

*Halysaris polypodioides.*

Diese Braunalge verdanken wir der Freundlichkeit des Herrn *L. Berner* (Marseille). Sie wurde uns in getrocknetem Zustand geliefert. In krystallisierter Form liessen sich daraus  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin isolieren, während eine Reindarstellung von Fucoxanthin nicht glückte. Kürzlich haben *J. M. Heilbron* und *R. F. Phipers*<sup>1)</sup> an der Braunalge *Fucus vesiculosus* ähnliche Beobachtungen gemacht: aus der getrockneten Pflanze erhielten sie  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin, aus der frischen Braunalge Carotin und Fucoxanthin. Ihre Schlussfolgerung, dass Zeaxanthin ein postmortales Produkt des Fucoxanthins ist, halten wir aber für wenig wahrscheinlich. Fucoxanthin scheint beim Trocknen der Braunalgen leicht der Zerstörung anheimzufallen, was wir schon bei früheren Extraktionsversuchen häufig beobachten konnten.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

---

**7. Über Cortin, das Hormon der Nebennieren-rinde<sup>2)</sup>.**

I. Mitteilung

von **T. Reichstein.**

(13. XII. 35.)

Vor ca. 5 Jahren zeigten besonders *Rogoff* und *Stewart*<sup>3)</sup>, *Swingle* und *Pfiffner*<sup>4)</sup> sowie *Hartman* und *Brownell*<sup>5)</sup>, dass die Nebennieren-rinde ein lebenswichtiges Hormon produziert, welches sich aus ihr in Form von Extrakten gewinnen lässt. Die Sekretion dieses Hormons kann als wichtigste Funktion der ganzen Nebenniere überhaupt angesprochen werden; denn Tiere, denen beide Nebennieren operativ entfernt worden sind, können den Ausfall des im Mark produzierten Adrenalins relativ leicht überwinden, nicht aber denjenigen des Rindenhormons. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass solche Tiere beliebig lange und anscheinend völlig normal am Leben erhalten werden können und auch fortpflanzungsfähig sind, wenn sie

---

<sup>1)</sup> Biol. J. **29**, 1369 (1935).

<sup>2)</sup> Die erheblichen Mittel, die diese Untersuchung benötigte, wurden mir von der *Haco-Gesellschaft* Gümligen bei Bern gewährt. Das Roh-Cortin stellte in dankenswerter Weise die *N. V. Organon Oss* (Holland) zur Verfügung. Die biologische Auswertung geschah im Laboratorium der letzteren Firma durch die Herren Dr. *P. de Fremery* und *R. W. Spanhoff*. Es sei allen Beteiligten für diese Hilfe auch hier der beste Dank ausgesprochen.

<sup>3)</sup> J. Am. Med. Ass. **92**, 1569 (1929).

<sup>4)</sup> Science **71**, 321 (1930), vgl. besonders *Medicine* **11**, 371 (1932).

<sup>5)</sup> Science **72**, 76 (1930).

regelmässig Injektionen des gereinigten Hormons erhalten, das frei von Adrenalin ist. Beim Aussetzen der Hormonzufuhr treten dagegen schwere Ausfallserscheinungen ein, mit nachfolgendem Tod, wenn nicht durch erneute Injektion für Zufuhr des lebensnotwendigen Stoffes gesorgt wird.

Auf dieses Verhalten ist auch die biologische Prüfung von Cortin-präparaten begründet, indem die minimale Dosis des Präparates ermittelt wird, die nötig ist, um ein beidseitig epinephrektomiertes Tier „normal“ zu erhalten. Unterschiede in der Test-methode ergeben sich dabei je nachdem was für ein Kriterium angewendet wird, um zu beurteilen, wann der „normale“ Zustand erreicht ist. Von der einfachen Bestimmung der Überlebensdauer ist man meist abgekommen, da sie wenig übereinstimmende Resultate liefert<sup>1)</sup>. Die genauesten Werte scheint der Hunde-Test<sup>2)</sup> zu geben, wenn er sorgfältig genug vorbereitet wird, was nicht ganz leicht zu sein scheint. Als Kriterium gilt der Nichtprotein-stickstoff (= Harnstoff) im Blut, der bei Cortinmangel charakteristisch erhöht wird<sup>3)</sup>. Beim *Everse-de Fremery-Test*<sup>4)</sup>, nach welchem die in dieser Arbeit beschriebenen Präparate ausgewertet wurden, werden Ratten als Versuchstiere benutzt und die Ermüdbarkeit von Muskeln gemessen, die durch Cortinmangel ebenfalls sehr stark erhöht wird. Die Ergebnisse der beiden ganz verschiedenen Testmethoden haben bisher, soweit ein Urteil ohne direkten Vergleich möglich ist, miteinander übereingestimmt. Immerhin ist die genaue Auswertung von Cortin-präparaten auch heute noch als schwierig und nicht ganz zuverlässig anzusehen.

Klinisch wird das Cortin heute hauptsächlich bei der *Addison'schen* Krankheit verwendet, die auf einer Zerstörung der Nebennieren, meist durch Tuberkulose oder auch durch blosse Atrophie, beruht; neuerdings in Kombination mit Kochsalz.

Von den verschiedenen Verfahren, die für die Gewinnung von Cortinpräparaten beschrieben sind<sup>5)</sup>, dürfte das nach *Swingle* und

<sup>1)</sup> Ein bemerkenswerter Vorschlag ist von *Brownell* und *Hartman*, *Am. J. Physiol.* **95**, 670 (1930) gemacht worden. Danach sollen junge epinephrektomierte Ratten verwendet werden, wobei als Kontrolle der Wirkung die Wachstumskurve gilt. Also ein ähnliches Verfahren, wie es bei vielen Vitaminbestimmungen angewandt wird. Wieweit es sich bewährt hat, ist mir unbekannt.

<sup>2)</sup> *Harrop*, *Pfiffner*, *Weinstein*, *Swingle*, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* **29**, 449 (1932); **31**, 839 (1934); *Pfiffner*, *Swingle*, *Vars. J. Biol. Chem.* **104**, 701 (1934).

<sup>3)</sup> Nach *Van Slyke* bestimmt.

<sup>4)</sup> *Acta Brev. Neerl.* **2**, 152 (1932).

<sup>5)</sup> Ausser den erwähnten vgl. z. B. *Köhler*, *Eichelberger*, *Am. J. Physiol.* **90**, 417 (1929); *Hartmann* und Mitarbeiter, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* **28**, 962 (1931); **29**, 48, 141 (1931); *Am. J. Physiol.* **98**, 674 (1931); **95**, 670 (1930); **86**, 353 (1928). *Grollman* und *Firor*, *J. Biol. Chem.* **100**, 429 (1933); *Am. J. Physiol.* **101**, 46 (1932), wo auch ein krystallines Präparat beschrieben ist; **105**, 41 (1933). *Kendall*, *Mc. Kenzie*, *Proc. Staff Meet. Mayo Clinic*, 8. Febr. 1933, u. andere.

*Pfiffner*<sup>1)</sup> am vorteilhaftesten sein und wahrscheinlich auch technisch vorzugsweise benützt werden, da es ganze Nebennieren verwendet, also die mühsame und verlustreiche Abtrennung des Cortex vermeidet<sup>2)</sup>. Durch Behandlung der gereinigten alkoholischen Hormonlösung mit Permutit wird nach diesem Verfahren das Adrenalin am Schluss entfernt, ohne dass Verluste an Rindenhormon eintreten. Die aktive Substanz aus 1 kg Rinder-Nebenniere kann bei guten Präparaten so auf ca. 60 mg Trockenrückstand gebracht werden, die ca. 1000—2000 Hunde-Einheiten enthalten<sup>3)</sup>.

Für die weitere Anreicherung solcher „Rohextrakte“ sind inzwischen auch geeignete Methoden publiziert worden, die sich zunächst vor allem auf Ausschüttelungsoperationen gründen, wegen der Empfindlichkeit des Hormons gegen Hitze sowie gegen Alkalien. In der Literatur besteht ziemliche Einigkeit darüber, dass sich Cortin in Wasser relativ gut löst, dass es daraus jedoch je nach dem Reinheitsgrad mehr oder weniger schwer mit organischen Lösungsmitteln wie Äther oder Benzol extrahierbar ist. *Hartman, Brownel* und *Crosby*<sup>4)</sup> geben ferner an, dass es gegen 0,1-n. Salzsäure beständig ist, dagegen von 0,1-n. Natronlauge rasch zerstört wird, während wässriges Ammoniak relativ gut vertragen wird. Nach *Kendall, Mason, Mc. Kenzie, Myers* und *Koelsche*<sup>5)</sup> lässt es sich sowohl aus salzsaurer, wie aus stark ammoniakalischer wässriger Lösung mit Äther extrahieren, ist somit ein Neutralkörper. Eine sehr sorgfältige Arbeit über die Anreicherung von Cortin ist schliesslich von *Pfiffner* und *Vars*<sup>6)</sup> publiziert worden, wo die Reinigung genau beschrieben und auch der Verteilungskoeffizient zwischen Äther (oder Benzol) und Wasser zu 1:3 bis 1:4 bestimmt wird. Die reinsten (amorphen) Präparate zeigten eine Wirksamkeit von 200—400 Hunde-Einheiten pro mg. Inzwischen wurde von *Kendall* und Mitarbeitern<sup>7)</sup> angegeben, dass es ihnen gelungen sei, das Cortin in krystallisierter Form vom Smp. 210° zu isolieren. Die Krystalle sollen die Zusammensetzung  $C_{20}H_{30}O_5$  aufweisen und eine Wirksamkeit von allerdings nur 10—100 Hunde-Einheiten pro mg be-

<sup>1)</sup> Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **28**, 510 (1931); Am. J. Physiol. **98**, 144 (1931); Medicine **11**, 371 (1932); Proc. exptl. Biol. Med. **29**, 998, 1267 (1932).

<sup>2)</sup> Ob die nach *Schmitz* und *Kühnau*, Bioch. Z. 259, 301 (1933) bereiteten Körper irgend etwas mit dem hier erwähnten Hormon zu tun haben, erscheint mehr als fraglich.

<sup>3)</sup> Eine Hunde-Einheit ist definiert als die minimale tägliche Dosis Cortin pro kg Hund, die nötig ist, um einen beidseitig epinephrektomierten Hund für die Dauer von 7—10 Tagen normal zu erhalten. Als Kriterium gilt Beibehaltung des Körpergewichts, Ausbleiben von Asthenie, Erbrechen etc., und Nichterhöhung des Nichtproteinstickstoff-(~Harnstoff-)Spiegels im Blut.

<sup>4)</sup> Proc. Soc. exptl. Biol. Med. **28**, 962 (1931).

<sup>5)</sup> Proc. Staff Meet. Mayo Clinic **9**, 245 (1934).

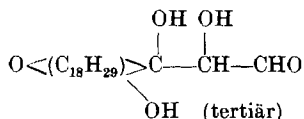
<sup>6)</sup> J. Biol. Chem. **106**, 645 (1934).

<sup>7)</sup> Proc. Staff Meet. Mayo Clinic **9**, 245 (1934).

sitzen<sup>1)</sup>, doch sollen ihnen die vollen Wirkungen des Hormons zukommen. Daneben soll noch eine „andere Form“ (wasserlöslich) existieren, die dieselben Wirkungen hat.

Die Angaben sind bisher von anderer Seite noch nicht bestätigt, hingegen durch einige inzwischen erschienene Notizen von *Kendall*<sup>2)</sup> teilweise eingeschränkt worden. Danach sollen die Krystalle, von denen einige Gramm (!) hergestellt wurden, zwar auf die Überlebensdauer der Tiere, nicht jedoch auf den Blutharnstoff und den Natriumchloridgehalt des Blutes wirksam sein (also beim Test nach *Swingle* und *Pfiffner* unwirksam sein müssen). Zur vollen Wirkung sollen sie der Ergänzung durch reichliche Kochsalzgaben oder durch einen zweiten Hormonfaktor B bedürfen. Hingegen sollen sie bei *Addison*-Patienten gut gewirkt haben.

Wenn es also noch nicht als bewiesen gelten kann, daß *Kendall*'s Krystalle wirklich den physiologisch wichtigsten Bestandteil der Nebennieren-Rinde darstellen, so tut dies der Bedeutung ihrer Untersuchung keinen wesentlichen Abbruch, denn wie später gezeigt werden soll, scheinen die wirksamsten Cortin-Konzentrate aus einem Gemisch nahe verwandter Stoffe, wahrscheinlich desselben Grundskelettes zu bestehen, von denen die Substanz *Kendall*'s der erste Vertreter ist, der krystallisiert erhalten wurde. Nach den erwähnten Notizen<sup>2)</sup>, sowie nach Referaten von Vorträgen<sup>3)</sup> soll die Formel der Krystalle nicht wie oben  $C_{20}H_{30}O_5$ , sondern  $C_{22}H_{34}O_5$  lauten und wie folgt zu einem Trioxy-aldehyd mit einem ätherartigen Sauerstoffatom aufgelöst werden können.



Der Körper ist optisch aktiv, das  $[\alpha]_D$  soll 65—110° betragen. Bei Abwesenheit von Doppelbindungen müsste die obige Formel 3 Kohlenstoffringe enthalten, für die auch das Resultat einer Zinkstaubdestillation spricht.

Weitere sehr wichtige Resultate in dieser Richtung sind inzwischen ferner von *Wintersteiner* und *Pfiffner*<sup>4)</sup> kurz publiziert worden<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> *Kendall* betont allerdings ausdrücklich, dass bei der Schwierigkeit der biologischen Auswertung diese Angabe nur grössenordnungsmässig zu nehmen ist.

