka* und *P. Stein*, Helv. **26**, 2230 (1943).

b) Trennung durch Molekulardestillation.

Der Vorgang der Molekular- oder Kurzwegdestillation, der zuerst von *I. Langmuir*¹⁾ theoretisch behandelt wurde, ist eine Verdampfungsdestillation bei geringem Druck. Die freien Weglängen der verdampfenden Molekel werden dabei so gross, dass die Molekel aus dem Bereich der gegenseitigen Anziehung gelangen. Sie werden mit Hilfe von Kondensationsflächen aufgefangen und so bei niedrigen Destillationstemperaturen, unter Vermeidung von Zersetzung, Polymerisation usw. von dem Destillationsgut getrennt.

In den letzten Jahren hat sich die Molekulardestillation zu einer vielfach angewandten Methode entwickelt und wurde verschiedentlich, wie z. B. von *H. I. Waterman* und *C. van Vlodrop*²⁾, *S. B. Detwiler* und *K. S. Markley*³⁾, *S. B. Detwiler*⁴⁾, *F. Wittka*⁵⁾, *N. D. Embree*⁶⁾ und *K. C. D. Hickman*⁷⁾ zusammenfassend dargestellt. Eine Übersicht über die Patentliteratur gibt *D. D. Howat*⁸⁾.

Bei der Molekulardestillation stören schon geringe Mengen solcher Stoffe, welche, wie z. B. die Phosphatide, infolge der Zersetzung durch Wärmeeinwirkung Gase entwickeln und so durch Schäumen und Spritzen die Destillation verunmöglichen⁹⁾.

Um sich ein Bild über die Trennungsmöglichkeiten der verschiedenen Substanzen bei der Molekulardestillation machen zu können, hat man die sogenannten Eliminationskurven bestimmt¹⁰⁾. Aus diesen ist ersichtlich, dass das Eliminationsmaximum der unveresterten Steroide bei 140–150° und das der Triglyceride erst über 200° liegt¹¹⁾¹²⁾. Es ist deshalb eine Trennung der Steroide von den Fetten durch Molekulardestillation bei Temperaturen zwischen 100–200° möglich,

¹⁾ *Physic. Rev.* **8**, 149 (1916).

²⁾ *Rev. chim. ind.* **48**, 314 (1939).

³⁾ *Oil & Soap* **16**, 2 (1939).

⁴⁾ *Oil & Soap* **17**, 241 (1940).

⁵⁾ *Z. angew. Ch.* **53**, 557 (1940).

⁶⁾ *Chemical Reviews* **29**, 317 (1941).

⁷⁾ *Chemical Reviews* **34**, 51 (1944).

⁸⁾ *Chemical Age*, Dec. 1941—Jan. 1942, cit. n. 7).

⁹⁾ Zur Entfernung der störenden Bestandteile war von *E. W. Fawcett* und *A. O. Tischer* (F.P. 789919 (1935), 831255 (1938), E.P. 438056 (1935), 484736 (1938), U.S.P. 204196 (1936), 2117776 (1938)) eine der Molekulardestillation vorangehende Behandlung des Destillationsgutes mit verdünnten Säuren und Alkalien empfohlen worden. Die erwähnten zersetzlichen Stoffe waren durch die beschriebene Waschung mit verdünnter Lauge entfernt worden, so daß die Destillation in dieser Hinsicht glatt verlief.

¹⁰⁾ Über die experimentelle Bestimmung der Eliminationskurven vgl. *K. C. D. Hickman*, *Ind. Eng. Chem.* **29**, 968 (1937), über deren Theorie vgl. *N. D. Embree*, *Ind. Eng. Chem.* **29**, 975 (1937).

¹¹⁾ *E. LeB. Gray* und *J. D. Cawley*, *J. Biol. Chem.* **134**, 397 (1940); *K. C. D. Hickman* und *E. LeB. Gray*, *Ind. Eng. Chem. (Ind. Ed.)* **30**, 796 (1938).

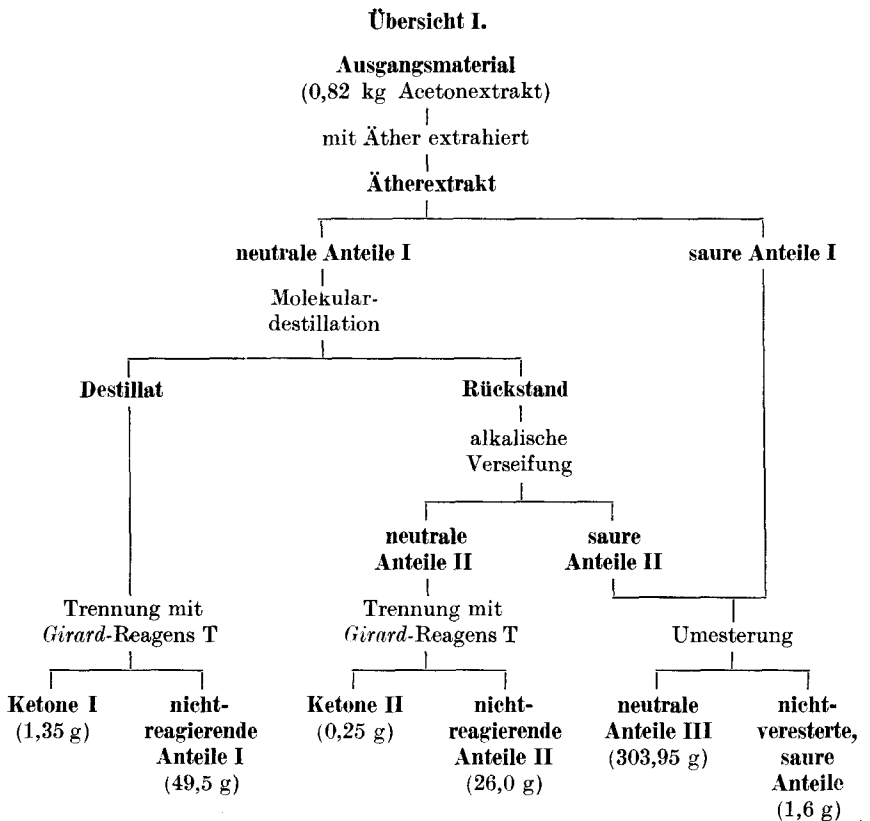
¹²⁾ *K. C. D. Hickman*, *Chemical Reviews* **34**, 96 (1944).

wie auch verschiedentlich in Patenten angegeben wurde¹⁾. Um eine möglichst vollständige Abtrennung der Fette zu erreichen, wurde bei einer möglichst niedrigen Temperatur, d. i. bis 150° destilliert. Dabei blieben nicht nur die Fettsäureglyceride, sondern auch Fettsäureester anderer höherer Alkohole, wie Cholesterinester, sowie Batyl- und Chimylalkohol-ester, welche ähnliche niedrige Dampfdrucke haben wie die Triglyceride, im Destillationsrückstand zurück.

Aus 207,0 g der neutralen Anteile, aus welchen zuerst Cholesterin grösstenteils abgetrennt wurde, konnten insgesamt 58,30 g als Destillat erhalten werden, während 132,20 g als Rückstand zurückblieben.

c) Weitere Aufteilung.

Die weitere Aufteilung des Extraktes ist in der Übersicht I in gekürzter Form schematisch dargestellt.



¹⁾ K. C. D. Hickman und A. O. Tischer, E. P. 489623 (1938); E. W. Fawcett und J. R. Myles, E.P. 487771 (1938), F.P. 830023 (1938).

Das Destillat der Molekulardestillation wurde weiterhin ohne Anwendung der alkalischen Verseifung untersucht, während der Destillationsrückstand, der zum überwiegenden Teil aus Fettsäureglyceriden bestand, der alkalischen Verseifung unterworfen wurde. Die Weiterverarbeitung der bei der Verseifung erhaltenen neutralen Anteile erfolgte in gleicher Weise wie beim Destillat.

d) Abtrennung der Ketone.

Das von *A. Girard* und *G. Sandulesco*¹⁾ eingeführte und zum ersten Male bei der Untersuchung der Steroide aus Harn angewandte *Girard-Reagens T* (Trimethylamino-essigsäure-hydrazid-chlorid) ist schon mehrmals zur Isolierung der Ketone aus Organextrakten verwendet worden.

Es ist dabei zu beachten, dass nicht alle Ketone mit dem *Girard-Reagens T* reagieren. So wurde zuerst von *S. Bergström* und *O. Wintersteiner*²⁾ und später auch von *L. Ruzicka* und *V. Prelog*³⁾ festgestellt, dass sich das $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7) nur sehr schwer mit dem Ketonreagens umsetzt. Auch bei diesem, an sich milden Verfahren ist die Gefahr einer Veränderung der empfindlichen Inhaltsstoffe nicht ausgeschlossen. *S. Bergström* und *O. Wintersteiner*⁴⁾ haben z. B. beim Behandeln mit *Girard-Reagens T* die Umlagerung von 7 β -Oxycholesterin in das Δ^6 -Cholesten-diol-(3 β ,5) unter dem Einfluss der methanolischen Essigsäure beobachten können.

Trotzdem hat sich die Verwendung von *Girard-Reagens T* für die Abtrennung der Carbonyl-Verbindungen als sehr vorteilhaft erwiesen. Es wurden deshalb sowohl aus dem Destillat, als auch aus dem Rückstand der Molekulardestillation mit Hilfe von *Girard-Reagens T* die Ketone von den nichtreagierenden Anteilen abgetrennt.

e) Chromatographische Auftrennung.

Die weitere Auftrennung der bisher erhaltenen Fraktionen erfolgte durch Anwendung der chromatographischen Adsorptionsanalyse⁵⁾. Da es sich bei den vorliegenden Untersuchungen um die Trennung unbekannter und farbloser Verbindungen handelte, wurde nach dem Verfahren des Durchlaufchromatogramms gearbeitet.

1) *Helv.* **19**, 1095 (1936).

2) *J. Biol. Chem.* **141**, 597 (1941).

3) *Helv.* **26**, 975 (1943).

4) *J. Biol. Chem.* **143**, 503 (1942).

5) *L. Zechmeister* und *L. v. Cholnoky*, Die chromatographische Adsorptionsmethode, 2. Aufl., Wien (1938). *H. Brockmann*, *Z. angew. Ch.* **53**, 384 (1940). *H. H. Strain*, Chromatographic Adsorptionanalysis, New York (1942). *G. Hesse*, Adsorptionsmethoden im chemischen Laboratorium, Berlin (1943).

Als Adsorptionsmittel wurde aktiviertes Aluminiumoxyd verwendet. Die Aktivierung der verschiedenen Präparate erfolgte durch mehrstündiges Erhitzen des Aluminiumoxyds in einem Aluminiumgefäß auf 380—400°, die Desaktivierung durch Stehenlassen an der Luft oder durch Schütteln in einer feuchten Atmosphäre. Die Aktivität der Aluminiumoxyde wurde nach *H. Brockmann* und *H. Schodder*¹⁾ geprüft. Es erwies sich als vorteilhaft, je nach dem Charakter der chromatographierten Substanzgemische, Aluminiumoxyde verschiedener Aktivität zu verwenden, wie dies im experimentellen Teil jeweils angegeben ist.

Da die alkaliempfindlichen Verbindungen durch unbehandelte, in der Regel alkalisch reagierende Aluminiumoxyde leicht zerstört oder sonst verändert werden²⁾, wurden teilweise und besonders beim Chromatographieren der Ketone, die mit Salzsäure oder mit Essigester vorbehandelten Präparate verwendet.

Die Untersuchung der bei der chromatographischen Trennung erhaltenen Fraktionen erfolgte durch fraktionierte Destillation im Molekularkolben („molecular still“³⁾) und Krystallisation. In einigen Fällen wurde noch eine Trennung mit Digitonin in fällbare und nicht fällbare Anteile durchgeführt.

B. Über die isolierten Verbindungen.

$\Delta^{4,5}$ -Cholesten-on-(3).

Aus den Ketonen, welche aus dem Destillat der Molekulardestillation erhalten wurden, konnte eine Verbindung $C_{27}H_{44}O$, vom Smp. 80—81° und einem $[\alpha]_D^{25} = + 81,3^\circ$ isoliert werden. Die Verbindung zeigte im U.V. ein Absorptionsmaximum bei 244 $m\mu$ und gab ein o-Tolylsemicarbazon vom Smp. 230—231°⁴⁾. Auf Grund dieser Daten und des Vergleichs mit einem nach *Ruzicka* und Mitarbeiter⁵⁾ hergestellten synthetischen Präparat konnte die Verbindung als $\Delta^{4,5}$ -Cholestenon-(3) („Cholestenon“⁶⁾) identifiziert werden.

Das Vorkommen von Cholestenon in Extrakten aus tierischen Organen war bisher in der Literatur nicht beschrieben worden⁶⁾. Es wurde bisher nur aus den Faeces isoliert. Schon lange war bekannt, dass das

¹⁾ *B. 74, 73* (1941).

²⁾ So werden z. B. Fette durch alkalisches Aluminiumoxyd verseift (*W. Trappe*, *Biochem. Z. 307, 97* (1940)). Ähnliches konnte ich bei der Chromatographierung der neutralen, mit *Girard*-Reagens T nicht reagierenden Anteile I, an einem basischen Aluminiumoxyd (Aktivität III) (Chromatogramm B) beobachten.

³⁾ *T. H. Allen, G. E. Boyd und J. H. Bodine, J. Biol. Chem. 143, 786* (1942).

⁴⁾ *O. Rosenheim und T. A. Webster, Biochem. J. 37, 513* (1943).

⁵⁾ *L. Ruzicka, H. Brüngger, H. Eichenberger und J. Meyer, Helv. 17, 1412* (1934).

⁶⁾ Vor kurzem wurde Cholestenon in unserem Laboratorium von *R. Schett*, *Diss. E.T.H. 1945*, auch in Schweinetestes-extrakt gefunden.

Steringemisch aus den Faeces des Menschen und der Carnivora hauptsächlich aus Koprosterin neben Spuren von Cholesterin und Dihydrocholesterin besteht¹⁾. Da Koprosterin als Bestandteil der Körpersterine nicht bekannt ist, war die Umwandlung von Cholesterin in Koprosterin im Darm wahrscheinlich, wie es fast gleichzeitig von *R. Schoenheimer* und Mitarbeiter²⁾ und von *O. Rosenheim* und *T. A. Webster*³⁾ angenommen wurde. Diese Autoren betrachteten das Cholestenon als Zwischenprodukt bei diesem Übergang. Dazu lieferten Stoffwechselversuche mit Deuterocholestenon eine weitere Stütze⁴⁾. Den endgültigen Beweis, dass Cholestenon in Faeces vorkommt, brachten *O. Rosenheim* und *T. A. Webster*⁵⁾ durch die Isolierung desselben als *o*-Tolylsemicarbazon aus Faeces von Ratten, welche mit Gehirnbrei gefüttert wurden.

Da nach diesen Versuchen Cholestenon eine Rolle im Steroidstoffwechsel spielt, wäre der Beweis für sein Vorkommen im Hypophysenvorderlappen von Interesse. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß das aus H.V.L.-Extrakt isolierte Cholestenon unter Umständen aus Cholesterin während der Aufarbeitung, insbesondere bei der Molekulardestillation, entstehen könnte. Schon sehr früh wurde durch *O. Diels* und *E. Abderhalden*⁶⁾ gezeigt, daß durch Erhitzen von Cholesterin mit CuO auf 290° Cholestenon entsteht. Die Bildung von Cholestenon durch Erhitzen auf 310° glauben *O. Diels* und *K. Linn*⁷⁾ durch Spuren von Eisen oder Zink katalytisch begünstigt zu haben. *I. M. Heilbron* und *W. A. Sexton*⁸⁾ zeigten, daß durch trockene Destillation bei 240–310° aus Cholesterin, ohne irgendwelche Zusätze, Cholestenon erhalten werden kann. Wenn auch bei der Molekulardestillation solche hohen Temperaturen nicht verwendet wurden – es wurde nie über 150–160° erhitzt – so erscheint eine Dehydrierung eines sehr kleinen Teils des Cholesterins zu Cholestenon doch nicht ausgeschlossen.

Chimylalkohol.

Aus dem Rückstand der Molekulardestillation erhielt ich nach der Verseifung, aus den mit *Girard*-Reagens T nicht reagierenden Anteilen, eine Verbindung C₁₉H₄₀O₃, vom Smp. 63,5–64° und einem $[\alpha]_D^{16} = +3,7^\circ$, welche ein Di-(phenylurethan) C₃₃H₅₀O₅N₂ vom Smp. 98 bis

¹⁾ *R. Schoenheimer, H. v. Behring, R. Hummel und L. Schindel, Z. physiol. Ch. 192, 73 (1932).*

²⁾ *R. Schoenheimer, D. Rittenberg und M. Graff, J. Biol. Chem. 111, 183 (1935).*

³⁾ *Nature 136, 474 (1935).*

⁴⁾ *M. Anchel und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. 125, 23 (1938).*

⁵⁾ *Biochem. J. 35, 920 (1941), 37, 513 (1943).*

⁶⁾ *B. 37, 3099 (1904), siehe auch O. Diels, W. Gaedke und P. Körding, A. 459, 1 (1927).*

⁷⁾ *B. 41, 260 (1908).*

⁸⁾ *Soc. 1928, 347.*

98,5⁰ gab. Aus diesen Daten lässt sich schliessen, dass es sich um Chimylalkohol handelt.

Das Vorkommen dieser Verbindung in den Leberölen verschiedener Meerfische, insbesondere der Haifische, wurde zuerst von *M. Tsujimoto* und *Y. Toyama*¹⁾ festgestellt. In letzter Zeit konnte Chimylalkohol auch in Säugetierorganen gefunden werden, so wurde er z. B. aus Stier- und Schweinetestes²⁾ und aus Schweinemilz³⁾ isoliert.

I. M. Heilbron und Mitarbeiter⁴⁾ zeigten, dass der Chimylalkohol die Konstitution eines Hexadecyl- α -glyceryl-aethers besitzt⁵⁾. Sie stellten auch den racemischen Chimylalkohol synthetisch her. *E. Baer* und *H. O. L. Fischer*⁶⁾ führten dann die Synthese der beiden optischen Antipoden durch. Der synthetische *d*-(*n*-Hexadecyl)- α -glyceryl-äther war identisch mit dem natürlich vorkommenden Chimylalkohol. *Baer* und *Fischer* wiesen auch auf die Möglichkeit einer Entstehung des Chimylalkohols aus den Plasmalogenen von *Feulgen*⁷⁾ hin.

Die Isolierung des Chimylalkohols aus den unverseifbaren Anteilen des Rückstandes von der Molekulardestillation deutet darauf hin, dass er im ursprünglichen Extrakt als Fettsäureester anwesend war, wie es auch für die Fischleber-öle angenommen wird⁸⁾. Die Funktion der α -Glyceryläther und ihrer Fettsäureester im Organismus ist unbekannt⁹⁾.

Glycerin-monoester.

(Palmitin- und Stearinsäure-monoglycerid)

Das Vorkommen kleiner Mengen von Palmitin- und Stearinsäuremonoester des Glycerins neben den Triglyceriden in Fetten ist schon längere Zeit bekannt. Im Gegensatz zu den Triglyceriden destillieren

¹⁾ Chem. Umschau Fette, Öle, Wachse und Harze **29**, 27, 35, 43 (1922), **31**, 13, 153 (1924). Vgl. auch *Z. Nakamiya*, Bull. Inst. Physic. and Chem. Research **17**, 837 (1938), **18**, 43 (1939).

²⁾ *V. Prelog*, *L. Ruzicka* und *F. Steinmann*, Helv. **27**, 674 (1944).

³⁾ *V. Prelog* und *H. C. Beyerman*, Helv. **28**, 350 (1945).

⁴⁾ *I. M. Heilbron* und *W. M. Owens*, Soc. **1928**, 942; *G. G. Davies*, *I. M. Heilbron* und *W. M. Owens*, Soc. **1930**, 2542; *W. H. Davies*, *I. M. Heilbron* und *W. E. Jones*, Soc. **1933**, 165, **1934**, 1232.

⁵⁾ Vgl. Untersuchungen an Oberflächenfilmen der α -Glyceryläther, *B. C. J. G. Knight*, Biochem. J. **24**, 256 (1930); *N. K. Adam*, Soc. **1933**, 164.

⁶⁾ *J. Biol. Chem.* **140**, 397 (1941).

⁷⁾ *R. Feulgen*, *K. Imhäuser* und *M. W. Behrens*, Z. physiol. Ch. **180**, 170 (1929); *R. Feulgen* und *M. Behrens*, ebenda **256**, 15 (1938); *R. Feulgen* und *H. Grünberg*, ebenda **257**, 161 (1939).

⁸⁾ *E. André* und *A. Bloch*, C. r. **195**, 627 (1932).

⁹⁾ *E. Agduhr* (Z. Vitaminf. **5**, 27 (1936)) fand, dass freier Batylalkohol eine schädigende Wirkung auf das Gewebe ausübt, während *Holmes* und Mitarbeiter die Einwirkung von Batylalkohol auf Agranulocytosis untersuchen wollen (*H. N. Holmes*, *R. E. Corbet*, *W. B. Geiger*, *N. Kornblum* und *W. Alexander*, Am. Soc. **63**, 2607 (1941)).

die Monoglyceride unter den Bedingungen der Molekulardestillation schon bis 150° und konnten durch Anwendung der chromatographischen Analyse in reiner Form erhalten werden.

Verbindung A.

Neben dem Chimylalkohol wurde aus den unverseifbaren Anteilen des Rückstandes von der Molekulardestillation in sehr kleinen Mengen ein Krystallisat von Smp. 97–98° erhalten. Die Substanz war in den Lipoidlösungsmitteln wie Pentan, Hexan, Äther schlecht löslich. Sie enthielt 55,87% C und 9,63% H. Dieses Analysenergebnis und die starke Adsorption an Aluminiumoxyd sprechen für eine aliphatische Polyoxyverbindung.

Kohlenwasserstoffe.