<sup>2)</sup> Proc. Staff Meet. Mayo Clinic 10, 245 (1935); J. Biol. Chem. 109, 1 (1935) (Scientific Proc. 29).

<sup>3)</sup> Atlantic City 11. 6. 1935, sowie S. Francisco 19.—23. 8. 1935. Für ein Referat des ersten bin ich Herrn Dr. *P. Laqueur*, für ein solches des zweiten Herrn Prof. *O. Wintersteiner* zu Dank verpflichtet.

<sup>4)</sup> J. Biol. Chem. 109, c (1935) (Scientific Proc. 29).

<sup>5)</sup> Vgl. die soeben erschienenen ausführlichen Publikationen von *Pfiffner*, *Wintersteiner*, *Vars*. J. Biol. Chem. 111, 585 (1935), und *Wintersteiner*, *Pfiffner*. J. Biol. Chem. 111, 599 (1935). Die hier als Nr. 1—5. bezeichneten Substanzen sind dort mit Buchstaben A—E benannt. Nr. 3 = C ist als *l*-Leucyl-*l*-prolin aufgeklärt.

Sie erhielten aus ihren Konzentraten 5 verschiedene kristallisierte Substanzen:

		Wahrscheinliche Formel	
Nr. 1.	Hexagonale Krystalle	Smp. 213,5° (unkorr.)	$C_{20}H_{34}O_5$
Nr. 2.	Nadeln . . . . .	„ 208—211° „	$(C_4H_8O)_x$
Nr. 3.	Platten . . . . .	„ ca. 158° „	Stickstoffhaltig
Nr. 4.	Event. nicht ganz rein . . . . .	„ ca. 127° „	
Nr. 5.	. . . . .	„ 236—239° „ <sup>1)</sup>	

Nr. 3 fällt als stickstoffhaltig aus der Reihe heraus, aber auch die anderen erwiesen sich nach dem *Swingle* und *Pfiffner*-Test als inaktiv. Nach neueren Ergebnissen<sup>2)</sup> soll Nr. 2 einen Smp. 213° (unkorr.), sowie die wahrscheinlichste Formel  $C_{21}H_{34}O_5$  besitzen und vermutlich mit *Kendall's* Krystallen identisch sein. Nr. 1 besitzt keine reduzierenden Eigenschaften, während Nr. 2 und Nr. 5 *Fehling's*che Lösung stark reduzieren. Die physiologische Wirkung verblieb in den amorphen Mutterlaugen.

Die nachfolgend referierten eigenen Arbeiten wurden vor ca. 2 Jahren begonnen. Die dazu benützten Cortinpräparate waren nach dem Permutitverfahren bereitet, ohne dass die letzte Reinigung mit Wasser jedoch sehr weit getrieben worden wäre. Sie enthielten pro 1 kg Ausgangsmaterial (ganze Rinder-Nebennieren) durchschnittlich 400 mg Trockenrückstand (hauptsächlich fettartige Stoffe) mit einer Gesamtaktivität von ca. 20 Ratteneinheiten<sup>3)</sup>, was grössenordnungsmässig 1000 Hundeeinheiten (oder mehr) entsprechen dürfte.

Für die erste Anreicherung dieser „Rohextrakte“ wurde zuerst die Verteilung zwischen Pentan und Wasser oder wässriger Salzsäure benützt. Durch gründliches Waschen geht die gesamte wirksame Substanz in die wässrige Phase und lässt sich daraus nach entsprechend vorsichtigem Einengen durch sehr oftmaliges Ausschütteln mit Äther wieder vollständig extrahieren. Bedeutend rascher gelingt dies mit Essigester. Es wurden so Präparate in einer Ausbeute von ca. 30 mg pro kg Drüse gewonnen, die eine Ratteneinheit in ca. 1,5 mg Trockenrückstand enthielten, was einer ca. 13,3-fachen Anreicherung ohne merklichen Aktivitätsverlust entspricht. Durch

<sup>1)</sup> Nach Privatmitteilung von Dr. *Pfiffner* und Prof. *Wintersteiner*.

<sup>2)</sup> Nach Privatmitteilung von Dr. *Pfiffner* und Prof. *Wintersteiner*.

<sup>3)</sup> Eine Ratteneinheit ist die minimal wirksame tägliche Dosis pro Ratte von ca. 150 g Gewicht, die bei mindestens 3 von 5 Tieren nach Ablauf von 4 Tagen beim *Everse-de Fremery*-Test ein positives Resultat ergibt. (Tiere, die vor Ablauf dieser Zeit sterben, werden nicht mitgezählt.) Eine Ratteneinheit dürfte ungefähr 50—100 Hundeeinheiten entsprechen. Die Ratte braucht demnach pro kg Körpergewicht ca. 500 mal soviel Cortin als ein Hund, wenn man von den sehr verschiedenen Versuchsbedingungen absieht. Vgl. auch *Kroc* und *Martin*, *Am. J. Physiol.* **108**, 438 (1934), nach denen eine Ratte täglich den nach *Swingle* und *Pfiffner* bereiteten Extrakt aus 30—120 g Drüse benötigt, das sind 30—240 Hundeeinheiten, da der Extrakt aus 1 g Drüse bei richtiger Herstellung 1—2 Hundeeinheiten enthält.

anschliessende Extraktion aus soda-alkalischer Lösung konnten hierauf noch geringe Mengen von Säuren abgetrennt werden, wiederum ohne merkliche Aktivitätsverluste; die dadurch erzielte Anreicherung war gewichtsmässig jedoch nur unbedeutend. Diese Präparate wären für eine weitere Untersuchung sehr brauchbar gewesen und standen in Bezug auf Aktivität den nach *Pfiffner* und *Vars*<sup>1)</sup> bereiteten (vgl. weiter unten) nur wenig nach. Leider war die Art der Aufbereitung aber nur bei kleinen Ansätzen durchführbar, besonders wegen äusserst hartnäckiger Emulsionen, die sehr langes Zentrifugieren nötig machten, was bei grossen Chargen Spezialapparaturen erfordert hätte, die nicht zur Verfügung standen.

Da inzwischen die Arbeit von *Pfiffner* und *Vars*<sup>1)</sup> erschienen war, wurde in der Folge dieses Verfahren zur ersten Anreicherung benützt. Es ergab in der Tat Konzentrate (als C. 13 bezeichnet), die noch etwas reicher waren und eine Ratteneinheit in 0,8—1,05 mg enthielten. Leider betrug die Ausbeute aber nur ca. 7 mg pro kg Drüse, was einem Verlust von über 50% an wirksamer Substanz entspricht. Dieser Verlust ist wahrscheinlich durch den relativ hohen Lipoidgehalt unserer Rohextrakte bedingt, die ein ausgezeichnetes Lösungsvermögen für das Hormon zu haben scheinen, sodass es nur sehr langsam an Wasser abgegeben wird. Aber auch *Pfiffner* und *Vars* berichten, dass ihr Verfahren bei grossen Ansätzen relativ viel Verluste verursachen kann. Später zeigte es sich, dass eine sehr wirksame Trennung, mit fast quantitativer Hormon- ausbeute (innerhalb der Fehlergrenze der biologischen Auswertung) erreicht werden kann, wenn die Rohextrakte nach einer geeigneten Vorreinigung der Verteilung zwischen Pentan und ca. 20-proz. wässrigem Methylalkohol unterworfen werden. Die gesamte Aktivität mit wenig Ballast geht in die wässrige Phase und kann jetzt nach Entfernung des Methanols im Vakuum „normal“ nach *Pfiffner* und *Vars* weiterbehandelt werden.

Für die endgültige Aufarbeitung grösserer Quantitäten wurde dann so verfahren, dass diese zunächst der Trennung nach *Pfiffner* und *Vars* unterzogen wurden, wobei das Konzentrat C.13 resultierte. Die dabei abfallenden Lipoidlösungen ergaben dann bei der Weiterbehandlung mit Pentan und wässrigem Methanol den Rest des Hormons nach entsprechender Reinigung als Konzentrat C. 13a. C. 13 und C. 13a besaßen zwar ungefähr dieselbe Aktivität pro mg gerechnet; doch enthielten sie etwas verschiedenartige Begleitstoffe, was für die Isolierung von Einzelindividuen wichtig war. Hauptsächlich aus diesem Grunde wurde diese etwas komplizierte doppelte Aufarbeitung beibehalten.

---

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **106**, 645 (1934).

Diese Konzentrate waren nun soweit vorgereinigt, dass weitere Trennungen durch einfache Ausschüttelung wenig aussichtsreich schienen, es wurden daher chemische Trennungen versucht. Zunächst wurde Bisulfit probiert in Anlehnung an die Beschreibung von *Kendall*<sup>1)</sup>. Behandelt man die Konzentrate C. 13 mit Natriumbisulfitlösung, so scheiden sich in der Tat allmählich Krystalle ab, die nach gehöriger Reinigung sogar ungefähr den von *Kendall* angegebenen Schmelzpunkt zeigten. Die Menge, die auf diesem Wege erhalten wurde, war jedoch so gering, dass von dieser Bereitungsart abgesehen wurde, insbesondere da sich eine viel bessere Trennungsmethode ergab, wie anschliessend erwähnt wird, bei der diese Krystalle sehr bequem erhalten wurden. Natriumbisulfit schien auch aus einem anderen Grunde für eine glatte Trennung wenig aussichtsreich. Durch gründliches Ausschütteln der Bisulfitlösung mit Äther lässt sich nämlich nicht nur die gesamte Aktivität, sondern überhaupt praktisch die ganze Gewichtsmenge des angewandten Konzentrates extrahieren. Daraus lässt sich folgern, dass, wenn darin überhaupt Stoffe vorhanden sind, die mit Bisulfit Anlagerungsverbindungen geben, diese äusserst instabil sein müssen.

Eine recht gute Trennung liess sich jedoch durch Behandlung der Konzentrate mit eigentlichen Ketonreagentien erzielen<sup>2)</sup>. Mit Semicarbazid wird ein zunächst amorphes Semicarbazongemisch als gelbliches Pulver erhalten, das in Wasser recht schwer, in Äther fast unlöslich ist und sich durch Waschen daher von Begleitstoffen einigermaßen befreien lässt. Durch Umkrystallisieren aus Alkohol konnte ein Teil davon sogar in Krystallen anscheinend rein gewonnen werden. (Vgl. weiter unten als Substanz F., es liegt anscheinend ein Disemicarbazon der Formel  $C_{23}H_{36}O_5N_6 \pm H_2$  vor, dem als Grundkörper ein Diketon der Formel  $C_{21}H_{30}O_5 \pm H_2$  entspricht.) Weiterhin wurde eine Probe des rohen, aber gut gewaschenen Semicarbazongemisches durch vorsichtige Behandlung mit Salzsäure bei Zimmertemperatur gespalten. Das so erhaltene amorphe Präparat erwies sich als physiologisch stark aktiv, 1,25 mg enthielten ungefähr eine Ratteneinheit, während die bei der Semicarbazonherstellung anfallenden ketonfreien Anteile in der Dosierung von 1,4 mg pro Tag und Ratte ganz unwirksam waren. Es wurde daher

<sup>1)</sup> Proc. Staff Meet. Mayo Clinic 2, 245 (1934).

<sup>2)</sup> Zum Patent angemeldet April 1935. Dass Cortinpräparate mit Phenylhydrazinderivaten Fällungen (Osazone) geben können, ist schon von *Kendall*, Proc. Staff Meet. Mayo Clinic 2, 245 (1934), angegeben worden. Ob dies mit der Aktivität viel zu tun hat, ist nicht genau ersichtlich, da die von ihm als wirksam angesehenen Krystalle diese Fällungen nicht leicht geben sollen. Inzwischen ist von *Wintersteiner* und *Pfijner*, J. Biol. Chem. 109, c (1935), berichtet worden, dass sich aktive Produkte gewinnen lassen, wenn man die durch Fällung mit Phenylhydrazin in der Kälte erhaltenen Präzipitate mit Benzaldehyd spaltet.

vermutet, dass der wirksame, oder die wirksamen Stoffe, eine Carbonylverbindung oder ein Gemisch solcher darstellen.

Es wurde hierauf nach anderen Ketonreagentien gesucht, die noch eine glattere Trennung bewerkstelligen lassen, als es mit Semicarbazid möglich ist. Hierzu sind besonders solche geeignet, die ausser der zur Reaktion mit der Carbonylgruppe befähigten Gruppe noch eine salzbildende Gruppe enthalten, wie z. B. die Phenylhydrazinsulfosäure. Als besonders bequem erwies sich das neuartige Reagens von *Girard*<sup>1)</sup>. Für genauere Angaben über dasselbe bin ich Herrn Dr. A. *Girard* zu besonderem Dank verpflichtet. Die genaue Anwendung desselben soll jedoch erst in einer späteren Mitteilung beschrieben werden.

Mit solchen Ketonreagentien liess sich eine glatte Trennung in eine „Ketonfraktion“ C. 17 und einen „ketonfreien Anteil“ C. 16 erreichen. Aus 0,7 g Konzentrat C. 13 (mit einer Ratteneinheit in ca. 0,8—1,05 mg), die nach *Pfiffner* und *Vars* aus 100 kg Drüse gewonnen waren, wurden mit dem zuletzt erwähnten Reagens durchschnittlich 0,4 g „Ketonfreies“ (C. 16) und 0,22 g „Ketofraktion“ (C. 17) erhalten. Die letztere zeigte eine sehr hohe Aktivität von ca. 0,33 mg pro Ratteneinheit. Es war also eine über dreifache Anreicherung praktisch ohne Verlust an wirksamer Substanz eingetreten. Dementsprechend erwies sich der ketonfreie Anteil (C. 16) als inaktiv bis zur Dosis von 2 mg pro Tag und Ratte.