Das Vorkommen von Kohlenwasserstoffen in Organextrakten ist sehr oft beobachtet worden. *J. A. Gardner* und *H. Gainsborough*¹⁾ konnten zeigen, dass es sich dabei wahrscheinlich um Verunreinigungen und nicht um genuine Inhaltsstoffe handelt.

C. Über die androgenen und oestrogenen Wirkstoffe aus Hypophysenvorderlappen.

a) Wirkung der Gonaden auf den Hypophysenvorderlappen²⁾.

Schon lange war bekannt³⁾, dass Gonadektomie bei beiden Geschlechtern zu einer Überfunktion der Hypophyse führt, die mit charakteristischen geweblichen Veränderungen des Vorderlappens verbunden ist. Hieraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass zwischen den von den Gonaden produzierten Hormonen und den Hypophysenvorderlappen ein Zusammenhang besteht. Dieser Zusammenhang wurde verschiedentlich untersucht, indem man die Folgen der Gonadektomie und die Wirkungen von Gonadenextrakten, Harnkonzentraten und reinen kristallisierten Gonadenhormonen auf den Hypophysenvorderlappen normaler und kastrierter Versuchstiere geprüft hat. Es wurden sowohl anatomische Veränderungen des Hypophysenvorderlappens, als auch Änderungen in seiner physiolo-

¹⁾ Biochem. J. **82**, 1631 (1934).

²⁾ Vgl. Ann. Rev. Biochem. **5**, 328 (1936), **6**, 312 (1937), **7**, 269 (1938), **8**, 301 (1939), **9**, 344 (1940); *F. C. Koch*, „The male sex hormones“, IV, The testishormone control of the anterior pituitary, *Physiological Reviews* **17**, 203 (1937); *W. Berblinger*, „Die Wechselbeziehungen zwischen Hypophyse und Keimdrüsen“, *Ergebn. Vit. u. Hormonf.* **1**, 192 (1938).

³⁾ *A. Biedl*, *Innere Sekretion* **2**, 107 (1912); *J. Lehmann*, *Pflüger's Arch.* **216**, 729 (1927).

gischen Tätigkeit beobachtet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen hier kurz zusammengefaßt werden.

Ausschaltung der inneren Sekretion des Hodens, durch Kastration oder schwere Atrophie desselben, erzeugt am Hypophysenvorderlappen Gewebsveränderungen. Zugleich ist im Harn ein erhöhter Gehalt an gonadotropem Hormon festzustellen; bei Implantationsversuchen zeigt die Hypophyse kastrierter Versuchstiere eine grössere gonadotrope Wirksamkeit als diejenige der normalen Tiere. Auch an gonadektomierten weiblichen Tieren sind Veränderungen des Gewebes am Vorderlappen zu sehen und der Harn weist einen erhöhten Gehalt an gonadotropem Hormon Prolan A auf. Bei weiblichen Ratten konnten die Veränderungen durch Injektionen von Androsteron, Androstan-diol und Androsten-dion verhindert werden¹⁾. Aus allen diesen Versuchen folgt, dass verminderte oder aufgehobene Funktion der Gonaden auf die Tätigkeit des Hypophysenvorderlappens im Sinne einer Enthemmung wirkt²⁾.

Für eine solche Wirkung der männlichen und weiblichen Gonadenhormone auf die Hypophyse sprechen auch teilweise die Ergebnisse, die bei der Behandlung normaler Tiere mit reinen Gonadenhormonen erhalten wurden, obwohl hier die Verhältnisse begreiflicherweise bedeutend komplizierter sind. So zeigten z. B. die Hypophysen der männlichen Ratten, welche mit androgenen Verbindungen, wie Testosteron, Testosteron-estern, Androsteron usw., behandelt wurden, im Implantationsversuch eine abgeschwächte gonadotrope Wirkung³⁾, während die Oestrogene je nach Umständen den Hypophysenvorderlappen hemmend oder fördernd beeinflussen können⁴⁾. Eine Behandlung von weiblichen Tieren mit androgenen Stoffen hemmt ebenfalls die Ausscheidung von gonadotropem Hormon im Harn.

Alle diese Versuche beweisen, dass die Gonadenhormone auf die Funktion der Hypophysenvorderlappen einen Einfluss haben, wobei allerdings nichts Bestimmtes darüber bekannt ist, ob dieser Einfluss auf direktem oder indirektem Wege ausgeübt wird. Es war deshalb interessant, zu prüfen, ob sie in den Hypophysenvorderlappen nachweisbar sind.

b) Über die Anreicherung der androgenen und oestrogenen Wirkstoffe aus Hypophysenvorderlappen.

Die Konzentration der Gonadenhormone ist sogar in den Gonaden sehr gering; so enthalten Stiertestes nach *T. F. Gallagher* und

¹⁾ *W. O. Nelson* und *T. F. Gallagher*, *Science* **84**, 230 (1936).

²⁾ *W. Berblinger*, *Ergebn. Vit. u. Hormonf.* **1**, 206 (1938).

³⁾ *R. Herz* und *R. K. Meyer*, *Endocrin.* **21**, 756 (1937), cit. nach *Ann. Rev. Biochem.* **7**, 270 (1938).

⁴⁾ *W. Hohlweg*, *Klin. Wschr.* **13**, 92 (1934). *W. Berblinger*, *Ergebn. Vit. u. Hormonf.* **1**, 206 (1938).

*F. C. Koch*¹⁾ etwa 20 H.K.E. und nach *E. Laqueur*²⁾ 30 H.K.E. pro kg Hoden, was etwa 300 bis 450 γ Testosteron/kg Hoden entspricht; der Gehalt an Oestrogenen in Schweineovarien beträgt etwa 240 R.E. pro kg³⁾. In anderen Organen muss diese Konzentration noch bedeutend kleiner sein, und es sind nur wenige und unzuverlässige Angaben darüber bekannt. So geben *S. Hirano* und *Y. Yamanoi*⁴⁾ an, dass die Prostata und die Samenblase des Schweines nur die Hälfte, bzw. ein Zehntel, und die Erythrocyten und das Blutserum des Ochsen nur $\frac{1}{8}$, bzw. $\frac{1}{32}$ der androgenen Wirkung des Hodens zeigen. Es wurden jedoch von diesen Autoren nur wenige Versuche mit geringen Mengen von Organen durchgeführt. Unsere Kenntnisse über die Konzentration der Gonadenhormone in den Organen der Säugetiere, außer den Gonaden selbst, sind demnach sehr unvollständig.

Bei der Bestimmung der Androgene und Oestrogene in dem Hypophysenvorderlappen-Extrakt mussten folgende Umstände berücksichtigt werden:

1. Die androgenen und die oestrogenen Hormone wirken bei den üblichen Testmethoden, Kapaunenkamm-Test und *Allen-Doisy*-Test, antagonistisch, sie neutralisieren sich in ihrer Wirkung auf das Testobjekt gegenseitig. Man muss sie deshalb vor der Testierung trennen.

2. Wegen der geringen Konzentration der Hormone muss zuerst eine weitgehende Anreicherung durchgeführt werden, damit die physiologischen Testmethoden zuverlässige Werte liefern. Diese Anreicherung muss mit solchen Methoden durchgeführt werden, welche die empfindlichen Hormone nicht zerstören. Es ist dabei unter anderem besonders an die Alkaliempfindlichkeit des Testosterons zu denken. Dies wurde in der vorliegenden Untersuchung so weit wie möglich berücksichtigt.

3. Es ist möglich, dass die Konzentration der androgenen und oestrogenen Hormone bei männlichen und weiblichen Tieren stark verschieden ist. Da das Geschlecht der Rinder, deren Hypophysen zur Herstellung des verwendeten Extraktes dienten, nicht bekannt ist, konnte dieser Umstand nicht berücksichtigt werden.

Die neutralen Anteile des Hypophysenvorderlappens wurden auf androgene Wirksamkeit geprüft. Die gesamte feststellbare androgene Wirkung des Hypophysenvorderlappen-Extraktes war aus dem bis 155° übergehenden Destillat in der Ketonfraktion enthalten. Die androgene Wirksamkeit dieser Fraktion entsprach der androgenen Wirksamkeit von 8 γ Testosteron/kg H.V.L.

¹⁾ J. Biol. Chem. **94**, 495 (1929).

²⁾ U.S.P. 2175963 (1937).

³⁾ *W. W. Westerfeld, S. A. Thayer, D. W. MacCorquodale* und *E. A. Doisy*, J. Biol. Chem. **126**, 181 (1938).

⁴⁾ J. Pharm. Soc. Japan **58**, 143 (1938).

Die bisher bekannten, in der Natur vorkommenden Verbindungen mit oestrogener Wirkung, wie Oestron, die Oestradiole, Oestriol, Equilin, Equilenin usw. haben alle phenolischen Charakter. Es wurde deshalb angenommen, dass solche Verbindungen in sauren Anteilen des Extraktes, die sich mit methanolischer Salzsäure nicht verestern liessen, enthalten sind. Diese Anteile wurden im Rattentest nach *Allen-Doisy*¹⁾ geprüft. Es konnte jedoch keine oestrogene Wirkung, bei Anwendung solcher Mengen gefunden werden, welche noch eine Konzentration von 0,3 γ Oestradiol zu bestimmen erlauben. Die Konzentration der Oestrogene in dieser Fraktion muss demnach geringer sein.

Anreicherung der Androgene.

Zur Anreicherung der Androgene wurden die wirksamen Ketone I über Aluminiumoxyd chromatographiert und die erhaltenen Fraktionen, mit Ausnahme der Petroläthereluatate, durch Digitoninfällung getrennt. Die mit Digitonin nichtfällbaren Anteile wurden nochmals über Aluminiumoxyd chromatographiert. Die Äthereluatate aus diesem letzteren Chromatogramm, welche gewichtsmässig ungefähr $\frac{1}{100}$ der Gesamtmenge der Ketone ausmachten waren wie erwartet stark androgen wirksam. In dieser Fraktion sollten nämlich die am stärksten wirksamen, bisher bekannten natürlichen androgenen Verbindungen, wie Testosteron und Androsteron enthalten sein, da sie mit Digitonin nicht fällbar sind und erfahrungsgemäss als Mono-oxyverbindungen durch Äther aus Aluminiumoxyd der Aktivität III eluiert werden.

Es wurde festgestellt, dass in der erwähnten Fraktion ungefähr die Hälfte der androgenen Wirksamkeit, d. h. etwa 4–5 γ Testosteron/kg H.V.L. enthalten war. Die Wirkung der ganzen Fraktion entsprach demnach 0,7–0,9 mg Testosteron.

Das Präparat war ölig, schwach gelblich und besass ein $[\alpha]_D^{16} = 0^0$ ($\pm 3^0$). Im U.V. zeigte es eine Absorption, welche in der Figur 1 (S. 37) dargestellt ist. Da in der Nähe von 238 $m\mu$ eine starke Absorption vorhanden ist, kann man daraus nicht ersehen, ob eine der biologischen Prüfung entsprechende Menge Testosteron, welche bei dieser Wellenlänge ein charakteristisches Absorptionsmaximum mit $\log \epsilon = 4,2$ besitzt, in dem Präparat enthalten war oder nicht.