In ganz analoger Weise wurde auch die Fraktion C. 13a in die „Ketofraktion“ C. 17a und das „Ketonfreie“ C. 16a getrennt. Die bis hier geschilderte Trennung konnte auch an grossen Chargen bequem durchgeführt werden. Der Versuch mit Rohextrakt aus 1000 kg Drüse (mit insgesamt ca. 20000 Ratteneinheiten) gab:

9,92 g C. 13 daraus 3,5 g C. 17 mit ca. 10500 Ratteneinheiten<sup>2)</sup>  
 3,6 g C. 13a „ 1,8 g C. 17a „ „ 5400 „ „

Total an aktivem Konzentrat (Ketofractionen) 5,3 g mit ca. 15900 Ratteneinheiten.

Daneben wurden 5,15 g C. 16 und 1,46 g C. 16a gewonnen.

Sowohl C. 16 wie C. 17 erwiesen sich als optisch aktiv und zwar zeigte C. 16 ein  $[\alpha]_D^{12} = \text{ca. } -6^\circ$  ( $c = 4$  in Aceton), während C. 17 stark positiv drehte mit einem  $[\alpha]_D^{10} = \text{ca. } +120^\circ$  ( $c = 2$  in Aceton). Beide Teile reduzierten Silber-diammin-hydroxydlösung in der Kälte stark. Bei C. 16 rührt dies jedoch mit Sicherheit zum grossen Teil von einem phenolischen Körper (Brenzcatechinderivat) her,

<sup>1)</sup> Franz. Patent 767464; C. 1935, I. 959.

<sup>2)</sup> Die relativ gute Ausbeute an C. 13 kommt daher, dass hier bei der ersten Wasser-trennung 20 Mal sehr energisch mit Wasser ausgeschüttelt wurde statt nur 8 Mal, wie *Pfiffner* und *Vars* angeben. Trotzdem bleibt ein erheblicher Teil Aktivität zurück und wird erst anschliessend als C. 13a gewonnen. (Der schliesslich ermittelte Verlust von ca. 4100 fällt in die Fehlergrenze der Bestimmungsmethode. Aus diesem Grunde kann mit einem eventuell noch grösseren Verlust gerechnet werden.)



denn dieser Teil gab mit Eisen(III)chlorid eine deutlich grüne Reaktion, die auf Alkalizusatz in rot umschlug. Nach Extraktion aus verdünnter Natronlauge mit Äther war das Reduktionsvermögen dieser Fraktion auch weitgehend vermindert. C. 17 gab dagegen keine merkbare Eisen(III)chlorid-Reaktion, sodass es wahrscheinlich ist, dass das Reduktionsvermögen dieser Fraktion auf die Anwesenheit von o-Oxy-ketonen etc.<sup>1)</sup> zurückzuführen ist. Eine Behandlung mit Alkali musste hier natürlich, wegen der Alkaliempfindlichkeit der aktiven Komponente, unterbleiben. Diese physiologisch wichtigste Fraktion war ferner frei von Stickstoff, Schwefel, Phosphor und Halogen, sie enthielt 68,84% Kohlenstoff und 8,35% Wasserstoff, was einer „Durchschnittszusammensetzung“ der Hauptbestandteile von ungefähr  $C_{21}H_{32}O_5$  entsprechen würde. Die Fraktion zeigt ferner eine starke Bande im Ultraviolett-Absorptionsspektrum bei ca. 240 m $\mu$ , was auf den Gehalt an  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigtem Keton hindeutet. Sie stellt aber ein noch recht komplexes Gemisch dar. Besonders deutlich wird dies durch das Resultat der Oxydation mit Silberoxyd in leicht alkalischer Lösung gezeigt, wobei, wie weiter unten noch erwähnt wird, ca.  $\frac{2}{3}$  des Gewichtes in Säuren übergeführt wird, während ca.  $\frac{1}{3}$  zur Hauptsache unangegriffen bleibt.

Aus den vier oben genannten Fraktionen, von denen bisher besonders die zwei inaktiven C. 16 und C. 16a bearbeitet wurden, konnten weiter teils durch direkte Krystallisation, teils durch chemische Eingriffe die folgenden 7 Substanzen in reiner Form (soweit ersichtlich) isoliert werden. Sie sind alle (bis auf die letzte, die noch nicht geprüft werden konnte) im *Everse-de Fremery*-Test unwirksam<sup>2)</sup>, doch dürfte ihre Untersuchung wertvolle Hinweise auf den Bau des Hormons selbst liefern, da bei der offenkundig ähnlichen Zusammensetzung der Hauptbestandteile eine enge chemische Verwandtschaft vermutet werden kann, wie dies ja in anderen Fällen gefunden wurde. Die 7 krystallisierten Körper sollen vorläufig nur mit den Buchstaben A—G bezeichnet werden.

*Substanz A.* Wurde durch direkte Krystallisation von C. 16 gewonnen, weitere Mengen nach alkalischer Verseifung der Mutterlauge (neben Subst. B). Krystallisiert in sechseckigen Blättchen (aus Alkohol), die bei ca. 160° opak werden und bei 221—222° korr. unzersetzt schmelzen. Die Temperatur um 160° entspricht einem

<sup>1)</sup> Auch o-Diketone wären prinzipiell möglich. Aldehyde sind weniger wahrscheinlich, da diese aus der *Girard*'schen Zwischenverbindung meist viel schwerer abgespalten werden als dies bei C 17 der Fall war und daher bei der Trennung verloren gehen würden. Immerhin sind speziell gebaute Aldehyde nicht ausgeschlossen.

<sup>2)</sup> Einige konnten allerdings nur als Mischung geprüft werden, da die reinen Komponenten zu schwer löslich waren. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass der eine oder andere Körper sich in höheren Konzentrationen doch noch als aktiv erweisen wird. Die Hauptaktivität ist jedoch sicher in den öligen, resp. amorphen Anteilen enthalten.

Umwandlungspunkt. Unreinere Präparate schmelzen oft schon gegen 140° unscharf, beginnen bei ca. 160—170° unter Bildung schöner Nadeln wieder festzuwerden und schmelzen dann wieder gegen 220°. Die bis ca. 100° im Vakuum getrocknete Substanz ist sehr hygroskopisch, die kurz über 160° getrocknete nicht mehr. Der Körper ist optisch aktiv, zeigt ein  $[\alpha]_D^{19} = +16^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,808$  in absolutem Alkohol) und besitzt die Formel  $C_{21}H_{36}O_5 \pm H_2$ . Er reduziert alkalische Silberlösung nicht in der Kälte, ist recht stabil gegen Erhitzen und lässt sich im Hochvakuum bei 0,1 mm und ca. 290° Aussentemperatur unzersetzt destillieren (nur in kleinen Mengen versucht). Er reagiert nicht mit Semicarbazid und lässt sich mit Nickel und Wasserstoff auch unter energischen Bedingungen (135° und 140 Atm. Druck) nicht hydrieren. Von den Sauerstoffatomen dürften mindestens vier, vielleicht auch alle fünf als Hydroxylgruppen vorliegen, da die *Zerewitinoff*-Bestimmung 4,66 aktive Wasserstoffe anzeigte. Aus dem Ansatz konnte die angewandte Substanz unverändert regeneriert werden. Sollten nur vier Hydroxyle vorliegen, so müsste das fünfte Sauerstoffatom danach als Äthersauerstoff enthalten sein. Mit Essigsäure-anhydrid-Pyridin in der Hitze wird eine krystallisierte Tetra- oder Penta-acetylverbindung vom Smp. 150—151° korr. erhalten. Die Substanz A zeigt ferner keine selektive Absorption im Ultraviolett bis 200 m $\mu$ . Sie ist gegen kochende alkoholische Lauge beständig, weniger gegen Säuren in der Hitze. Von den Hydroxylen sind mindestens 2, wahrscheinlich 3 direkt benachbart und eines davon primär, denn bei der Behandlung mit Bleitetracetat in Eisessig nach *Crieger*<sup>1)</sup> bei 50° werden ca. 2,5 Atome Sauerstoff aufgenommen unter Bildung von Formaldehyd (Dimedonverbindung, Smp. 191° korr., Mischprobe). Glycerin verbraucht unter denselben Bedingungen ca. 3 Atome Sauerstoff. Dementsprechend bildet die Substanz auch eine krystallisierte Mono-acetonverbindung vom Smp. 209—210° korr. Die Substanz A ist von allen zu erwähnenden bisher am leichtesten zugänglich. Aus 4 g C. 16 wurden ca. 0,5 g Rohprodukt, davon ca. die Hälfte in reiner Form erhalten.

*Substanz B.* In geringer Menge aus den Mutterlaugen von A nach alkalischer Verseifung, also eventuell nicht genuin, sondern sekundär durch Verseifung entstanden. Nadeln (aus absolutem Alkohol) vom Smp. 253—255° (unkorr. im zugeschmolzenen Röhrchen) die im Hochvakuum unter 0,05 mm schon bei 160—200° Blocktemperatur sublimieren. Die Formel ist noch unsicher.

*Substanz C.* Ein Keton vom Smp. 253—256° korr. (Zers.) aus Fraktion C. 16a. Feine Nadeln aus absolutem Alkohol, darin weniger als 1% löslich.  $[\alpha]_D^{20} = +69,8^\circ \pm 2,5^\circ$  ( $c = 0,387$  in absolutem

<sup>1)</sup> A. 495, 211 (1932).

Alkohol). Die Substanz reduziert alkalische Silberlösung in der Kälte stark, zeigt keine selektive Absorption im Ultraviolett bis 200  $m\mu$ , besitzt die Formel  $C_{21}H_{34}O_5 \pm H_2$  und gibt ein Semicarbazon  $C_{22}H_{37}O_5N_3 \pm H_2$  vom Smp. 243—245° korr. (Zers.).

*Substanz D.* Ein Keton vom Smp. ca. 230—238° korr. (Zers.) (je nach Erhitzungsgeschwindigkeit etwas verschieden). Aus Fraktion C. 16a. Glasklare Körner aus absolutem Alkohol oder Aceton, viel leichter löslich als Subst. C.  $[\alpha]_D^{20} = +66^\circ \pm 1,5^\circ$  ( $c = 0,865$  in absolutem Alkohol). Sie reduziert alkalische Silberlösung in der Kälte stark, zeigt keine selektive Absorption im Ultraviolett bis 200  $m\mu$  und besitzt die Formel  $C_{21}H_{34}O_5 \pm H_2$ , ist also wahrscheinlich isomer mit C. Sie gibt ein Monosemicarbazon  $C_{22}H_{37}O_5N_3 \pm H_2$ , das besonders gut krystallisiert und den sehr hohen Schmelzpunkt von 327—329° korr. unter Zersetzung zeigt.

*Substanz E.* Ein weiteres Keton der wahrscheinlichen Formel  $C_{21}H_{34}O_5 \pm H_2$ , das aber zum Unterschied von C und D alkalische Silberlösung in der Kälte kaum reduziert. Gewonnen wurde es aus der aktiven Fraktion C. 17 nach Entfernung reduzierender Körper mit Silberoxyd. Krystalle vom Smp. 126—129° (aus Aceton-Wasser, event. wasserhaltig). Es zeigt ein  $[\alpha]_D^{20} = +87^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 0,701$  in absolutem Alkohol), besitzt keine selektive Absorption im Ultraviolett bis 200  $m\mu$ , und gibt ein Semicarbazon, das aus Alkohol ziemlich langsam krystallisiert, solange man über keine Impfkristalle verfügt. Dieses zeigt einen Smp. 280—285° korr. unter Zersetzung.

*Substanz F.* Voraussichtlich ein Disemicarbazon der Formel  $C_{23}H_{36}O_5N_6 \pm H_2$ , dem also ein Diketon der Formel  $C_{21}H_{30}O_5 \pm H_2$  zugrunde liegen würde. Es wurde, wie oben kurz erwähnt, direkt aus der Fraktion C. 17 mit Semicarbazid isoliert, es zeigt keinen Schmelzpunkt, sondern zersetzt sich allmählich von ca. 250° an unter Braunfärbung. Die Reinheit ist somit unsicher, da sie sich nur durch mikroskopische Krystallbetrachtung kontrollieren liess. Der Körper zeigt eine starke Bande im Ultraviolett-absorptionsspektrum bei ca. 270  $m\mu$ , was der Absorption der Fraktion C. 17, die bei 240  $m\mu$  liegt, entspricht<sup>1)</sup>. Es ist also zu vermuten, dass das erwähnte Diketon eine  $\alpha, \beta$ -ständige Doppelbindung enthält und einen der Körper darstellt, welche die Absorption der Fraktionen C. 17 und C. 17a verursachen<sup>2)</sup>. Ein weiterer in diesem Gebiet absorbierender Körper liegt in Substanz G vor.