Es wurde weiter versucht, durch nochmalige chromatographische Trennung die androgene Verbindung aus dem Hypophysenvorderlappen-Extrakt in krystallisierter Form zu erhalten. Obwohl das wirksame Konzentrat in 10 Fraktionen von 1–10 mg verteilt wurde, konnte keine dieser Fraktionen zur Krystallisation gebracht werden. Es wurde lediglich festgestellt, dass sich in den ersten Fraktionen des Chromatogramms eine positiv drehende Verbindung anreicherte.

¹⁾ *E. Allen und E. A. Doisy, J. Am. med. Assoc.* **81**, 819 (1923).

T. F. Gallagher und *F. C. Koch*¹⁾ konnten zeigen, dass durch Kochen von Testesextrakten, deren Wirksamkeit hauptsächlich dem Testosteron zuzuschreiben ist, mit 3,3%iger alkoholischer Kalilauge 50% der androgenen Aktivität in einigen Minuten zerstört wird, und dass nach drei Stunden bereits 90% der Wirksamkeit solcher Extrakte verschwindet. Harnkonzentrate dagegen, deren Wirksamkeit grösstenteils durch Androsteron verursacht wird, zeigten nach einer ähnlichen Behandlung keinen oder nur einen geringen Verlust der Aktivität. In ähnlicher Weise wie bei den Versuchen von *Gallagher* und *Koch* wurde ein Teil der wirksamen Fraktion aus dem Hypophysenvorderlappen-Extrakt mit 3,5%iger alkoholischer Kalilauge und ein anderer Teil als Kontrollversuch nur mit Alkohol behandelt.

Die physiologischen Prüfungen ergaben, dass die androgene Wirkung durch Kochen mit Alkali stark vermindert wird, was darauf hinweist, dass die androgen wirksame Verbindung aus Hypophysenvorderlappen wahrscheinlich Testosteron oder ein anderes α , β -unge sättigtes Keton ist.

Versuche zur Anreicherung der Oestrogene.

Aus den mit methanolischer Salzsäure nicht veresterten sauren Anteilen mussten zuerst noch vorhandenen Säuren getrennt werden. Dies gelang durch Chromatographierung an einem basischen, wenig aktiven Aluminiumoxyd. Durch Elution mit Äther und Äther-Methanol wurden zwei weniger saure Fraktionen getrennt aufgefangen, während die stärker sauren Bestandteile adsorbiert blieben. Die physiologische Prüfung auf oestrogene Wirksamkeit ergab, dass in beiden Fraktionen weniger als 0,3 γ Oestradiol/kg H.V.L. enthalten war.

Die physiologischen Prüfungen wurden im Biologischen Laboratorium der *Gesellschaft für Chemische Industrie* in Basel durchgeführt.

Die Analysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium des Organisch-Chemischen Institutes der E.T.H. unter der Leitung von *W. Manser* ausgeführt, dem ich auch hier meinen Dank ausspreche.

III. Experimenteller Teil.

1. Das Ausgangsmaterial.

Das Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit wurde durch Extraktion frischer Rinder-Hypophysenvorderlappen mit Aceton durch die *Wilson Laboratories Inc.*, Chicago, Ill., U.S.A., hergestellt.

¹⁾ *J. Biol. Chem.* **104**, 611 (1934).

Aus 267,85 kg Rinder-Hypophysenvorderlappen wurde auf diese Weise ein Extrakt im Gewichte von 0,82 kg erhalten. Die Gesamtmenge des Extrakts entspricht somit etwa 0,3 % der frischen Organe.

2. Herstellung des Ätherextraktes.

Der Acetonextrakt im Gewichte von 800 g wurde portionenweise in 4 Liter Äther¹⁾ unter Kochen am Rückfluss in Stickstoffatmosphäre gelöst, nach dem Erkalten wurde von ungelösten Anteilen abgenutscht und von mitgerissenen, feinen Partikelchen abzentrifugiert.

Es blieb ein in Äther unlöslicher Rückstand von etwa 70 g zurück, der grösstenteils in Wasser und Methanol löslich war.

Der durch Abdestillieren in einer Stickstoffatmosphäre vom Lösungsmittel befreite Ätherextrakt war ein dunkelbraunes, halbfestes Produkt mit einem nicht unangenehmen, schmalzähnlichen Geruch. Bei 0° bildete der Extrakt eine harte Masse, die bei Zimmertemperatur streichfähig und bei ca. 50° geschmolzen war.

3. Herstellung der cholesterinarmen neutralen Anteile I.

Der Arbeitsgang zur Herstellung der cholesterinarmen, neutralen Anteile I ist in der Übersicht II dargestellt (S. 23).

Zur Entfernung der sauren Bestandteile wurde der Ätherextrakt in einer Atmosphäre von reinem Stickstoff mit verdünnter Lauge gewaschen. Die Waschung erfolgte in einer Apparatur, die aus mehreren übereinander gestellten Waschflaschen bestand, die untereinander mit zu Kapillaren ausgezogenen Glasröhren verbunden waren. Aus einem Laugebehälter wurde die Lauge zu dem, im obersten Waschgefäss in 5 Liter Äther gelösten Extrakt zutropfen gelassen. Von eventuell mitgerissenen laugeunlöslichen Bestandteilen wurde die Waschflüssigkeit durch Nachwaschen mit 8–9 Liter frischem Äther befreit, der in vier grossen hintereinander geschalteten Waschflaschen enthalten war. Im Gegenstrom wurde durch eine alkalische Pyrogallol-Lösung²⁾ gereinigter Stickstoff durchgeleitet, der, um die Apparatur unter einem gewissen Überdruck zu halten, durch einen Quecksilberverschluss abgelassen wurde.

Der Reihe nach wurde mit 0,05–0,1–0,2-n. Kalilauge gewaschen, bis nach einem Verbrauch von insgesamt etwa 2,5 Mol. KOH die Extraktion mit Lauge beendet war.

Die Alkaliauszüge ergaben nach Ansäuern und nachfolgender Extraktion mit Äther nach üblicher Aufarbeitung die sauren Anteile I im Gewichte von 215,1 g.

¹⁾ Für die gesamte weitere Verarbeitung wurde stets frisch destillierter peroxydfreier Äther verwendet. Die Prüfung auf Peroxyde erfolgte nach *A. Rieche*, Z. angew. Chem. **44**, 897 (1931).

²⁾ Waschflüssigkeit: 5 Teile 40% Natronlauge mit 1 Teil 25% Pyrogallol-Lösung.

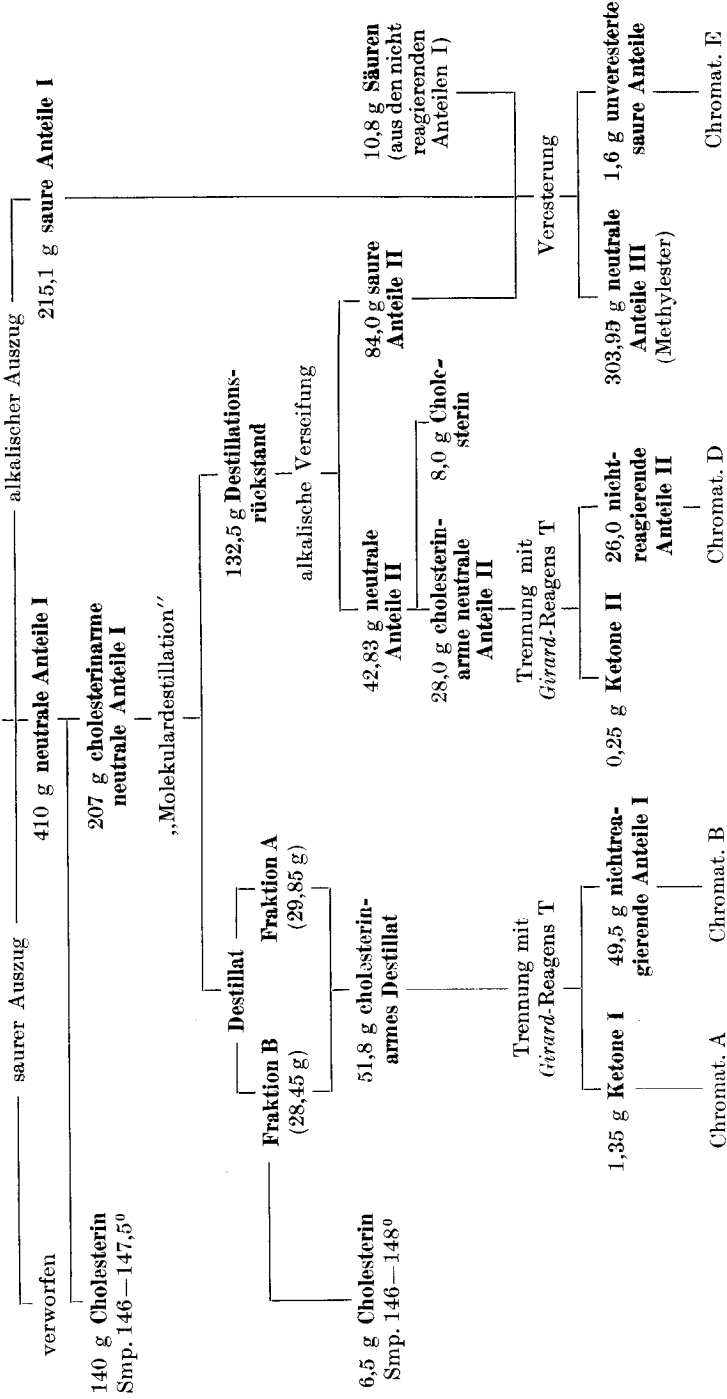
Übersicht II.

Ausgangsmaterial
(267,85 kg H. V. L.)

0,82 kg Acetonextrakt
(aufbewahrt 24,45 g)

0,70 kg Ätherextrakt

70 g ätherunlöslicher
Rückstand



Nach dem Waschen der ätherischen Lösung im Scheidetrichter mit verdünnter Salzsäure und Wasser und dem Abdestillieren des Äthers unter Stickstoff, verblieben nach dem Trocknen im Vakuum 410,0 g neutrale Anteile I. Aus den neutralen Anteilen konnten durch dreimaliges, mehrstündiges Schütteln mit Petroläther (Sdp. 40–60°) und mehrmaliges Umkrystallisieren des dabei erhaltenen unlöslichen Rückstandes aus Aceton 140 g Cholesterin von Smp. 146–147° abgetrennt werden. Die vereinigten Mutterlaugen ergaben nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels die cholesterinarmen neutralen Anteile I im Gewichte von 207 g.

4. Molekulardestillation der neutralen Anteile.

a) Destillation.

Die Molekular- oder Kurzwegdestillation kann auf zwei Arten, nämlich diskontinuierlich oder kontinuierlich ausgeführt werden. Obwohl das letztere Verfahren viele Vorteile besitzt, insbesondere eine zeitlich kürzere Wärmeeinwirkung auf das Destillationsgut, entschloss ich mich wegen der verhältnismässig kleinen Destillationsmengen zu der ersteren Methode.