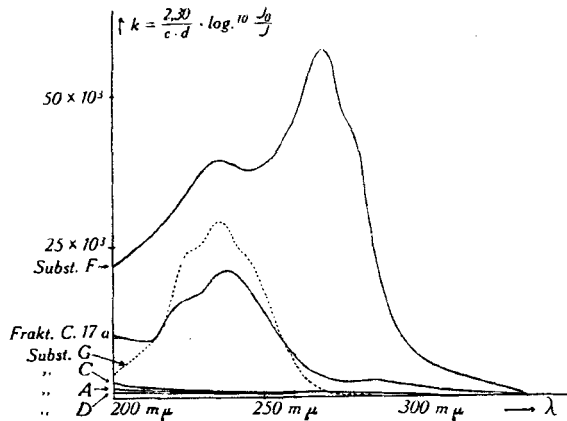
<sup>1)</sup> Beim Cholestenon liegt der Schwerpunkt der Absorptionsbande bei ca. 240  $m\mu$ . beim Semicarbazon dieses Körpers liegt er bei 270  $m\mu$ . Vgl. *Menschik, Page, Bossert. A. 495, 225 (1932)*. Es ist also ungefähr derselbe Unterschied zwischen freiem Keton und Semicarbazon zu konstatieren.

<sup>2)</sup> Nach einer brieflichen Mitteilung von Herrn Prof. O. Wintersteiner ist es ihm gelungen, einen Körper aus aktiven Konzentraten zu isolieren, der möglicherweise das Diketon darstellt, das dem Disemicarbazon zugrunde liegt.

*Substanz G.* Ein Di-keton der wahrscheinlichen Formel  $C_{18}H_{24}O_3 \pm C \pm H_2$ . Es wurde durch fraktionierte Trennung mit *Girard*-Reagens aus C. 17a gewonnen und zwar in geringer Menge, sodass die Formel noch unsicher ist. Auf jeden Fall fällt der Körper stark aus der Reihe der oben erwähnten heraus. Er krystallisiert aus absolutem Alkohol, in dem sich bei  $20^\circ$  knapp 1% lösen, in länglichen Blättchen, die zu Drusen vereint sein können, schmilzt bei ca.  $216\text{--}223^\circ$  korr. ohne merkliche Zersetzung und lässt sich bei 0,2 mm Druck bei  $190\text{--}200^\circ$  Blocktemperatur unzersetzt sublimieren. Er reduziert alkalische Silberlösung in der Kälte recht langsam aber deutlich und zeigt die sehr hohe spezifische Drehung von  $[\alpha]_D^{20} = +262^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 1$  in absolutem Alkohol, was eine leicht übersättigte Lösung darstellt). Im Ultraviolett zeigt er eine Bande bei ca.  $235\text{ m}\mu$ .

*U. V. Absorptionskurven der Substanzen A, C, D, F, G und Fraktion C. 17a.<sup>1)</sup>*

Die folgenden Kurven sind durch lichtelektrische Vermessung am Gitterspektroskop<sup>2)</sup> erhalten. Die Methodik, etwas weniger genau als die Vermessung mit *Hilger*-Spektrograph, benötigt aber viel weniger Substanz und liefert die Kurven bis  $200\text{ m}\mu$  herunter.



Alle in Alkohol und  $d = 0,121\text{ cm}$ .

Subst. A	$c = 5,93 \times 10^{-4}$ Mol/Ltr.	Subst. F	$c = 4,2 \times 10^{-4}$ Mol/Ltr.
„ C	$c = 5,43 \times 10^{-4}$ „	„ G	$c = 1,53 \times 10^{-3}$ „
„ D	$c = 5,7 \times 10^{-4}$ „	Frakt. C.17a	$c = 1,43 \times 10^{-3}$ „

*Weitere Krystallisate.* Aus den Mutterlaugen von C und D konnten weitere krystallisierte Fraktionen erhalten werden, die

<sup>1)</sup> Die Kurven wurden durch freundliche Vermittlung von Herrn Prof. R. Kuhn von Herrn A. Schröder im Kaiser-Wilhelm-Institut Heidelberg aufgenommen, wofür auch hier der beste Dank ausgesprochen sei.

<sup>2)</sup> Nach Pohl. Zur Methodik vgl. die Angaben in der soeben erschienenen 4. Aufl. von F. Pregl, Die quantitative organische Mikroanalyse, S. 308.

wahrscheinlich noch mindestens zwei verschiedene Körper enthalten, die beim *Everse-de Fremery*-Test wahrscheinlich inaktiv sind. Eine davon, die die ca. 222° korr. schmilzt und alkalische Silberlösung stark reduziert, könnte eventuell mit den *Kendall*'schen Krystallen identisch sein, jedoch ist die Reinheit noch zweifelhaft. Das ganze Krystallgemisch zusammen mit C und D war bis zur Dosierung von 0,5 mg täglich beim *Everse-de Fremery* Test unwirksam.

Die bei der Gewinnung der neutralen Konzentrate anfallenden sauren und basischen Begleiter sind noch nicht untersucht, eine krystallisierte Base ist vorhanden.

Von den verschiedenen Körpern ist Substanz A identisch mit Substanz 1 von *Wintersteiner* und *Pfiffner*<sup>1)</sup>. Es ist ferner wahrscheinlich, dass Substanz C mit Nr. 5 und Substanz E mit Nr. 4 von den Körpern der genannten Autoren identisch ist, ein direkter Vergleich ist in den beiden letzten Fällen jedoch noch nicht durchgeführt worden<sup>2)</sup>.

Aus den fettartigen Rückständen der Rohextrakte, denen das Hormon mit Wasser und verdünntem Methylalkohol entzogen war, und die gewichtsmässig den Hauptbestandteil der Rohextrakte ausmachen, konnte ferner eine reichliche Menge einer krystallisierten Neutralsubstanz vom Smp. 72,5—73° isoliert werden, die sich als Glycerin-mono-palmitat erwies. Sie hat insofern praktisches Interesse, als sie zeigt, was für Körper in diesen Extrakten für die unangenehmen Emulsionsbildungen verantwortlich sind. Die alkalische Verseifung des Petroläther-löslichen Fettes ergab ferner neben Fettsäuren und Glycerin in geringer Menge eine neutrale Schwefel-haltige Substanz, die aus Aceton in Nadeln vom Smp. 113—114,5° krystallisiert und die wahrscheinlich die Formel  $C_4H_{10}O_3S$  besitzt. Da sie Permanganat in der Kälte momentan reduziert, so ist ein Sulfon unwahrscheinlich, am wahrscheinlichsten ein aliphatisches Trioxy-sulfid oder Dioxy-sulfoxyd, was gelegentlich festgestellt werden soll.

<sup>1)</sup> Literatur vgl. Anm. 4) und 5) S. 32 sowie 1) S. 33. Herr Prof. *Wintersteiner* hat den direkten Vergleich durch Mischprobe in entgegenkommender Weise ausgeführt, die zwei Proben zeigten fast denselben Schmelzpunkt und gaben gemischt keine Depression. Ferner hatte Herr Dr. *Pfiffner* die Freundlichkeit, die Substanz A noch an zwei Hunden biologisch zu prüfen, sie erwies sich genau wie die als unwirksam befundene Nr. 1 als inaktiv (Wirksamkeit geringer als 10 Hunde-einheiten pro mg). Es sei auch hier der verbindlichste Dank für dieses Entgegenkommen ausgesprochen.

<sup>2)</sup> In der soeben erschienenen Publikation Anm. 5) S. 32 der amerikanischen Autoren geben diese für ihre Substanz vom Smp. 126—128°, die hier noch als Nr. 4 (jetzt von ihnen als C) bezeichnet wird, die Formel  $C_{24}H_{40}O_7$ . Die Verbrennungswerte würden jedoch ebensogut mit  $C_{21}H_{32}O_5 \cdot H_2O \pm H_2$  übereinstimmen. Substanz E scheint aber tatsächlich Krystallwasser zu enthalten. Sie wurde daher bisher nicht als solche, sondern nur als Semicarbazon verbrannt.

Schliesslich sollen noch einige orientierende Reaktionen der biologisch wichtigsten Fraktion C. 17 und C. 17a erwähnt werden.

Die direkte Druckhydrierung von C. 17a mit Nickel und Wasserstoff bei ca. 130° und 100 Atmosphären gab ein kaum mehr reduzierendes Gemisch, aus dem ca. 10% (auf angewandtes Material gerechnet) nadelige Krystalle (aus absolutem Alkohol) isoliert werden konnten, die bei ca. 200—216° (korr.) unzersetzt schmelzen und sich im Hochvakuum bei 0,2 mm Druck und ca. 270° Blocktemperatur unzersetzt destillieren liessen, und deren Analyse auf die Zusammensetzung  $C_{21}H_{36}O_4 \pm H_2$  passt. Es ist sehr wohl möglich, dass auch dieser Körper aus einem o-Oxy-keton mit 5 Sauerstoffatomen entstanden ist, da solche Körper bekanntlich bei der Hydrierung leicht ein Sauerstoff verlieren.

Ferner soll noch das Resultat der Oxydation von Fraktion C. 17 mit Silberoxyd erwähnt werden. Dass Cortinkonzentrate starkes Reduktionsvermögen gegen alkalische Silberlösung, sowie gegen *Fehling'sche* Lösung zeigen, ist verschiedentlich beobachtet worden. *Kendall* und Mitarbeiter<sup>1)</sup> erwähnen die Oxydation ihrer Krystalle mit Silberoxyd. *Wintersteiner*, *Vars* und *Pfiffner*<sup>2)</sup> geben an, dass ihre Konzentrate mindestens zwei reduzierende Faktoren enthalten, von denen einer, dessen Menge nur dem geringeren Teil der reduzierenden Bestandteile entspricht, Jod in bicarbonatalkalischer, sowie Silber-diammin-hydroxyd bei  $p_H$  8 reduziert, während der andere unter diesen Bedingungen noch nicht angegriffen wird. Der erstere soll mit der physiologischen Aktivität nichts zu tun haben. Die Gesamtreduktionskraft entsprach ca. 20—25% Glucose. Da die von den amerikanischen Autoren benützten Präparate wahrscheinlich noch etwas phenolische Bestandteile enthalten, so ist aus dem Reduktionswert ein definitiver Schluss nicht zu ziehen. Oxydationen mit Silberoxyd an amorphen Konzentraten sind inzwischen von *Kendall* auch ausgeführt worden<sup>3) 4)</sup>.

Bei den eigenen Versuchen wurde eine Probe der biologisch stark aktiven Fraktion C. 17 mit überschüssigem Silberoxyd in verdünntem Methanol geschüttelt unter allmählichem Zusatz von Soda- oder Natronlauge-Lösung unter leichter Erwärmung zum Schluss gegen 60°. Unter diesen Bedingungen wurde knapp  $\frac{2}{3}$  des Gewichtes der Probe in ein Gemisch von Säuren übergeführt, während etwas mehr als  $\frac{1}{3}$  als Neutralkörper erhalten wurden, die offenbar wenigstens zur Hauptsache unangegriffenes Material darstellen. Die letztere Fraktion (C. 18) war nun bemerkenswerterweise in der

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **109**, 1 (1935).

<sup>2)</sup> *Vars*, *Pfiffner*, J. Biol. Chem. **104**, c (1934); *Wintersteiner*, *Pfiffner*, J. biol. Chem. **109**, c (1935).

<sup>3)</sup> J. Biol. Chem. **109**, 1 (1935).

<sup>4)</sup> Vorträge Atlantic City 11. 6. 1935, sowie San Francisco 19.—23. 8. 1935.

Dosierung von 0,42 mg pro Tag und Ratte noch gut wirksam, während 0,21 mg sich als unwirksam erwiesen, sie zeigt somit etwa dieselbe Aktivität wie C. 17. Es ist demnach mit der Oxydation von fast zwei Dritteln des ursprünglichen Gewichtes auch ungefähr  $\frac{2}{3}$  der Aktivität zerstört worden. Die Fraktion C. 18 zeigte trotz der guten Aktivität fast keine Reduktionswirkung gegen alkalische Silberlösung in der Kälte mehr. Entweder wird das Hormon also unter den angewandten Bedingungen nur ziemlich langsam und unvollständig zerstört, besitzt also selber keine reduzierenden Eigenschaften, oder es existieren zwei verschiedene Körper, die biologisch wirksam sind, von denen einer oxydiert wird, der andere nicht. Die anderen verbleibenden Möglichkeiten sind weniger wahrscheinlich.

Die kaum mehr reduzierende Fraktion C. 18 lieferte durch direkte Krystallisation das schon erwähnte Keton (Substanz E), das bei 0,4 mg pro Tag und Ratte biologisch unwirksam war. Von den bei der Oxydation mit Silberoxyd in relativ reichlicher Menge erhaltenen Säuren konnte bisher nur ein Vertreter in sehr geringer Menge rein erhalten werden. Es ist eine ätherlösliche Säure, die aus Aceton-Wasser in Nadelchen vom Smp.  $220^{\circ}$  korr. krystallisiert und als Natriumsalz eine spezifische Drehung von ca.  $+160^{\circ}$  besitzt. Nach der Verbrennung könnte eine Säure  $C_{19}H_{28}O_4$  oder  $C_{20}H_{30}O_4 \pm H_2$  vorliegen. Die Hauptmenge der Säuren war amorph, resp. wurde bisher noch nicht getrennt.

Betrachtet man die bisherigen Resultate dieser Arbeit, sowie die erwähnten Publikationen der zwei amerikanischen Arbeitskreise zusammenfassend, so ist es naheliegend zu vermuten, dass die verschiedenen krystallisierten Substanzen mit 21 Kohlenstoff- und 5 Sauerstoffatomen nahe miteinander verwandt sind und dass sie sich hauptsächlich durch einen verschieden hohen Wasserstoffgehalt voneinander unterscheiden, soweit sie nicht isomer sind. Eine direkte gegenseitige Überführung ist allerdings bisher noch nicht durchgeführt worden. Es sprechen viele Gründe dafür, dass auch der biologisch aktive Anteil der Konzentrate derselben Stoffgruppe angehört. Als deren weitmöglichst hydrierter Grundkörper wäre Substanz A anzusehen, die mit der Substanz Nr. 1 resp. A von *Wintersteiner* und *Pfiffner*<sup>1)2)</sup> identisch ist.

#### *Zusammenfassung der Ergebnisse.*

Bei der Auswertung von Nebennieren-extrakten nach dem Testverfahren von *Swingle* und *Pfiffner* an Hunden, sowie nach dem *Everse-de Fremery*-Test an Ratten ergeben sich bisher keine Widersprüche, wenn man annimmt, dass in beiden Fällen derselbe Stoff gemessen wird. Ratten benötigen aber pro kg Körpergewicht ca. 500mal mehr Hormon als Hunde.

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **109**, c (1935).

<sup>2)</sup> J. Biol. Chem. **111**, 585, 599 (1935).

Aus Cortin-extrakten lässt sich durch Verteilung zwischen Pentan und wässrigem Methanol von 20% die gesamte Menge an aktiver Substanz in einem Reinheitsgrad gewinnen, der genügt, um die nachherige weitere Konzentrierung (z. B. nach *Pfiffner* und *Vars*) ohne merkliche Verluste durchführen zu können.

Aus den Konzentraten lässt sich das gesamte Hormon durch geeignete Ketonreagentien herausholen. Die biologisch wirksamen Anteile von Extrakten aus 1000 kg Rinder-nebennieren können in einfacher Weise so auf ein Gewicht von ca. 5,4 g gebracht werden, ohne merkbaren Aktivitätsverlust.

Die so gewonnenen Präparate stellen zur Hauptsache ein Gemisch von Oxyketonen- und Diketonen dar. Sie sind frei von Stickstoff, Schwefel, Phosphor und Halogen und enthalten ca. 3 Ratteneinheiten pro mg.

Es werden eine Anzahl kristallisierter Körper beschrieben, die teils aus den wirksamen Konzentraten, teils aus] unwirksamen Nebenfraktionen isoliert wurden, die sich in den bisher geprüften Dosierungen aber als biologisch inaktiv erwiesen haben. Fünf davon (die Substanzen A, C, D, E und F) scheinen nahe miteinander verwandt zu sein, da sie alle vermutlich 21 Kohlenstoffatome und 5 Sauerstoffatome enthalten.

Es werden Gründe beigebracht, die es als wahrscheinlich erscheinen lassen, dass auch die Hauptbestandteile der aktiven Präparate derselben Körperklasse angehören, wie die genannten reinen Substanzen.

### Experimenteller Teil.

Beispiel zur Anreicherung mit Pentan-Wasser: Der „Rohextrakt“ (vgl. theoretischer Teil) aus 50 kg Drüse, der als konzentrierte alkoholische Lösung bezogen wurde, wurde nach Zusatz von 100 cm<sup>3</sup> Wasser im Vakuum vom Alkohol befreit. Der Rückstand, der aus einer wässrigen Phase und braunem Öl bestand, wurde in einen Scheidetrichter gespült, mit Salzsäure bis zur eben kongosauren Reaktion versetzt und nach Zugabe von 600 cm<sup>3</sup> gereinigtem Pentan sehr gründlich geschüttelt. Nach Trennung wurde die wässrige Phase durch zwei weitere Scheidetrichter mit je 300 cm<sup>3</sup> Pentan geschickt und die Ausschüttelung 10mal mit je 100 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Salzsäure (trennt besser als Wasser allein) wiederholt. In den drei Pentanschichten verblieben ca. 20 g fettartige Stoffe. Die Trennungen waren teilweise sehr mühsam und die entstandenen Emulsionen konnten nur durch sehr langes Zentrifugieren aufgeteilt werden, es wurden aber nur die ganz klaren wässrigen Lösungen abgelassen. Die vereinigten wässrigen Lösungen wurden soweit neutralisiert, dass Kongo nicht mehr gebläut, Lakmus aber noch deutlich gerötet wurde, und im Vakuum auf 50 cm<sup>3</sup> eingedampft. Der Rückstand wurde 15mal mit je 200 cm<sup>3</sup> frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt und noch 24 Stunden im Apparat mit Äther extrahiert (gab fast nichts mehr). Die mit Sulfat getrockneten Ätherlösungen gaben 1,4 g Substanz mit insgesamt ca. 800 Ratteneinheiten, also praktisch vollständig alles Hormon, da der verwendete Rohextrakt ungefähr ebensoviel enthielt. — Zur Entfernung von basischen und sauren Begleitstoffen wurde obiges Konzentrat zunächst in Wasser aufgeschlemmt und nach Zusatz von Salzsäure bis zur deutlich kongosauren Reaktion erschöpfend mit Äther ausgeschüt-



telt. Der nach Abdampfen des Äthers zum Schluss im Vakuum, erhaltene Rückstand wurde aus der Aufschwemmung mit 25 cm<sup>3</sup> Wasser, der starke Pottaschelösung bis zur eben deutlich alkalischen Reaktion auf Phenolphthalein zugesetzt wurde, wiederum erschöpfend mit Äther ausgezogen. Erhalten wurden so ca. 1 g gereinigtes Konzentrat (C. 9) von hellbräunlicher Färbung, die immer noch ca. 800 Ratteneinheiten enthielten. (Einfacher ist es, von Anfang an mit Essigester auszuschütteln und die Auszüge direkt von Basen und Säuren durch einfaches Waschen mit wässriger Salzsäure und Sodalösung zu befreien. Das Hormon ist in Essigester so gut löslich, dass keine Verluste eintreten, wenn mit drei Scheidetrichtern mit Essigester gearbeitet und nicht mehr als nötig wässrige Phase verwendet wird.) Ein Trennungsversuch mit Bisulfit wird weiter unten gegeben. Nachfolgend soll ein Beispiel für die Trennung mit Semicarbazid gegeben werden:

Ca. 10-proz. Lösungen von Semicarbazid-acetat in Methanol wurden hier wie für die später beschriebenen Fälle wie folgt bereitet. 1 Teil Semicarbazid-chlorhydrat und 1,5 Teil krystallisiertes Natriumacetat werden im Mörser verrieben, bis Verflüssigung eintritt, hierauf werden 10 Teile Methanol zugegeben, gut verrieben und filtriert. 0,5 g der oben genannten Fraktion C. 9 (aus ca. 25 kg Drüse) wurden mit 10 cm<sup>3</sup> 10-proz. Semicarbazid-acetatlösung in Methanol 24 Stunden stehen gelassen, im Vakuum von Methanol befreit und der Rückstand mit wenig Wasser verrieben, wobei eine dicke ölige Fällung entstand. Es wurde noch zweimal nach Zusatz von wenig Wasser im Vakuum eingeengt und durch Zusatz von wenigen Tropfen starker Pottasche gegen Lackmus neutralisiert. Die ca. 3 cm<sup>3</sup> betragende Mischung wurde dreimal im Scheidetrichter mit je 50 cm<sup>3</sup> frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Gibt 0,2 g „Ketonfreies“. Hierauf wurde mit etwas Essigester ausgeschüttelt, der Auszug im Vakuum stark eingeengt und mit viel Äther versetzt. Die Fällung wurde mit dem Semicarbazongemisch (siehe weiter unten), die Ätherlösung mit dem Ketonfreien vereinigt. Bei den wässrigen Teilen wurde das Wasser von den schmierigen Semicarbazonen vorsichtig abgegossen und letztere zweimal mit sehr wenig Wasser gewaschen. Die Rohsemicarbazone wurden mit wenig Alkohol zusammengespült und nach Entfernung des Alkohols im Vakuum gut getrocknet. Erhalten ca. 150 mg. Zur Vorreinigung wurden sie mit einer Spur Alkohol gelöst und daraus mit viel absolutem Äther gefällt und gut mit Äther gewaschen. Dieses Produkt wurde beim Verreiben mit Wasser pulvrig. Ausbeute nach dem Trocknen 136 mg cremefarbiges amorphes Pulver. Zeigt keinen Schmelzpunkt, sondern zersetzt sich von 190° an allmählich. Aus diesem konnte durch fraktionierte Krystallisation aus absolutem Alkohol unter Zusatz von etwas gewaschener Kohle ein schwer löslicher Teil in

gut ausgebildeten Kryställchen gewonnen werden. Es wurde 6,5 mg einer schwerlöslichen Spitzenfraktion, die noch etwas grau gefärbt war und wenig flockiges Material enthielt, abgetrennt. Die folgende völlig krystallisierte Fraktion (16 mg) wurde für die Analyse verwendet. Das praktisch farblose, feine Krystallpulver zeigte keinen Schmelzpunkt, sondern zersetzte sich von ca. 250° an unter Braunfärbung; es ist der als F bezeichnete Körper. Die Mutterlaugen lieferten nach Eindampfen zum Syrup und Ausreiben mit Äther 70 mg „Semicarbazongemisch aus Mutterlaugen“ als cremefarbiges Pulver, zur Hauptsache amorph, das sich bei ca. 180—190° zersetzte.

*Substanz F.* Diese zeigte eine starke Absorptionsbande im Ultraviolett bei ca. 270 m $\mu$  (vgl. theoretischer Teil) und nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 80° die folgende Zusammensetzung:

3,561 mg Subst. gaben 7,52 mg CO<sub>2</sub>, 2,53 mg H<sub>2</sub>O und 0,018 mg Rückstand  
 2,712 mg Subst. gaben 0,398 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (23°, 721 mm)

C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub> N <sub>6</sub>	Ber. C	57,70	H	8,02	N	17,58%
C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub> N <sub>6</sub>	Ber. „	57,94	„	7,62	„	17,65%
	Gef. „	57,59	„	7,95	„	16,09%

Es ist nicht sicher, dass die Substanz ganz rein gewesen ist; der zu niedrige Stickstoffgehalt kann von geringen Mengen beigemischtem Monosemicarbazon eines Monoketons herrühren, die in dem Hormonkonzentrat reichlich enthalten sind, jedoch werden bei Disemicarbazonen sehr häufig zu niedrige Stickstoffwerte gefunden. Am wahrscheinlichsten ist daher als Grundkörper ein Disemicarbazon eines Diketons C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>  $\pm$  H<sub>2</sub>, das wahrscheinlich eine Doppelbindung in Konjugation zu einer CO-Gruppe enthält. Für ein Disemicarbazon spricht auch die geringe Löslichkeit in Alkohol, sowie das Verhalten beim Erhitzen. Die später zu beschreibenden Monosemicarbazone zeigen durchwegs wirkliche Schmelzpunkte, während dieses Derivat, ebenso wie das Disemicarbazon von Substanz G sich, ohne zu schmelzen, allmählich zersetzt.

Spaltung der 70 mg „Semicarbazon aus Mutterlauge“. Diese wurden mit 2 cm<sup>3</sup> n. Salzsäure verrieben, wobei das Pulver klebrig wurde, und über Nacht in Kohlendioxidatmosphäre stehen gelassen. Hierauf wurde 20 mal mit frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt, wobei die ungelöst gebliebenen Teile jedesmal gründlich mit der wässrigen Schicht und mit Äther verrieben wurden. Die harzigen Knöllchen wurden dabei allmählich pulvrig und verschwanden schliesslich fast ganz. Gegen Schluss wurde mit der wässrigen Schicht jeweils gegen 50° erwärmt vor einer neuen Ausschüttelung. Die sukzessive durch eine kleine Schicht verdünnter Sodalösung entsäuerten, und über Natriumsulfat getrockneten Ätherauszüge hinterliessen 50 mg Trockenrückstand (Fraktion C. 11), die bei 1,25 mg pro Tag und Ratte gerade noch wirksam waren. Die ketonfreien

Anteile waren jedoch biologisch unwirksam bei 2 mg pro Tag und Ratte. Da inzwischen ein besseres Trennungsverfahren gefunden wurde, so wurde von der Anwendung von Semicarbazid in diesem Stadium abgesehen. Für eine quantitative Trennung der noch unreinen Konzentrate ist es wenig geeignet, auch nicht zur Bereitung anderer einheitlicher Semicarbazone, besonders da eine Kontrolle durch charakteristische Schmelzpunkte fehlt.

#### *Trennung grösserer Chargen.*

Die Aufarbeitung von Extrakt aus 1000 kg Drüse erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von *Pfiffner* und *Vars*<sup>1)</sup> in Portionen aus 250 kg Drüse wie folgt:

Die alkoholischen Lösungen des „Rohextraktes“ (mit Permutit gereinigt) aus 250 kg Drüse, enthaltend ca. 125 g Trockenrückstand, wurden filtriert und das Filtrat im Vakuum auf ein kleines Volum eingedampft. Der Rückstand wurde mit 250 cm<sup>3</sup> frisch destilliertem Äther und 100 cm<sup>3</sup> Wasser in einen Scheidetrichter gespült und dort insgesamt 20 mal mit je 100 cm<sup>3</sup> Wasser sehr energisch ausgeschüttelt. Bei der ersten Ausschüttelung entstand öfters eine sehr starke Emulsion, die nach 5-stündigem Stehen für sich abgelassen und filtriert wurde; die auf dem Filter verbleibenden geringen Reste wurden gut mit Wasser ausgewaschen. Die weiteren Auszüge trennten sich nach Zugabe von 1 cm<sup>3</sup> 2-n. Salzsäure meist ziemlich rasch ab. Alle wässrigen Teile passierten noch einen zweiten Scheidetrichter, in dem sich 50 cm<sup>3</sup> Äther befanden. Im ersten musste der Äther von Zeit zu Zeit etwas ergänzt werden. Im Äther verblieben ca. 110 g „ätherlösliche Fettrückstände“, noch Hormon-haltig; deren Verarbeitung siehe weiter unten.