Als Apparatur stand mir die nach Angaben der *Metro-Vickers Ltd.* von *Schott und Gen.*, Jena, gebaute Glasapparatur zu Verfügung.

Zur Erzeugung des Vor- und eigentlichen Hochvakuums dienten eine *Cenco Hyvac-* und *Cenco Megavac-*Pumpe, sowie eine mit 2-Äthyl-hexyl-sebacinsäureester¹⁾ betriebene *Kodak* Diffusionspumpe.

Die Vakuummessung erfolgte mit dem Quecksilbermanometer nach *Brunner*²⁾. Mit diesem Instrument gemessen, betrug der Druck während der Destillation etwa 10⁻⁴ mm Hg.

Bei der Destillation wurde das Destillat in zwei Fraktionen aufgefangen, eine hellgelbe, flüssige und eine höhere, teilweise krystalline Fraktion.

Das Ausgangsmaterial wog 207 g, hiervon blieben 22,85 g in der Apparatur zurück und wurden der Destillation nicht unterworfen. Die Mengenverhältnisse und die Destillationstemperaturen sind aus der Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1.

Temp. im Destillationsgut	Fraktion	Destillat in g
bis 115°	A.	29,85
115–155°	B.	28,45
	Rückstand	132,20

¹⁾ *K. C. D. Hickman und J. G. Baxter*, *Canad. P.* 371 628 (1937).

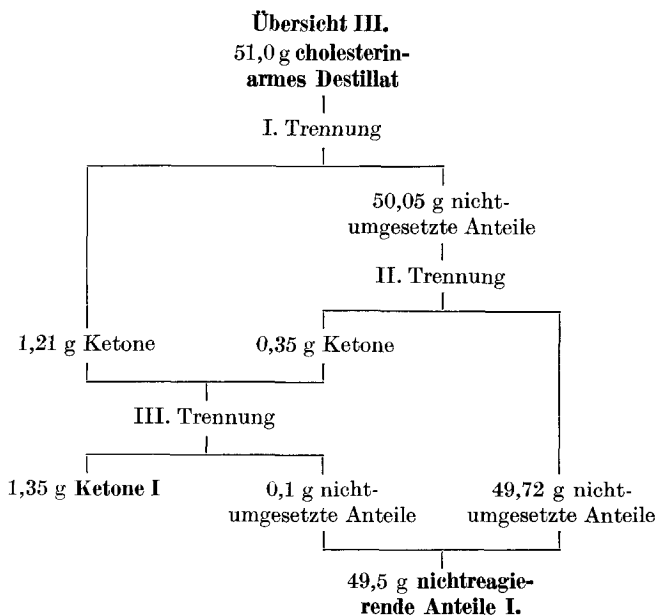
²⁾ *M. Brunner*, *Helv.* 13, 915 (1930).

Aus der bei 115–155° destillierten Fraktion B. wurde durch zweimaliges Schütteln mit Petroläther und zweimalige Krystallisation aus Aceton 6,5 g Cholesterin von Smp. 146–148° abgetrennt.

Die Mutterlauge wurde mit der Destillationsfraktion A. vereinigt (51,8 g) und stellte das cholesterinarme Destillat dar.

b) Aufarbeitung des Destillates.

Die Auftrennung des cholesterinarmen Destillates in Ketone und nicht reagierende Anteile wurde mit *Girard*-Reagens T¹⁾ durchgeführt. Die Trennung wiederholte ich jeweils dreimal, um eine möglichst vollkommene Aufteilung zu erreichen. Sie ist in der Übersicht III schematisch dargestellt.



I. Trennung. 51,0 g des cholesterinarmen Destillates wurden in 500 cm³ absoluten Alkohol gelöst und 1 Stunde mit 57,0 g *Girard*-Reagens T und 31,0 g reinem Eisessig am Rückfluss gekocht. Hierauf wurde das Reaktionsgemisch in einer Eis-Kochsalz-Mischung abgekühlt, und rasch in eine Lösung von 25,0 g calcinierter Soda in 500 cm³ Wasser und 500 cm³ Eis gegossen.

Die nichtreagierenden Anteile wurden durch fünfmaliges Ausschütteln mit insgesamt 5 Liter Äther bei –3° extrahiert und zweimal mit je 200 cm Wasser nachgewaschen. Nach dem Trocknen des Äthers mit Natriumsulfat und Abdestillieren verblieben 50,05 g nicht umgesetzte Anteile.

¹⁾ A. *Girard* und G. *Sandulesco*, Helv. **19**, 1095 (1936).

Die wässrigen Lösungen, welche die Ketone als wasserlösliche Verbindungen enthielten, wurden mit 250 cm³ 4-n. Schwefelsäure versetzt und, mit 3 Liter Äther überschichtet, während 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die dadurch in Freiheit gesetzten Ketone wurden dann mit Äther erschöpfend extrahiert. Sie wogen nach dem Trocknen und Abdampfen des Äthers 1,21 g.

II. Trennung. Die nicht reagierenden Anteile der ersten Trennung wurden nach der gleichen Vorschrift umgesetzt. 1 Teil der betreffenden Fraktion wurde in 10 Teilen absolutem Methanol mit 1,1 Teilen *Girard*-Reagens T und 0,6 Teilen Eisessig 1 Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches auf -5°, Neutralisation mit 0,5 Teilen calcinierter Soda und erschöpfender Extraktion mit Äther wurden die nicht reagierenden Anteile im Gewichte von 49,72 g erhalten.

Die Zersetzung der wässrigen ketonhaltigen Anteile mit 10 Teilen 4-n. Schwefelsäure und deren Extraktion mit Äther nach 12 Stunden lieferte die Ketone (0,35 g).

III. Trennung. Alle Anteile, die mit *Girard*-Reagens T reagiert hatten, gaben nach erneuter Behandlung mit dem Ketonreagens nach dem vorher beschriebenen Verfahren 1,35 g Ketone I.

Die Vereinigung der nicht umgesetzten Anteile (0,1 g) mit den nicht reagierenden Anteilen der II. Trennung ergab die vereinigten nicht reagierenden Anteile I, welche insgesamt 49,5 g wogen.

Chromatogramm A.

Von den erhaltenen Ketonen I (1,35 g) wurden 1,20 g in Petroläther (Sdp. 40–60°) gelöst und an 36 g mit Salzsäure gewaschenem Aluminiumoxyd (Aktivität III–IV) adsorbiert und chromatographiert. Es wurden 35 Fraktionen von je 50 cm³ Eluat aufgefangen, die als A 1–A 35 bezeichnet wurden.

Nr.	Eluierungsmittel	mg	
1–4	Petroläther	131	farblose Öle, Fraktion 3 teilweise kristallin
5–8	Petroläther-Benzol 5:1 .	210	Öl
9–13	Benzol	230	Chromat. A'
14–16	Äther-Benzol 1:1	20	Öl
17–22	Äther	65	Öl, teilweise kristallin
23–27	Äther-Methanol 99:1 .	200	Öl, teilweise kristallin
28–30	Äther-Methanol 9:1 . .	—	
31–35	Methanol	50	Öl

Aus den Fraktionen 17–27 konnten kleine Mengen von Krystallen abgeschieden werden, welche als Cholesterin identifiziert wurden. Smp. 146°, $[\alpha]_D^{25} = -27,4^\circ (\pm 3^\circ)$.

Chromatogramm A'.

Die Fraktionen A 9–13 (230 mg) wurden in Petroläther-Benzol 4:1 gelöst und an 7 g Aluminiumoxyd (Aktivität I–II) chromatographiert. Das Chromatogramm wurde in 21 Fraktionen zu 25 cm³ Eluierungsmittel aufgeteilt; sie erhielten die Bezeichnung A' 1–A' 21.

Nr.	Eluierungsmittel	mg	
1–4	Petroläther-Benzol 4:1 .		Öl
5–6	Benzol	24,8	Krystalle (Δ^4 -Cholesten-on-(3))
7–8	Benzol	35,8	Krystalle (Δ^4 -Cholesten-on-(3))
9–11	Äther		
12–15	Äther-Methanol 99:1 .		
16–18	Äther-Methanol 9:1 .		Öle
19–21	Methanol		

Chromatogramm B.

Die mit *Girard*-Reagens T nicht umgesetzten Anteile I (49,5 g) wurden in 300 cm³ Benzol gelöst und an 1,5 kg leicht alkalisch reagierendem Aluminiumoxyd (Aktivität III) chromatographiert. Das Chromatogramm wurde in 83 Fraktionen von je 500 cm³ aufgeteilt, die mit B 1–B 83 bezeichnet wurden.

Nr.	Eluierungsmittel	mg	
1–2	Benzol	9640	Chromat. B'
4	Benzol	340	
5	Benzol	170	
6–35	Benzol	14750	Cholesterin
36–44	Äther	1190	
45–47	Äther	700	Glycerinmonostearat
48–53	Äther	50	
54–58	Äther-Methanol 99:1 .	100	
59–62	Äther-Methanol 9:1 .	590	
63–65	Äther-Methanol	810	
66–71	Äther-Methanol	180	Glycerinmonopalmitat
72–78	Methanol	900	neutrale Anteile ¹⁾
79–83	Methanol-Eisessig 9:1 .	10810	saure Anteile ¹⁾

¹⁾ Die Fraktionen B72–B83 wurden in Äther aufgenommen, mit Wasser, verdünnter KOH und verdünnter HCl gewaschen. Nach dem Trocknen und Abdestillieren des Äthers verblieben 900 mg neutrale Anteile.

Die alkalischen Auszüge wurden angesäuert und mit Äther extrahiert, nach ähnlicher Aufarbeitung wie vorher beschrieben, verblieben 10,810 g saure Anteile.

Chromatogramm B'.

Die Benzoleluate B1–B3 wurden vereinigt (9,640 g) und an 300 g Aluminiumoxyd (Aktivität I) chromatographiert. Es wurden 70 Fraktionen von 100 cm³ aufgefangen, die mit B'1–B'70 bezeichnet wurden.

Nr.	Eluierungsmittel	mg	
1	Petroläther . . .	870	gesättigte, flüssige Kohlenwasserstoffe
2	Petroläther . . .	4680	halbfeste, schwach ungesättigte Kohlenwasserstoffe
3–40	Petroläther . . .	530	feste, ungesättigte Kohlenwasserstoffe
41–58	Benzol	1070	
59–65	Äther	180	
66–70	Methanol	800	

e) Aufarbeitung des Rückstandes der Molekulardestillation.

Verseifung.

Die Rückstände der Molekulardestillation (132,5 g) wurden mit den Fraktionen B6–B71, mit Ausnahme der daraus in kristallisierten Zustand abgetrennten Verbindungen, vereinigt. Sie wogen 135,0 g.

Zur alkalischen Verseifung wurden die vereinigten Fraktionen in 250⁰ cm³ Methanol gelöst, mit 500 cm³ 2-n.methanolischer Kalilauge versetzt und während 24 Stunden in Stickstoffatmosphäre gekocht. Das Eindampfen des Reaktionsgemisches erfolgte ebenfalls im Stickstoffstrom; nach dem Einengen auf etwa ein Drittel des ursprünglichen Volumens wurde angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt.