Die wässrigen Lösungen wurden soweit neutralisiert, dass sie noch deutlich lackmussauer, aber nicht mehr kongosauer waren und im Vakuum auf ca. 100 cm<sup>3</sup> eingengt. Nach Zusatz von Salzsäure bis zur deutlich kongosauren Reaktion wurde 16 mal mit je 400 cm<sup>3</sup> frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. (Die wässrigen Anteile wurden mit den analogen der folgenden Operation vereinigt.) Die ätherische Hormonlösung wurde durch Eindampfen, zum Schluss im Vakuum, auf 200 cm<sup>3</sup> konzentriert (wobei sich etwas honigartiges Produkt ausschied) und mit vielen kleinen Portionen Wasser in einen Scheidetrichter gespült. Jetzt wurde 18 mal mit je 100 cm<sup>3</sup> Wasser ausgeschüttelt, die wässrigen Lösungen passierten wieder einen zweiten Scheidetrichter, wo sie mit 50 cm<sup>3</sup> Äther nachgereinigt wurden. (Die in den beiden Ätherschichten verbleibenden Anteile wurden als „Äther-rest II“ bezeichnet und für eine spätere Prüfung zurückgestellt.) Die wässrigen Teile wurden wieder auf 100 cm<sup>3</sup> im Vakuum eingedampft (40° Badtemperatur), der Rückstand mit soviel starker

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **106**, 645 (1934).

Pottaschelösung versetzt, dass Phenolphthalein eben gerötet wurde und 15 mal mit je 400 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt. (Die wässrigen Lösungen wurden mit den oben erwähnten vereinigt, nach Zusatz von Salzsäure bis zur stark kongosauren Reaktion wurden extrahierbare Säuren, hierauf nach Zugabe von Pottasche bis zur alkalischen Reaktion, extrahierbare Basen mit Äther ausgezogen. Die verbleibende Lösung wurde bis zur lackmussauren Reaktion neutralisiert, im Vakuum zum Syrup eingedampft und durch Extraktion mit absolutem Alkohol noch vorhandene organische Bestandteile von den Salzen getrennt. Diese Anteile wurden für eine event. spätere Prüfung aufgehoben. Sie waren zusammen bis zu einer Menge, die 500 g Ausgangsdrüse entspricht, pro Tag und Ratte, inaktiv.) Die letzte Ätherlösung hinterliess beim Eindampfen das erste Konzentrat C. 13, von dem 1 mg pro Tag und Ratte kaum, 1,5 mg jedoch wirksam waren. Die Ausbeute betrug ca. 2,5 g.

Zur Gewinnung der Hormonreste aus den oben erwähnten „ätherlöslichen Fettrückständen“ mussten diese zunächst etwas vorgereinigt werden. Sie wurden nach völliger Entfernung des Äthers mit der 4—5-fachen Menge Pentan gelöst, wobei zunächst geringe Trübung und dann Abscheidung eines reichlichen krystallinischen Niederschlages erfolgte. Nach 1-tägigem Stehen wurde dieser abgenutscht, mit Pentan gut gewaschen und zur Entfernung event. adsorbierter Hormonreste einmal aus Aceton umkrystallisiert. (Ist rohes Glycerin-monopalmitat; siehe weiter unten.) Die Acetonlösung wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand mit Pentan und 20-proz. wässrigem Methylalkohol in einen Scheidetrichter gespült und dort mit der Hauptmenge der Pentanlösung vereinigt. Jetzt wurde 10 mal mit je 100 cm<sup>3</sup> Wasser ausgeschüttelt, dem wenn nötig soviel Methanol (maximal aber 25%) beigegeben wurde, dass eine glatte Trennung ohne Emulsionsbildung eintrat. Im Pentan verblieben die „pentanlöslichen Fettreste“ nunmehr frei von Hormon. (Untersuchung derselben siehe weiter unten.) Die wässrigen Lösungen wurden im Vakuum eingeeengt und wie die obigen aus Äther erhaltenen weiterbehandelt. Die Nebenprodukte wurden mit den analogen vereinigt. Die letzte Ätherlösung hinterliess beim Eindampfen das zweite Konzentrat C. 13a, durchschnittlich 0,8 g, die ungefähr ebenso, eher noch etwas aktiver waren als C. 13.

Insgesamt wurden aus 1000 kg Drüse 9,918 g C. 13 und 3,6 g C. 13a erhalten. Diese wurden der Trennung mit *Girard*-Reagens unterworfen, deren genauere Ausführung später bekanntgegeben wird. Die 9,918 g der Fraktion C. 13 gaben dabei 3,55 g „Ketonfraktion“ C. 17, sowie 5,15 g „Ketonfreies“ C. 16. Der Verlust betrug somit 1,228 g, wahrscheinlich inaktive Nebenbestandteile. C. 16

erwies sich als inaktiv bei der Dosierung von 2 mg pro Tag und Ratte, dagegen hatte C. 17 eine sehr hohe Wirksamkeit, da 0,33 mg pro Tag und Ratte gut wirksam, dagegen 0,22 mg kaum mehr wirksam waren. Die 3,55 g C. 17 enthielten somit insgesamt ca. 10 650 Ratteneinheiten, also innerhalb der Fehlergrenze der biologischen Bestimmung, die man mit 50% ansetzen muss, ebensoviel wie das zur Bereitung benutzte Konzentrat C. 13. Weiter wurde die Fraktion C. 13a derselben Trennung unterworfen und lieferte 1,460 g „Ketonfreies“ C. 16a und 1,8 g „Ketofraktion“ C. 17a, die biologisch ungefähr ebenso wirksam war wie C. 17. Es erwiesen sich nämlich 0,25 mg pro Tag und Ratte als ungenügend, während 0,5 mg wirksam waren. Es mag hier schon hervorgehoben werden, dass die als „Ketonfreies“ bezeichneten Fraktionen C. 16 und C. 16a nicht wirklich vollständig ketonfrei waren, insbesondere die letztere enthielt noch eine Anzahl verschiedener Ketone. Das liegt daran, dass die Trennung unter sehr milden Bedingungen durchgeführt wurde, unter denen nur die Ketone erfasst werden, die mit dem Reagens sehr leicht in Reaktion treten, und die, wie es sich zeigte, die Hauptaktivität enthalten.

#### Eigenschaften der Fraktionen.

Fraktion C. 16. Hell-rötlich-bräunliche, glasige Masse; ist schwach linksdrehend.  $[\alpha]_D^{12} = \text{ca.} - 6^\circ$ . Eisen(III)chlorid-Reaktion in verdünntem Methanol deutlich grün, auf Zusatz von Alkali rot. Eine kleine Probe in wenig Methanol gelöst und mit dem doppelten Volum alkalischer Silberlösung<sup>1)</sup> versetzt färbt sich nach wenigen Minuten bei Zimmertemperatur schwarz. Sie ist leicht löslich in Alkohol, Methanol, Aceton und Essigester, schwer in Wasser, Benzol und Äther, fast unlöslich in Petroläther. Nach kurzem Stehen tritt meist spontan teilweise Krystallisation ein. Zur Gewinnung der Krystalle wurde die Fraktion in knapp zwei Teilen Aceton gelöst und mit Toluol soweit versetzt, dass gerade noch keine bleibende Fällung entstand. Nach längstens 12 Stunden war jeweils Krystallisation eingetreten, die durch zweitätiges Stehen bei 0° möglichst vervollständigt wurde. Es wurde abgenutscht, mit Aceton-Toluol (1:2), zum Schluss mit ganz wenig reinem Aceton und Äther gewaschen. Die Krystalle stellen die rohe Substanz A dar. Nachdem es sich gezeigt hatte, dass diese Substanz auch gegen heisses Alkali stabil ist, konnten weitere Mengen aus den Mutterlauge wie folgt gewonnen werden: Lösungsmittelreste wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand mit einer Mischung von 20 cm<sup>3</sup> 2-n. Natronlauge und etwas Eis versetzt und 5 mal mit je 400 cm<sup>3</sup> frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. (Die alkalische Lösung gab nach Behandlung

<sup>1)</sup> Die Silberlösung wurde wie in allen weiteren Fällen wie folgt bereitet. Wässrige Silbernitratlösung wurde mit soviel 2-n. Natronlauge versetzt, dass alles Silberoxyd ausgefallen war, hierauf wurde Ammoniak bis eben zur Lösung zugepft.

mit Kohlendioxyd an Äther ca. 300 mg „Phenole“ und nach Zusatz von Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion ca. 550 mg „Säuren“ ab, die noch nicht weiter untersucht wurden.) Die nach Abdestillieren des Äthers gewonnenen Neutralteile gaben durch Krystallisation aus Aceton-Toluol eine weitere Menge rohe Substanz A. Die weiter verbleibende Mutterlauge wurde von Lösungsmitteln im Vakuum befreit und wog dann ca. 3,6 g. Diese wurden zur Verseifung mit der Lösung von 2,7 g Natrium in 30 cm<sup>3</sup> Methanol und 1 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt, 20 Minuten unter Rückfluss gekocht und nach Zusatz von Wasser im Vakuum vom Methanol vollständig befreit. Der Rückstand wurde 5mal mit je 400 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt, (die Ätherschichten passierten noch einen weiteren Scheidetrichter)<sup>1)</sup> und gaben ca. 2,05 g Unverseifbares. (Aus der alkalischen Lösung wurden noch wie oben ca. 68 mg „Phenole“ und ca. 310 mg „Säuren“ erhalten, die saure Schicht lieferte nach Zusatz von Pottasche und Ausschütteln mit Äther ca. 68 mg „Basen“, von Pyrazin-artigem Geruch, die teilweise krystallisierten und noch nicht weiter untersucht sind.) Das rohe Unverseifbare wurde in 10 cm<sup>3</sup> 40-proz. Methylalkohol gelöst und dreimal mit Pentan ausgeschüttelt, der 485 mg Pentan-lösliches entfernte, das nicht weiter untersucht wurde. Die wässrige Methanol-lösung wurde im Vakuum stark eingeeengt. Es verblieben knapp 1,6 g, die teilweise krystallisierten. Es wurde unter Kühlung mit wenig 40-proz. Methanol verflüssigt, abgesaugt, zuerst mit demselben Lösungsmittel, dann mit Äther und wenig Aceton gewaschen. Die Krystalle erwiesen sich als Gemisch von Substanz A und B, die durch Vakuum-Sublimation getrennt werden konnten.

*Substanz A.* Im Ganzen wurden 406 mg des Rohproduktes erhalten, das unscharf gegen 145° schmolz (manche Proben nicht vollständig); bei ca. 160° begann die Bildung von Nadeln, die dann erneut bei ca. 209—216° korr. schmolzen. Zur Reinigung wurde zunächst aus Alkohol-Wasser durch Einengen im Vakuum, dann aus Alkohol-Äther umgefällt und schliesslich aus absolutem Alkohol bis zum konstanten Schmelzpunkt umkrystallisiert. Es konnten so knapp die Hälfte des Materials analysenrein erhalten werden; die aus der Mutterlauge regenerierte Substanz diente für Abbauprobieren. Der reine Körper scheidet sich aus Alkohol in meist sechseckigen klaren Blättchen aus, die beim Erhitzen unter dem Mikroskop bei ca. 160° korr. opak werden und dann bei 222—224° korr. unzersetzt schmelzen. Im Sublimationsröhrchen destilliert der Körper im Vakuum bei 0,05 mm und ca. 290° Aussentemperatur. Das glasige Destillat zerspringt beim Anfeuchten mit Aceton zu einem weissen Krystallpulver, das, ohne Umwandlung zu zeigen, bei 222° korr.

<sup>1)</sup> Mit 10 cm<sup>3</sup> n. Salzsäure.

schmilzt. Durch Umkrystallisieren aus Alkohol werden wieder die sechseckigen Blättchen erhalten, die den Umwandlungspunkt wieder zeigen. Der Körper ist leicht löslich in Alkohol, Methanol (besonders wenn wenig Wasser zugegen ist), auch Essigester löst leicht und Dioxan. Schwerer löst Aceton (die Löslichkeit wird auch hier durch einen geringen Wassergehalt von 10—20% erhöht). Benzol und Äther lösen sehr schwer, Petroläther und Benzin fast gar nicht. Die Substanz verträgt halbstündiges Kochen mit methylalkoholischer Kalilauge, wird jedoch durch längeres Kochen mit alkoholisch-wässriger Salzsäure verändert. Sie ist optisch aktiv und zeigt  $[\alpha]_D^{19} = +16^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1,808$  in absolutem Alkohol). Die konzentrierte Lösung in 50-proz. Methanol gibt mit einer möglichst konzentrierten Lösung von Digitonin in demselben Lösungsmittel nach kurzem Stehen eine krystalline Fällung. Der Körper ist frei von Schwefel, Stickstoff und Halogen.

Für die Analyse ist es wichtig zu beachten, dass die bei ca. 100° im Vakuum getrocknete Substanz sehr hygroskopisch ist; trocknet man dagegen auch nur kurz über dem Umwandlungspunkt, so ist der Körper nicht mehr hygroskopisch. Nr. 1 wurde bei 95° im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (3 Stunden) und unter Feuchtigkeitsausschluss (Schweinechen) zur Wägung gebracht. Nr. 2 ist bei 170° 30 Minuten bei 0,05 mm getrocknet.

4,306 mg Subst. Nr. 1 gaben 10,78 mg CO<sub>2</sub> und 3,87 mg H<sub>2</sub>O  
 3,390 mg Subst. Nr. 2 gaben 8,49 mg CO<sub>2</sub> und 3,13 mg H<sub>2</sub>O  
 9,12 mg Subst. Nr. 2 gaben 2,62 cm<sup>3</sup> Methan (kalt), resp. 2,91 cm<sup>3</sup>  
 Methan (bei 80°) (*Zerewitinoff*) (21°, 727 mm)  
 0,468 mg Subst. Nr. 2 in 4,971 mg Campher gaben  $\Delta = 9,4^\circ$

C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	Ber. C	68,05	H	10,37%		
C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	Ber. „	68,42	„	9,87%	-OH(5) 23%	-OH(4) 18,4% Mol.-Gew. 368,3
Nr. 1	Gef. „	68,28	„	10,06%		
Nr. 2	Gef. „	68,30	„	10,33%	19,43 resp.	21,53% „ 381

Die bei der *Zerewitinoff*-Bestimmung erhaltene Lösung wurde mit Ammoniumchlorid und Wasser zerlegt und mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigester-Anisol-lösung wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und hinterliess eine gelbliche Krystallmasse, die mit wenig Äther gewaschen bereits den Smp. 207—215° zeigte. Aus wenig Alkohol wurden wieder die charakteristischen Blättchen erhalten, die bei der Mischprobe keine Depression zeigten. Es dürfte also ein 4- oder 5-wertiger Alkohol C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub> ± H<sub>2</sub> vorliegen. Sind 36 Wasserstoffatome vorhanden, so müssen 4 Ringe vorliegen, einer davon muss als Oxydring vorhanden sein, für den Fall, dass nur 4 Hydroxyle vorhanden sind. Der Körper besitzt nämlich keine Carbonylgruppe und keine Doppelbindung. Ausser der Tatsache, dass durch Methylmagnesiumjodid (vgl. obige Aufarbeitung des Ansatzes aus *Zerewitinoff*-Bestimmung) keine Veränderung eintritt, konnte eine Probe nach mehrtägigem Stehen mit Semicarbazid-acetat in Methanol unverändert regeneriert werden. Tetranitromethan gibt

keine Gelbfärbung. Auch mit Essigsäure-anhydrid und wenig konz. Schwefelsäure tritt keine charakteristische Färbung ein. Auch bei dem folgenden Hydrierungsversuch unter energischen Bedingungen blieb er unverändert.

Hydrierungsversuch. 30 mg Subst. A (nicht ganz rein, vom Smp. 214—216° korr. nach weitgehendem erstem Schmelzen bei 145—155° und Wiedererstarren zu Nadeln) wurden in den Glaseinsatz eines Rotierautoklaven gegeben, mit 1 cm<sup>3</sup> alkoholischer Nickelkieselsäuregel-suspension (enthaltend ca. 100 mg Nickel) und 5 cm<sup>3</sup> katalytisch reinem Alkohol versetzt und nach Vertreiben der Luft durch Wasserstoff mit dem letzteren auf 100 Atm. aufgepresst. Unter Rotieren wurde zuerst auf 100° aufgeheizt, im Laufe von 2 Stunden bis 140° gesteigert und bei dieser Temperatur 3 Stunden laufen lassen; der Druck betrug dabei 140 Atm. Nach Erkalten wurde mit Alkohol herausgespült, filtriert, mit wenig Kohle von Nickelresten geklärt und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand krystallisierte sofort und gab, aus wenig absolutem Alkohol gereinigt, 22 mg der charakteristischen sechseckigen Blättchen, die nach Schmelzpunkt und Mischprobe unveränderte Substanz A darstellten.

Acetylierung. 22 mg analysenreine Substanz A wurde mit 0,1 cm<sup>3</sup> Essigsäure-anhydrid und 0,1 cm<sup>3</sup> wasserfreiem Pyridin in einem kleinen Röhrchen eingeschmolzen 24 Stunden auf 80° erhitzt. Der ganz leicht braun gefärbte Inhalt wurde im Vakuum zur Trockne gebracht, der Rückstand mit Wasser und Soda geschüttelt und in reinem Äther aufgenommen. Die Ätherlösung wurde mit verdünnter Salzsäure und Natronlauge neutral gewaschen, mit Wasser gewaschen, getrocknet und abdestilliert. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und mehrmals mit Benzin (Sdp. 50—60°) ausgekocht (je ca. 5 cm<sup>3</sup>) und die nach dem Erkalten in Lösung verbliebenen Anteile klar abgegossen. Diese wurden auf ein kleines Volum eingengt, wobei sich ein Öl abschied. Es wurde soviel absoluter Äther zuge- tropft, dass das Öl gerade in Lösung ging und verschlossen stehen gelassen. Nach ca. 1 Stunde begann die Abscheidung von Krystallen in kugeligen Drusen. Smp. 150°. Zur Analyse wurde nochmals aus Benzin mit einer Spur Äther umkrystallisiert. Es wurden ziemlich grobe flache Nadeln erhalten, jetzt weniger zu Drusen verwachsen. Smp. 150—151° korr.

2,957 mg Subst.	gaben 7,00 mg CO <sub>2</sub>	und 2,19 mg H <sub>2</sub> O
1,810 mg Subst.	gaben 4,28 mg CO <sub>2</sub>	und 1,32 mg H <sub>2</sub> O
C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	Ber. C 64,89	H 8,25%
C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>10</sub>	Ber. „ 64,32	„ 8,18%
	Gef. „ 64,55; 64,49	„ 8,29; 8,16%

Es ist also nicht möglich zu entscheiden, ob 4 oder 5 Acetylgruppen eingetreten sind, da die Kohlenstoffwerte gerade zwischen den zwei Möglichkeiten liegen und auf beide Formeln stimmen. Aus



den in Benzin unlöslichen Teilen wurde eine geringe Menge eines Nebenproduktes erhalten, das viel höher unscharf bei 200—220° schmolz.

Mono-acetonverbindung. 22 mg nicht ganz reine Substanz A (Smp. 214—216° korr. nach erstem teilweisem Schmelzen bei 145 bis 155° und Wiedererstarren zu Nadeln) wurden in 50 cm<sup>3</sup> über Calciumchlorid destillierten Acetons gelöst, mit 1 g wasserfreiem Kupfersulfat versetzt und auf der Maschine 5 Tage geschüttelt. Hierauf wurde filtriert, das Filtrat mit gepulverter Pottasche  $\frac{1}{2}$  Stunde geschüttelt und die erneut filtrierte Lösung durch Destillation von Aceton befreit. Der krystalline Rückstand wurde, in Äther gelöst, mit wässriger Sodalösung und zweimal mit wenig Wasser ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit Sulfat getrocknet und hinterliess einen krystallisierten Rückstand, der aus wenig Aceton umkrystallisiert wurde. Sternförmig verwachsene Nadeln, mit etwas Äther, dann mit Pentan gewaschen. Sie wurden bei ca. 120° opak und schmolzen nicht ganz scharf bei 207—213,5° korr. Zur Analyse wurde im Hochvakuum sublimiert bei 195° Blocktemperatur und 0,05 mm Druck. Der Schmelzpunkt war dann scharf 209—210° korr. unter dem Mikroskop. Der Körper ist also, wie erwartet, viel besser flüchtig als die Substanz A selbst, ebenso in organischen Lösungsmitteln leichter, in Wasser schwerer löslich als diese.

4,027 mg Subst. gaben 10,37 mg CO<sub>2</sub> und 3,61 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>24</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>	Ber. C 70,19	H 10,31%
C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	Ber. „ 70,53	„ 9,88%
	Gef. „ 70,23	„ 10,03%

Aus der Mutterlauge konnten nach vorsichtigem Zusatz von Pentan neben weiteren Mengen an Nadeln eine kleine Menge von schönen Körnchen isoliert werden, die mechanisch ausgesucht wurden. Sie schmolzen bei ca. 108—112°, wurden dabei aber gleich wieder fest und schmolzen dann erneut bei 207—210° korr. Sie wurden nach Trocknen im Hochvakuum bei 50° direkt verbrannt. Nach der Analyse könnte die obige Acetonverbindung mit 1 Mol Krystall-aceton oder  $\frac{1}{2}$  Mol Krystallwasser vorliegen.

3,173 mg Subst. gaben 8,055 mg CO<sub>2</sub> und 2,93 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub> (= C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub> + C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	Ber. C 69,47	H 9,92%
C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub> · $\frac{1}{2}$ H <sub>2</sub> O	Ber. „ 69,00	„ 9,91%
	Gef. „ 69,24	„ 10,33%

Ebenso wären natürlich auch die um zwei Wasserstoff reicheren Formeln möglich.

Einwirkung von Bleitetraacetat in Eisessig. 17,5 mg Substanz A (fast analysenrein) hochvakuum-trocken, wurden in 0,5 cm<sup>3</sup> Eisessig (analysenrein) gelöst und mit 0,95 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Bleitetraacetatlösung in Eisessig (entsprechend 1 Atomgewicht Sauerstoff) versetzt und eine Stunde auf 50° erwärmt. Hierauf wurde der Eis-

essig im Vakuum vollständig abdestilliert und in einer auf  $-80^{\circ}$  gekühlten Vorlage gesammelt. Das Destillat reagierte nach dem Verdünnen stark mit fuchsinschweflicher Säure in salzsaurer Lösung. Es wurde mit 20 mg Dimedon und  $15 \text{ cm}^3$  Wasser versetzt und 1 Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Dabei schieden sich feine Nadeln aus, die nach 12-stündigem Stehen abfiltriert wurden und dann 9 mg wogen (theoretisch könnten bei Entstehung von 1 Mol Formaldehyd 14,4 mg des Derivates gebildet werden). Smp.  $195^{\circ}$  korr., Formal-dimedon und Mischprobe ebenso. Auch die Sublimationstemperatur im Vakuum war dieselbe, der Schmelzpunkt des Sublimates war unverändert. — Der Rückstand, der beim Abdestillieren des Eisessigs im Vakuum zurückblieb, lieferte ein Gemisch interessanter Abbauprodukte, die aber leichter unter etwas anderen Bedingungen erhalten und in einer späteren Mitteilung besprochen werden.

Quantitative Bestimmung des Verbrauchs an Bleitetracetat. Substanz A verbraucht schon bei Zimmertemperatur rasch Bleitetracetat. Es wurden eingewogene trockene Proben von ca. 4 mg mit  $2 \text{ cm}^3$  Bleitetracetat-Eisessiglösung versetzt, die  $11,40 \text{ cm}^3$  0,01-n. Thiosulfat verbrauchte (nach Zusatz von wässriger Kaliumjodid-Natriumacetat-lösung). Nach den angegebenen Zeiten wurde zersetzt und zurücktitriert.

Einwaage Subst. A	Einwirkungsdauer	Thiosulfat zum Zurücktitrieren benötigt	Thiosulfat verbraucht	Entsprechende Jod-äquivalente pro Mol	Entspr. Sauerstoff-äquivalente pro Mol
3,88 mg	1 Stunde	$8,55 \text{ cm}^3$	2,85	2,72	1,36
3,65 ..	$5\frac{1}{2}$ Stunden	7,94 ..	3,46	3,38	1,69
3,72 ..	25 ..	6,74 ..	4,66	4,62	2,31
4,085 ..	48 ..	5,86 ..	5,54	4,98	2,49

Da gleichzeitig aufgestellte Proben von  $2 \text{ cm}^3$  derselben Bleitetracetatlösung nicht ganz konstant blieben, sondern nach 2 Tagen einen Aktivitätsverlust bis zu  $0,5 \text{ cm}^3$  0,01-n. zeigten, so sind obige Messungen mit einem Fehler entsprechend ca. 0,25 Sauerstoff pro Mol angewandte Substanz behaftet.

Gleichzeitig wurde eine Serie mit je 0,01 Millimol Glycerin ebenso mit  $2 \text{ cm}^3$  obiger Bleitetracetatlösung angesetzt, der Verbrauch war folgender (bei  $20^{\circ} \text{ C}$ ):

Nach 2 Stunden entsprechend	1,16 Sauerstoffatomen pro Mol Glycerin
.. 18 ..	.. 2,04 .. .. ..
.. 42 ..	.. 3,12 .. .. ..
.. 68 ..	.. 3,00 .. .. ..
.. 92 ..	.. 3,32 .. .. ..

Glycerin verbraucht also etwas langsamer, aber deutlich etwas mehr Sauerstoff, nämlich 3, die Substanz A dagegen 2—2,5 Atomgewichte.

Die Messung wurde hierauf bei  $50^{\circ}$  wiederholt in Schliff Röhrchen, bei der Blindproben mit Bleitetracetatlösung allein recht konstant blieben, sodass die folgende Messung genauer ist.

Substanz A	verbrauchte nach 2 Stunden	2,34	Sauerstoff-atome pro Mol
„ „ A	„ „ 3	„ 2,44	„ „ „
Glycerin	„ „ 1 Stunde	2,03	„ „ „
„	„ „ 2 Stunden	3,12	„ „ „

Längeres Erhitzen auf 50° bis zu 5 Stunden hatte beim Glycerin keinen Zuwachs mehr zur Folge. Es verbraucht also 3 Sauerstoffatome pro Mol, die Substanz A nur knapp 2,5, bei der letzteren dürfte die Reaktion daher wahrscheinlich nicht einheitlich verlaufen.