Die Entfernung der sauren Anteile erfolgte durch Waschen mit verdünnter Kalilauge in Stickstoffatmosphäre, wie auf S. 22 beschrieben ist. Nach dem Ansäuern der alkalischen Auszüge, nachfolgender Extraktion mit Äther und Abdampfen des Lösungsmittels, wurden nach dem Trocknen des Rückstandes im Vakuum 84,0 g saure Anteile II erhalten.

Die in der Waschapparatur von den Fettsäuren befreite ätherische Lösung wurde im Scheidetrichter mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der ätherischen Lösung mit Natriumsulfat und Abdestillieren des Äthers verblieben 42,83 g neutrale Anteile II.

Aus diesen konnten durch dreimaliges Schütteln mit Petroläther und viermaliger Krystallisation aus Aceton 8 g Cholesterin vom Smp. 147° abgetrennt werden. Aus den Mutterlaugen wurden die cholesterinarmen neutralen Anteile II erhalten, eine bei Zimmertemperatur feste, bei 80° halbflüssige, dunkelgefärbte Masse, welche 28,0 g wog.

Abtrennung der Ketone.

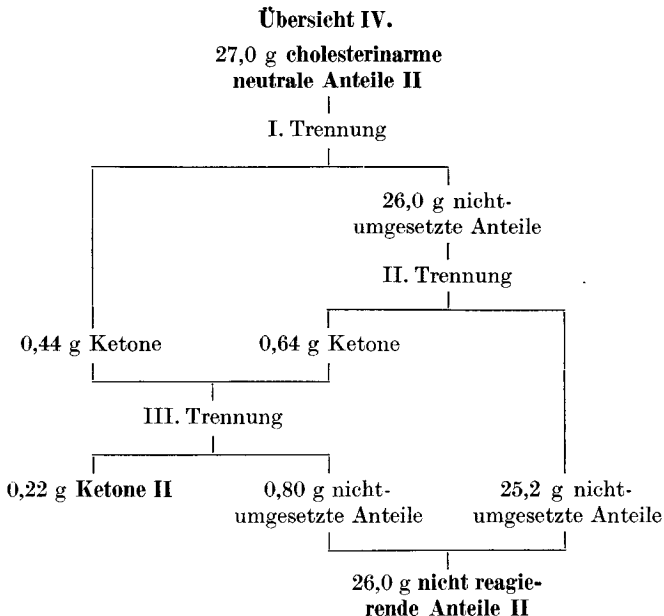
Die Abtrennung der Ketone mit *Girard*-Reagens T aus den cholesterinarmen neutralen Anteilen II wurde analog wie auf S. 25 ausführlich beschrieben worden ist, durchgeführt.

I. Trennung. Durch Umsetzung von 27,0 g neutraler Anteile in 250 cm³ absolutem Methanol mit 27,5 g *Girard*-Reagens T und 15,0 cm³ reinem Eisessig und nachfolgender Neutralisation mit 12,5 g calcinierter Soda wurden 26,0 g nicht reagierende Anteile erhalten.

Nach der Zersetzung der wässrigen Auszüge und deren Aufarbeitung verblieben 0,440 g mit *Girard* T reagierende Anteile.

II. Trennung. Die Umsetzung der nicht umgesetzten Anteile von der ersten Trennung mit 27,5 g *Girard*-Reagens T, 15,0 cm³ reinem Eisessig in 250 cm³ Methanol und nachherige Neutralisation des Reaktionsgemisches mit 12,5 g calcinierter Soda ergaben 25,0 g nicht reagierende Anteile.

Die wässrigen Anteile wurden wie oben zersetzt und wogen nach der Aufarbeitung 0,64 g.



III. Trennung. Bei dieser letzten Trennung ergaben die bei der ersten Trennungen reagierenden, vereinigten Anteile von 1,08 g, nach der Umsetzung mit 1,1 g *Girard*-Reagens T, 0,6 cm³ reinem Eisessig in 10 cm³ Methanol und Neutralisation mit 0,5 g calcinierter Soda 0,80 g nicht umgesetzte Anteile.

Nach der Zersetzung der wässrigen Anteile wurden 0,220 g reagierende Anteile erhalten.

Die mit *Girard*-Reagens T nicht umgesetzten Anteile der II. und III. Trennung wurden vereinigt und wogen 26,0 g. In der Übersicht IV ist der Trennungsvorgang schematisch dargestellt.

Chromatogramm D.

Die nicht umgesetzten Anteile II (26,0 g) von der vorher besprochenen Abtrennung der Ketone wurden an 1 kg alkalisch reagierendem Aluminiumoxyd (Aktivität III) adsorbiert und chromatographiert. Es wurden 50 Fraktionen von je 500 cm³ aufgefangen, die mit D 1 – D 50 bezeichnet wurden.

Nr.	Eluierungsmittel	mg	
1—24	Benzol	7 610	
25	Äther	740	unreines Cholesterin
26—30	Äther	10 430	
31—35	Äther	200	
36—38	Äther-Methanol 99:1 .	120	
39—47	Äther-Methanol 9:1 .	1 200	Verbindung A
48—59	Methanol		
50	Methanol-Eisessig ¹⁾ 9:1.	2 420	Chimylalkohol

5. Aufarbeitung der sauren Anteile.

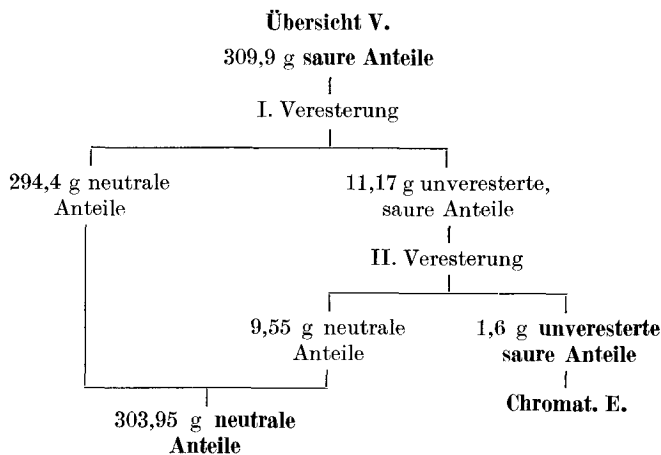
a) Die sauren Anteile I (215,1 g), b) die sauren Anteile, welche bei der Verseifung des Rückstandes von der Molekulardestillation entstanden sind (84 g), c) die sauren Anteile aus den Chromatogramm-Fractionen B 79 – B 83 (10,83 g), wurden vereinigt. Sie bildeten eine bei Zimmertemperatur feste, bei etwa 50° flüssige, dunkelgefärbte Masse, die hauptsächlich aus Fettsäuren bestehen dürfte.

Die zur Trennung der Fettsäuren und anderer eventuell vorhandener Carbonsäuren von den phenolischen Anteilen angewandte Veresterung mit absoluter methanolischer Salzsäure wurde zweimal

¹⁾ Die Fraktionen D 48 – D 50 wurden vereinigt, in Äther aufgenommen und mit verdünnter HCl, verdünnter KOH und Wasser gewaschen. Nach Abdestillieren des Äthers verblieben 2,420 g neutrale Anteile.

durchgeführt. Die unveresterten, stark sauren Anteile wurden an einem basischen, desaktivierten Aluminiumoxyd chromatographiert. Durch Elution mit Äther und Äther-Methanol 1:1 teilte man die phenolischen Anteile in zwei Fraktionen.

Der Arbeitsgang ist in der Übersicht V schematisch dargestellt.



I. Veresterung. Die sauren Anteile im Gewichte von 309,9 g wurden während 24 Stunden mit 1500 cm³ absoluter 0,5%iger methanolischer Salzsäure am Rückfluss gekocht. Nach dem Einengen des Reaktionsgemisches auf etwa ein Drittel des ursprünglichen Volumens, wurde das Ganze in 5 Liter Äther aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die Entfernung der unveresterten sauren Anteile erfolgte durch vorsichtiges Ausschütteln mit 0,05 bis 1-n. KOH.

Nach dem Ansäuern der alkalischen Auszüge wurde mit 1 Liter Äther extrahiert, wodurch 11,17 g der unveresterten sauren Anteile erhalten werden konnten.

Die mit Lauge gewaschene ätherische Lösung der Methylester wurde gründlich mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen und Abdestillieren des Äthers blieben die neutralen Anteile zurück (294,4 g).

II. Veresterung. Die bei der I. Veresterung nicht veresterten 11,17 g sauren Anteile wurden mit 100 cm³ absoluter 0,5%iger methanolischer Salzsäure erneut am Rückfluss gekocht. Nach einem ähnlichen Arbeitsgang wie oben beschrieben, konnten 9,55 g neutrale Anteile erhalten werden. Sie wurden mit den neutralen Anteilen der I. Veresterung vereinigt. Es wurde so 303,95 g eines dunkel gefärbten, teilweise kristallisierenden Öls erhalten.

¹⁾ Nach Aufnahmen des Methanol-Eisessig-9:1-Eluates in Äther, Waschen, Trocknen und Abdestillieren des Äthers.

Die auch bei der zweiten Veresterung unveresterten sauren Anteile („Phenole“), die eine dunkle, harzige Masse mit kresolähnlichem Geruch bildeten, wogen 1,60 g. Sie wurden in 80 cm³ Äther gelöst und an 160 g alkalisch reagierendem Aluminiumoxyd (Aktivität IV–V) adsorbiert und in drei Fraktionen getrennt aufgefangen.

Chromatogramm E.

Nr.	Eluierungsmittel	cm ³	Eluat in g
1	Äther	600	0,1278
2	Äther-Methanol 1:1 . .	600	0,3131
3	Methanol-Eisessig 9:1 .	500	0,60 ¹⁾

In der Adsorptionssäule blieben 0,66 g stark saure Anteile zurück.

6. Isolierung einzelner Verbindungen.

Δ^4 -Cholesten-on-(3).

Aus den Fraktionen A'7–A'8 (35,8 mg), schieden sich nach Versetzen mit Methanol Krystalle von Smp. 77–79° ab. Zur weiteren Reinigung wurde fünfmal aus Aceton-Wasser bis zum konstanten Schmelzpunkt umkrystallisiert, wodurch 7,0 mg feine Nadeln von Smp. 80–81° erhalten werden konnten, welche mit einem synthetisch hergestellten Δ^4 -Cholesten-on-(3)¹⁾ keine Schmelzpunktserniedrigung gaben.

Die Verbindung zeigte im U.V. ein Absorptionsmaximum bei 244 m μ , $\log \epsilon = 4,25$ (in Alkohol) und eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{25} = +81,3^\circ (\pm 3^\circ)^2$ ($c = 1,4$, $\alpha_D^{25} = +1,14$, in Chloroform $l = 1$ dm)

Zur Analyse wurde 36 Stunden im Hochvakuum bei 50° getrocknet.

3,696 mg Subst. gaben 11,341 mg CO₂ und 3,792 mg H₂O

C ₂₇ H ₄₄ O	Ber. C 84,29	H 11,54%
	Gef. „ 83,75	„ 11,48%

o-Tolylsemicarbazon. Die Fraktion A'6 (24,8 mg) wurde zweimal aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Das Produkt, 14,2 mg Krystalle von Smp. 80°, wurde in 1,4 cm³ Feinsprit gelöst und mit einer Lösung von 18 mg *o*-Tolylsemicarbazid in 1,8 cm³ Feinsprit versetzt. Nach Zugabe von zwei Tropfen Eisessig schieden sich aus dem Reaktionsgemisch nach 24-stündigem Stehen leicht gelb gefärbte Nadeln ab. Nach viermaligem Umkrystallisieren aus Butylalkohol

¹⁾ L. Ruzicka, H. Brünger, H. Eichenberger und J. Meyer, Helv. **17**, 1412 (1934).

²⁾ Vgl. A. Butenandt und A. Wolff, B. **68**, 2094 (1935), geben für Δ^4 -Cholestenon-(3) an: Smp. 79–80°, $[\alpha]_D = +88,6^\circ$.

stieg der Schmelzpunkt auf 230°, und blieb auch nach weiterem Umkrystallisieren aus einem Gemisch von Äthyl- und Butylalkohol konstant bei 230–231° (korr.)¹⁾.

Zur Analyse wurde 90 Stunden im Hochvakuum bei 90–95° getrocknet.

0,960 mg Subst. gaben 2,772 mg CO₂ und 0,853 mg H₂O
 $C_{33}H_{53}ON_3$ Ber. C 79,04 H 10,05%
 Gef. „ 78,80 „ 9,94%

Glycerin-monostearat.

Die krystallinen Fraktionen B 45–B 47 schmolzen bei etwa 70°. Nach fünfmaligem Umlösen aus wässrigem Methanol zeigten sie einen konstanten Smp. 76–77° (korr.).

Zur Analyse wurde 110 Stunden im Hochvakuum bei 40–45° getrocknet.

3,672 mg Subst. gaben 9,411 mg CO₂ und 3,884 mg H₂O
 $C_{21}H_{42}O_4$ Ber. C 70,40 H 11,81%
 Gef. „ 69,94 „ 11,84%

Glycerin-monopalmitat.

Die krystallinen Fraktionen B 63–B 65 zeigten Schmelzpunkte von 66–68°, 68–70° und 68–70°. Sie wurden vereinigt (810 mg) und fünfmal aus Methanol bis zum konstanten Smp. von 71–71,5° umkrystallisiert. Zur Analyse wurde 90 Stunden im Hochvakuum bei 40–50° getrocknet.

3,802 mg Subst. gaben 9,617 mg CO₂ und 4,003 mg H₂O
 $C_{19}H_{38}O_4$ Ber. C 69,05 H 11,59%
 Gef. „ 69,03 „ 11,78%

Chimylalkohol.

Die mit Methanol und Methanol-Eisessig eluierten und mit Salzsäure und Natronlauge gewaschenen Fraktionen 48–50 des Chromatogramms D wogen vereinigt 2,42 g, und bildeten eine feste dunkle Masse. Durch Destillation im Molekularkolben bei etwa 120° und 0,005 mm Druck konnte hieraus ein Destillat erhalten werden, das beim Abspülen mit Äther in gelblichen, mit einem Öl verunreinigten Krystalldrüsen krystallisierte. Diese wurden siebenmal aus Pentan, Hexan und einem Gemisch von Äther und Hexan umkrystallisiert und schmolzen schliesslich konstant bei 63,5–64°²⁾. Mit Chimylalko-

¹⁾ Vgl. O. Rosenheim und T. A. Webster, Biochem. J. **37**, 513 (1943), Cholestenon-o-Tolysemicarbazid Smp. 240–241°.

²⁾ E. Baer und H. O. L. Fischer, J. Biol. Chem. **140**, 397 (1941), geben für den synthetischen d- α -Hexadecyl-glyceryl-äther Smp. 62,5–63,5° an.

hol (*d*- α -Hexadecylglyceryläther) aus Stiertestes¹⁾ gab die Verbindung keine Schmelzpunktniedrigung.

$$[\alpha]_D^{16} = +3,7^\circ (\pm 0,5^\circ) \quad (c = 2,00 \text{ in Chloroform})^2)$$

$$30,08 \text{ mg zu } 1,544 \text{ cm}^3, \quad l = 2 \text{ dm}, \quad \alpha_D^{16} = +0,15^\circ.$$

Zur Analyse wurde 90 Stunden im Hochvakuum bei 50° getrocknet.

3,728 mg Subst. gaben 9,850 mg CO₂ und 4,260 mg H₂O

C ₁₉ H ₃₀ O ₃	Ber. C 72,09	H 12,74%
	Gef. „ 72,10	„ 12,79%

Bis-(phenyl-urethan). 35,0 mg Substanz wurden mit 15 Tropfen Phenylisocyanat versetzt und 1 Stunde unter Feuchtigkeitsabschluss auf 80° erwärmt. Das überschüssige Phenylisocyanat wurde im Vakuum abgedampft und das erhaltene Produkt einmal aus Benzin (Sdp. 70–90°) und viermal aus Methanol umkrystallisiert. Die erhaltenen Nadeln schmolzen konstant bei 98–98,5° (korr.)³⁾.

Zur Analyse wurde 90 Stunden im Hochvakuum bei 50° getrocknet.

3,650 mg Subst. gaben 9,547 mg CO₂ und 2,978 mg H₂O

C ₃₃ H ₅₀ O ₃ N ₂	Ber. C 71,44	H 9,09%
	Gef. „ 71,38	„ 9,13%

Verbindung A.

Die Fraktionen D39–D47, die mit einem Gemisch von Äther-Methanol 9:1 eluiert worden waren, bildeten rötliche, zähflüssige Öle. Da Versuche, sie zur Krystallisation zu bringen, ohne Erfolg blieben, wurden sie vereinigt (1,20 g). Durch Destillation im Molekularkolben bis 140° und 0,005 mm konnten hieraus 200 mg eines teilweise krystallisierenden, hellbraunen Öls abgetrennt werden.

Das Destillat wurde einmal aus Hexan (Smp. 88°), nachher dreimal aus Aceton-Hexan und zuletzt noch einmal aus Aceton-Äther umgelöst. Es wurden so 4,1 mg Blättchen von Smp. 97–98° erhalten.

Die Substanz war gegen Tetranitromethan gesättigt und Stickstofffrei.

Zur Analyse wurde 48 Stunden im Hochvakuum bei 50° getrocknet.

3,842 mg Subst. gaben 7,866 mg CO₂ und 3,307 mg H₂O

Gef. C 55,87	H 9,63%
--------------	---------

¹⁾ V. Prelog, L. Ruzicka und F. Steinmann, Helv. **27**, 674 (1943).

²⁾ Das Drehungsvermögen ist stark abhängig von der Konzentration. Vgl. hierüber E. Baer und H. O. L. Fischer, l. c. $[\alpha]_D = +3,0$ ($c = 1,16$ in Chloroform).

³⁾ Vgl. E. Baer und H. O. L. Fischer, J. Biol. Chem. **140**, 397 (1941), Smp. 97,5–98° für das Bis-(phenylurethan) von *d*- α -Hexadecylglyceryläther.

Kohlenwasserstoffe.

Gesättigte Kohlenwasserstoffe.

Das Petroläthereluat B'1 im Gewichte von 870 mg, eine farblose wasserklare Flüssigkeit, wurde im Kragenkolben im Hochvakuum destilliert. Dabei blieb nur eine Spur Rückstand zurück.

Fraktion	Sdp./mm Druck	Destillat
1	140—150°/0,1	flüssig
2	150—170°/0,04	flüssig
3	170—180°/0,02	flüssig

Alle diese Fraktionen waren gegen Tetranitromethan gesättigt. Die Fraktion 2 ergab folgende Analysenwerte:

3,930 mg Subst. gaben 12,301 mg CO₂ und 4,950 mg CO₂
 Gef. C 85,42 H 14,09%

Ungesättigte Kohlenwasserstoffe.

Die Petroläthereluate B'3—B'40 (530 mg) wurden vereinigt und bildeten eine paraffinartig erstarrende Masse. Diese wurde im Hochvakuum im Kugelrohr destilliert.

Fraktion	Sdp./mm Druck	Destillat
1	130—150°/0,05	flüssig
2	150—175°/0,05	paraffinartig erstarrt
3	175—190°/0,05	paraffinartig erstarrt
Rückstand	190°/0,05	paraffinartig erstarrt

Alle Fraktionen waren gegen Tetranitromethan ungesättigt. Die Analyse der Fraktion 2 zeigte, dass es sich um einen unreinen Kohlenwasserstoff handelt.

3,771 mg Subst. gaben 12,058 mg CO₂ und 4,000 mg H₂O
 Gef. C 87,26 H 11,87%

7. Anreicherung der androgenen und oestrogenen Wirkstoffe.

a) Androgene Wirkstoffe.

Sowohl die Ketone I (1,35 g) als auch die nicht-reagierenden Anteile I (siehe S. 26), welche aus dem cholesterinarmen Destillat erhalten worden waren, wurden auf androgene Wirksamkeit nach der Methode von *Fussgänger*¹⁾ geprüft. Während die mit *Girard*-Reagens T nicht-reagierenden Anteile keine Wirkung zeigten, besaßen die Ke-

¹⁾ *R. Fussgänger*, *Medizin und Chemie* **2**, 194 (1934).

tone eine Wirksamkeit, welche derjenigen von etwa 8 γ Testosteron/kg H.V.L. entsprach. Zur Prüfung wurden die Ketone mit Sesamöl so verdünnt, dass in 0,2 cm³ 3 mg Ketone enthalten waren. Das entspricht einer Hypophysenvorderlappenmenge von 534 g. Zwei Kapaune erhielten während 10 Tagen täglich einmal 0,2 cm³ der obigen Lösung aufgespritzt, die Tiere erhielten somit täglich je 3 mg Ketone. Damit wurde ein Wachstum von im Mittel 50 % erhalten.

Es wurden folgende Versuche durchgeführt, um die androgene Verbindung aus dem Hypophysenvorderlappen-Extrakt anzureichern.

Alle nicht untersuchten Fraktionen des Chromatogramms A, mit Ausnahme der ersten fünf Petrolätherfraktionen, sowie die nicht kristallisierten Fraktionen des Chromatogramms A', welche insgesamt 720 mg wogen, wurden in einem mit Digitonin fällbaren und einem mit Digitonin nichtfällbaren Anteil zerlegt.

Die Fällung erfolgte aus einer Lösung in 240 cm³ Äthylalkohol, mit einer Lösung von 2 g Digitonin in einem Gemisch von 240 cm³ Äthylalkohol und 120 cm³ Wasser. Es bildete sich sofort ein weisser Niederschlag, der nach 48-stündigem Stehenlassen abzentrifugiert wurde. Das schwer lösliche Digitonid wurde mit 80 % Äthylalkohol gewaschen, getrocknet, und die Mutterlaugen im Vakuum zur Trockene verdampft. Das schwerlösliche Digitonid wurde auf übliche Weise mit Pyridin zersetzt¹⁾, wobei 170 mg unreines Cholesterin erhalten werden konnten.

Die mit Digitonin nichtfällbaren Anteile wurden in 7 cm³ trockenem, reinem Pyridin gelöst und in 1 Liter wasserfreien Äther gegossen. Nach 24 Stunden wurde abzentrifugiert und mit Äther nachgewaschen. Nach dem Waschen der ätherischen Lösung mit verdünnter Salzsäure, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, Trocknen und Abdestillieren des Lösungsmittels verblieben 480 mg der mit Digitonin nichtfällbaren Ketone I, welche ein rötliches, dickflüssiges Öl bildeten.

Chromatogramm A''.

Diese mit Digitonin nichtfällbaren Ketone wurden in 5 cm³ Benzol gelöst und an 15 g mit Salzsäure vorbehandeltem Aluminiumoxyd (Aktivität II-III) chromatographiert. Es wurden 10 Fraktionen von je 100 cm³ aufgefangen, die mit A''1-A''10 bezeichnet wurden.

Nr.	Eluierungsmittel	mg	
1—3	Benzol	250	gelbliches Öl
4—6	Äther	90,0	hellgelbes, dickflüssiges Öl
7—8	Äther-Methanol 99:1		
9—10	Methanol	90	gelbliches, dickflüssiges Öl

¹⁾ R. Schoenheimer und H. Dam, Z. physiol. Ch. 215, 59 (1933).

Von den mit Äther eluierten Fraktionen A''4–A''6 (90,0 mg) wurden 10,1 mg zur Prüfung auf androgene Wirksamkeit verwendet. Die Prüfung, die in ähnlicher Weise wie oben beschrieben, durchgeführt wurde, ergab, dass diese Fraktion etwa die Hälfte der androgenen wirksamen Verbindungen enthielt, was einer Menge von etwa 4 γ Testosteron/kg H.V.L. entspricht.

Die Absorption im U.V. ist in Figur 1 dargestellt (s. auch S. 20.).

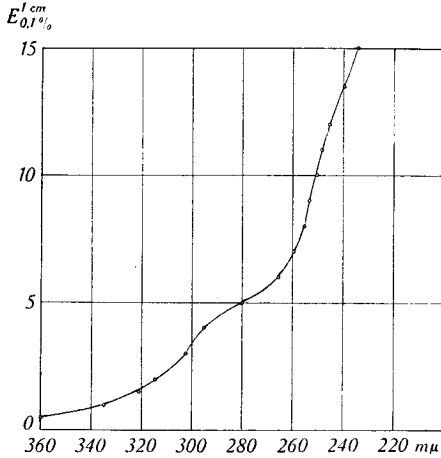


Fig. 1.

Eine weitere Trennung durch chromatographische Analyse an Aluminiumoxyd führte nicht zu kristallinen Produkten.

Chromatogramm A'''.

66 mg Ketone wurden in 3 cm³ Benzol gelöst und an 7 g mit Salzsäure gewaschen, am Aluminiumoxyd (Aktivität II–III) chromatographiert.

Nr.	Eluierungsmittel	cm ³ pro Fraktion	mg	
1–3	Benzol	25	2,6	gelbes Öl
4–16	Äther	2	59,0	gelbes Öl
17–19	Äther-Methanol 9:1 . .	10		

Bestimmung der optischen Drehung.

Die Fraktion A'''6 zeigte ein

$$[\alpha]_D^{16} = +8,2^\circ (\pm 2^\circ) \quad (c = 1,34 \text{ in Chloroform})$$

$$12,1 \text{ mg in } 0,901 \text{ cm}^3, \quad \alpha = +0,11^\circ, \quad l = 1 \text{ dm.}$$

Die Fraktion A'''7 zeigte ein

$$[\alpha]_D^{11} = +12,9^\circ (\pm 2^\circ) \quad (c = +0,898 \text{ in Chloroform})$$

$$8,1 \text{ mg in } 0,901 \text{ cm}^3, \quad \alpha = +0,116^\circ, \quad l = 1 \text{ dm.}$$

Hierauf wurden die Fraktionen A'''4–A'''19 vereinigt, sie zeigten ein

$$[\alpha]_D^{16} = +0^{\circ} (\pm 2^{\circ}) \quad (c = +1,44 \text{ in Chloroform})$$

$$13,0 \text{ mg in } 0,901 \text{ cm}^3, \quad \alpha = +0^{\circ} (\pm 0,03^{\circ}), \quad l = 1 \text{ dm.}$$

Das Verhalten der androgenen Wirkstoffe aus dem Hypophysenvorderlappen-Extrakt beim Kochen mit Alkali¹⁾

15,5 mg der vereinigten Fraktionen A'''4–A'''19 wurden mit 1,5 cm³ 3,5% äthanolischer Kalilauge während 4 Stunden unter Rückfluss im Ölbad gekocht. Nach dem Abdestillieren des Alkohols im Vakuum wurde mit 2-n. Salzsäure angesäuert, in Äther aufgenommen und mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen. Nach dem Abdestillieren des Äthers verblieben 15,1 mg eines dunkelbraunen Öls, das auf androgene Wirksamkeit geprüft wurde. Zur Kontrolle wurden 15,5 mg von A'''4–A'''19 mit 1,5 cm³ Äthylalkohol ebenfalls 4 Stunden gekocht und wie oben aufgearbeitet.

Die Ergebnisse der Prüfung auf Androgene sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

	mg	entspricht kg H.V.L.	mg/ 0,1 cm ³ Sesam- öl	Zahl der ver- wende- ten Ka- paune	Tages- dosis in cm ³ Lösung	Tages- dosis in mg Präpa- rat	Kamm- wachs- tum in %	Testo- steron in γ /kg H.V.L.
Behandlung mit 3,5%iger äthanolischer Kalilauge	15,1	41	0,5	3	0,1	0,5	14	1–2
Kontrollversuch, Behandlung mit Äthylalkohol	15,5	42	0,5	3	0,1	0,5	37	2–3

b) Oestrogene Wirkstoffe.

Die Fraktionen E1 und E2 (siehe S. 32) wurden im *Allen-Doisy-Test*²⁾ auf oestrogene Wirksamkeit geprüft. Die Prüfung ergab, dass 2 mg von beiden Fraktionen weniger als 0,3 γ Oestradiol enthielten.

8. Zusammenfassung.

Durch Extraktion mit Aceton war von den *Wilson Laboratories Inc.*, Chicago, U.S.A., aus 267,85 kg Rinder-Hypophysenvorderlappen ein Extrakt im Gewichte von 0,82 kg hergestellt worden.

¹⁾ Vgl. *T. F. Gallagher und F. C. Koch*, *J. Biol. Chem.* **104**, 611 (1934).

²⁾ *E. Allen und E. A. Doisy*, *J. Am. med. Assoc.* **81**, 819 (1923).

Die ätherische Lösung des Acetonextraktes wurde auf schonende Weise im Stickstoffstrom mit verdünnter Lauge in saure und neutrale Anteile getrennt. Aus den neutralen Anteilen erhielt ich durch Anwendung der Molekulardestillation ein Destillat, welches bei 100 bis 155° und 10⁻⁴ mm übergang. Dieses Destillat wurde mit *Girard*-Reagens T in Ketone und nichtreagierende Anteile zerlegt. Der Rückstand der Molekulardestillation gab nach alkalischer Verseifung und Trennung mit *Girard*-Reagens T ebenfalls zwei Fraktionen. Sowohl die ketonischen Fraktionen, als auch die nicht reagierenden Anteile, wurden chromatographisch weiter getrennt. Die vereinigten sauren Anteile von der ganzen Bearbeitung wurden verestert und die nicht veresterten Anteile durch Chromatographie in „phenolische“ und saure Fraktionen aufgeteilt.

Aus den verschiedenen Fraktionen konnten folgende Verbindungen rein isoliert und identifiziert werden:

Cholesterin
$\Delta^{4,5}$ -Cholesten-on-(3)
Chimylalkohol (<i>d</i> - α -Hexadecyl-glyceryl-äther)
Glycerin-monopalmitat
Glycerin-monostearat

Verschiedene Fraktionen wurden auch auf androgene und oestrogene Wirksamkeit geprüft. Die „phenolischen“ Fraktionen zeigten im *Allen-Doisy*-Test keine oestrogene Wirksamkeit. Dagegen besaßen die aus dem Destillat der Molekulardestillation erhaltenen Ketone im Hahnenkamm-Test nach *Fussgänger*, eine androgene Wirksamkeit, die einer Wirkung von etwa 8 γ Testosteron/kg H.V.L. entsprach; die mit *Girard*-Reagens T nichtreagierenden Anteile zeigten keine Wirksamkeit. Es wurde versucht, das androgene Hormon anzureichern. Obwohl eine gewisse Anreicherung durch Fällung der nicht wirksamen Nebenstoffe mit Digitonin und chromatographische Trennung gelang, konnte bisher kein kristallisiertes Hormon erhalten werden.

Summary.

From 267,85 kg beef-anterior pituitary the *Wilson Laboratories Inc.*, Chicago, U.S.A., produced by extraction with acetone an extract of 0,82 kg.

In an atmosphere of nitrogen the ether-solution of the acetone-extract was carefully separated in acid and neutral components by extraction with dilute alkali. The neutral parts were subjected to molecular-distillation and gave a fraction distilling at 100–155° C./10⁻⁴ mm. This distillate was separated by means of the *Girard*-T

reagent in ketones and non-reacting components. The residue of the molecular-distillation, after alkaline saponification and separation by the *Girard*-method, also gave two fractions. Both, the ketonic and non-reacting fractions, were further separated by chromatographic analysis. The combined acid components of the whole separation were esterified and the non-esterified parts chromatographically separated in „phenolic“ and acid components.

From the various fractions following substances were isolated in a pure state and could be identified:

Cholesterol
$\Delta^4,5$ -Cholestene-one-(3)
Chimyl-alcohol (<i>d</i> - α -Hexadecyl-glycerol-ether)
Glycerol-monopalmitate
Glycerol-monostearate

Several fractions were also tested for androgenic and oestrogenic activity. The „phenolic“ fractions showed no oestrogenic activity in the *Allen-Doisy*-test. The ketones from the distillate of the moleculardistillation however, showed in the *Fussgänger*-test an androgenic activity equivalent to ca. 8 γ testosterone/kg anterior-pituitary; the fractions which did not react with the *Girard-T* reagent showed no androgenic activity. Experiments have been made to concentrate the androgenic hormone. Although a partial concentration of the androgenic principle could be achieved by precipitating the non-active accompanying substances with digitonin and by chromatographic separation, until now no crystalline hormone could be isolated.

Curriculum vitae

Am 22. September 1919 wurde ich in Rijswijk (Holland) geboren. Nach der Beendigung des Mittelschulstudiums am Vrijzinnig Christelijk Lyceum in Den Haag bestand ich dort im Frühjahr 1937 die Maturitätsprüfung. Im Herbst 1937 begann ich das Chemie-studium an der Technischen Hochschule in Delft, das ich 1938 an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich fortsetzte und im Sommer 1942 mit dem Diplom als Ingenieur-Chemiker abschloss. Seither arbeitete ich, mit Ausnahme einer kurzen Unterbrechung, im Organisch-Chemischen Laboratorium der E.T.H. unter der Leitung von Prof. Dr. L. Ruzicka an meiner Doktorarbeit.

Zürich, März 1945.