*Substanz B.* Das Gemisch von Substanz B und A, das durch alkalische Verseifung der Mutterlaugen aus Fraktion C. 16 erhalten wurde, liess sich durch Sublimation im Hochvakuum trennen. Substanz B ging schon bei 160—200° Blocktemperatur unter 0,05 mm Druck unzersetzt über (während Substanz A ca. 290° Heiztemperatur benötigt). Das weisse, gut krystallisierte Sublimat zeigte im zugeschmolzenen Röhrchen den Smp. 248—250° unkor. Es wurde aus absolutem Alkohol umkrystallisiert, in dem es recht schwer löslich ist; es scheidet sich in langen Nadeln ab. Ausbeute 10 mg. Zur Analyse wurde nochmals im Vakuum sublimiert. Smp. 253—255° unkor. im zugeschmolzenen Röhrchen. Unter dem Mikroskop sublimiert es weg, lange bevor es geschmolzen ist.

3,095 mg Subst.	gaben 7,21 mg CO <sub>2</sub> und 2,57 mg H <sub>2</sub> O		
C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	Ber. C	63,95	H 9,42% Mol.-Gew. 300,22
C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Ber. „	63,11	„ 8,83% „ 228,16
	Gef. „	63,54	„ 9,27% „ 266 (in Campher)

Es dürfte sich vielleicht um ein Abbauprodukt handeln. Die kohlenstoffärmere Formel ist nach der tiefen Sublimations-temperatur wahrscheinlicher, wenn sie auch schlechter stimmt, aber noch sehr unsicher.

#### Fraktion C. 17.

Die biologisch stark aktive Fraktion stellt wie C. 16 eine leicht bräunlich gefärbte glasige Masse dar. Sie zeigt eine selektive Absorption im Ultraviolett mit einer Bande bei ca. 240 m $\mu$ . Die Löslichkeiten sind ähnlich wie bei C. 16 (eher leichter löslich). Sie ist optisch aktiv und dreht zum Unterschied von C. 16 rechts.  $[\alpha]_D^{10} = \text{ca.} + 120^{\circ}$  ( $c = 2$  in absolutem Alkohol).

Eine Probe wurde im Hochvakuum bei 56° 1½ Stunden getrocknet (Verlust ca. 5%) und dann analysiert.

3,233 mg Subst.	gaben 8,16 mg CO <sub>2</sub> und 2,44 mg H <sub>2</sub> O		
C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	Ber. C	69,2	H 8,87%
	Gef. „	68,84	„ 8,35%

Die Formel C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> kann natürlich nur einen Durchschnittswert für die Hauptbestandteile bedeuten, denn die Fraktion ist sicher noch ein komplexes Gemisch. Sie ist dagegen frei von Stickstoff, Schwefel, Phosphor und Halogen. Alkalische Silberlösung wird rasch reduziert, dagegen ist die Eisen(III)chlorid-reaktion negativ.

In konzentrierter Lösung von 50-proz. Methanol wird mit Digitonin eine Fällung erhalten. In Essigsäure-anhydrid erzeugt eine Spur konz. Schwefelsäure Färbungen, die ja nach den Bedingungen sehr verschieden sind, sich rasch verändern und wenig charakteristisch sind, da sehr rasch Braunfärbung eintritt. Die Fraktion zeigte bisher keine Neigung, direkt zu krystallisieren. Es wurde daher eine Probe mit Silberoxyd oxydiert.

Oxydation mit Silberoxyd. 300 mg C. 17 wurden in 10 cm<sup>3</sup> Methanol gelöst, mit der Aufschwemmung von gut gewaschenem Silberoxyd aus 5 g Silbernitrat in 10 cm<sup>3</sup> Wasser und unter gutem Schwenken allmählich mit 0,5 bis 1,0 cm<sup>3</sup> 2-n. Sodalösung versetzt, worauf bald Dunkelfärbung des Silberoxyds eintritt. Unter Schütteln wurde noch leicht erwärmt, bis eine Probe der klaren Lösung eben keine merkbare Reduktion gegen alkalische Silberlösung zeigte. Die gegen Phenolphthalein noch alkalisch reagierende Lösung wurde hierauf von Silbersalzen abfiltriert, die letzteren mit wenig Wasser, dann mit Methanol gewaschen und die vereinigten Filtrate nach Sättigung mit Kohlendioxyd im Vakuum auf ein kleines Volum eingengt. Nach Zusatz einer Spur Natronlauge bis zur eben alkalischen Reaktion gegen Phenolphthalein wurden die Neutralbestandteile mit Essigester ausgeschüttelt (117 mg Ausbeute). Zur wässrigen Lösung wurde Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion zugefügt, und die harzig ausfallenden Säuren zunächst mit Äther (gibt 143 mg ätherlösliche Säuren), dann mit Essigester (gibt 45 mg ätherunlösliche Säuren) ausgeschüttelt.

Die 117 mg Neutralkörper (als Fraktion C. 18 bezeichnet) erwiesen sich als biologisch stark aktiv. 0,42 mg pro Tag und Ratte waren wirksam, dagegen 0,21 mg nicht mehr. Ferner konnte daraus die Substanz E isoliert werden. Zu diesem Zwecke wurde mit wenig Aceton verflüssigt und dann mit Toluol versetzt, sodass noch keine bleibende Fällung entstand. Die Krystallisation setzte dann nach wenigen Stunden ein. Nach zweitägigem Stehen wurde abgesaugt, mit wenig Aceton-Toluol, dann noch mit etwas Äther gewaschen. Ausbeute 22,5 mg Rohprodukt Substanz E, die unter dem Mikroskop nicht einheitlich aussahen. Aus den ölig verbliebenen Teilen wurde Semicarbazon hergestellt, das in fast quantitativer Ausbeute erhalten wurde, aber dessen Auftrennung in einheitliche Individuen nicht gelang.

Es zeigt wiederum keine brauchbaren Schmelzpunkte. Als Kontrolle wurden von verschiedenen löslichen Fraktionen Stickstoffbestimmungen ausgeführt, die zwischen 10% für die leichtest löslichen, und ca. 14% für die schwerer löslichen schwanken. Es dürften immer noch Gemische von Mono- und Disemicarbazonen vorliegen.

#### Trennung der ätherlöslichen Säuren.

Zur Trennung der 143 mg Rohprodukt erwies sich die fraktionierte Ausschüttelung mit Kaliumbicarbonat für die Isolierung

eines Vertreters brauchbar. Es wurde dazu die ganze Menge in Äther gelöst und wiederholt mit je 1 cm<sup>3</sup> 1-proz. wässriger Kaliumbicarbonatlösung ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden einzeln mit Salzsäure angesäuert. Der erste lieferte nichts, der zweite bis sechste harzige Fällungen, der siebente bis zwölfte krystalline, die nach Schmelzpunktkontrolle später vereinigt wurden. Weiter war keine Säure mehr mit Bicarbonat auszuziehen. Die harzigen Säuren wurden noch nicht weiter geprüft. Die krystallinen Säuren, zusammen 9 mg, nach Umfällung aus Aceton-Wasser, wurden zur Vorreinigung in Äther gelöst, wodurch eine geringe Menge darin unlöslicher Substanz abgetrennt wurde, dann aus wenig Benzol mit Benzin gefällt (Smp. 197—208°) und hierauf aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Es wurden schöne fächerförmig verwachsene Nadeln erhalten. Ausbeute knapp 5 mg. Smp. 219—224° korr. Leider war wegen der geringen Menge ein weiteres Umkrystallisieren unmöglich.

4,712 mg Subst. verbr. 0,767 cm<sup>3</sup> 0,02-n. Lauge (korr.), was einem Äquivalentgewicht von ca. 306,8 ± 5% entspricht.

Die ca. 0,8 cm<sup>3</sup> Alkohol und eine Spur Phenolphthalein enthaltende Lösung wurde auf 2,532 cm<sup>3</sup> mit Wasser verdünnt und von dieser Lösung die Drehung bestimmt (schlecht sichtbar). Gef.  $\alpha_D^{20} = +0,31^\circ \pm 0,04^\circ$  (im 1-dm Rohr) und +0,60 im 2-dm Rohr. Es ergibt sich ein  $[\alpha]_D^{20} = +166^\circ \pm 20^\circ$  ( $c = 0,1865$  als Na-Salz für freie Säure gerechnet) oder +155° ± 20° auf Na-Salz gerechnet.

Aus der verbleibenden Lösung wurde die Säure regeneriert nach Ausschütteln des Phenolphthaleins mit Äther aus bicarbonat-alkalischer Lösung. Nach Umfällung aus Aceton-Wasser wurden wieder die schönen Nadelchen erhalten, die nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 90° den Smp. 223—226° zeigten (eine Spur schmilzt höher). Sie verloren bei weiterem Trocknen bei 100° und 0,1 mm noch 0,014 mg (2 Stunden) und wurden so verbrannt.

3,204 mg Subst. gaben 8,41 mg CO <sub>2</sub> und 2,46 mg H <sub>2</sub> O	
C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	Ber. C 71,2 H 8,8% Äquiv.-Gew. 320,22
C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	Ber. „ 71,8 „ 9,05% „ 334,24
C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	Ber. „ 72,3 „ 8,5% „ 332,22
	Gef. „ 71,59 „ 8,59% „ ca. 292—322

*Substanz E.* Die oben genannten 22,5 mg Rohprodukt wurden aus Aceton-Wasser umkrystallisiert, wobei sich der Körper langsam in Krystallen abschied, die nicht ganz einheitlich aussahen (Körnchen und wenig Nadeln) und nach dem Trocknen unscharf bei 126—129° schmolzen. Ausbeute 16 mg. Die nicht getrocknete Substanz zeigte unter dem Mikroskop deutliche Zersetzungserscheinungen und noch viel unschärferen Schmelzpunkt, sodass vermutet wird, dass Krystallwasser resp. ein anderes gebundenes Lösungsmittel vorliegt. Die bei gewöhnlicher Temperatur getrocknete Substanz zeigte ein  $[\alpha]_D^{20} = +87 \pm 2^\circ$  ( $c = 0,701$  in absolutem Alkohol). Sie war in der Dosierung von 0,4 mg täglich pro Ratte inaktiv. Aus den oben genannten Gründen wurde vorläufig auf die Verbrennung des freien Ketons

verzichtet und lediglich das Semicarbazon analysiert. Dieses wurde zuerst als amorphes Pulver erhalten, das bei 208—210° schmolz und in wenig Alkohol leicht löslich war. Aus der Lösung krystallisiert es langsam (beim Impfen sofort) in schönen zu kugeligen Drusen vereinigten Kryställchen, die dann in absolutem Alkohol recht schwer löslich sind, bei 280—285° korr. unter Zersetzung schmelzen und merkbar wasserlöslich sind.

2,142 mg Subst. gaben 4,88 mg CO<sub>2</sub> und 1,60 mg H<sub>2</sub>O  
 1,570 mg Subst. gaben 0,139 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (20°, 726 mm)  
 C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub> Ber. C 62,37 H 8,82 N 9,92%  
 Gef. „ 62,14 „ 8,36 „ 9,85%

Es dürfte somit ein Monoketon C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> ± H<sub>2</sub> als wahrscheinlichster Grundkörper vorliegen.

*Fraktion C. 16a.*

Diese Fraktion gab nach Zusatz von Aceton und hierauf Toluol bis fast zur Trübung nach einigen Tagen ebenfalls eine reichliche Krystallabscheidung. Es handelte sich aber nicht um die Substanz A, sondern um ein Gemisch von Verbindungen, die alkalische Silberlösung stark reduzieren. Erhalten wurden 350 mg Rohkrystalle. Diese wurden zunächst mit 20 cm<sup>3</sup> reinem Aceton ausgekocht und der darin schwerlösliche Anteil heiss abgenutscht und gut mit Aceton gewaschen. Es handelt sich zur Hauptsache um Substanz C, die in Aceton sehr schwer löslich ist. Die Mutterlaugen wurden fraktioniert mit Wasser gefällt, teilweise nach leichtem Einengen, ferner fraktioniert aus Aceton mit Äther gefällt und schliesslich fraktioniert aus Aceton unter event. vorsichtigem Zusatz von Äther umkrystallisiert. Es wurden dabei neben weiteren kleinen Mengen von fast reiner Substanz C ein Gemisch von Substanz C und D, sowie weitere Krystallisate erhalten, die noch nicht fertig aufgetrennt wurden. C liess sich leicht durch Krystallisation aus absolutem Alkohol (einengen) vollständig reinigen, da sie viel schwerer löslich ist als die Nebenprodukte. D konnte nur durch mechanisches Aussuchen der wohlausgebildeten klaren Krystallkörner unter der Lupe, von den feinen Nadeln der Substanz C befreit werden. Zum Schluss wurde sie ebenfalls aus wenig absolutem Alkohol umkrystallisiert.

*Substanz C.* Krystallisiert aus absolutem Alkohol, in dem sie recht schwer löslich ist, je nach der Geschwindigkeit etwas verschieden, bei langsamer Abscheidung aber in feinen langen Nadeln, die alkalische Silberlösung rasch und stark reduzieren. Smp. 253—256° korr. unter Zersetzung.  $[\alpha]_D^{20} = +69,8^\circ \pm 2,5^\circ$  ( $c = 0,387$  in absolutem Alkohol). Nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 90° war der Körper nicht hygroskopisch. Er zeigt keine selektive Absorption im Ultraviolett bis 200 m $\mu$ .

4,426 mg Subst. gaben 11,14 mg CO<sub>2</sub> und 3,72 mg H<sub>2</sub>O  
 C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> Ber. C 68,81 H 9,37%  
 Gef. „ 68,65 „ 9,41%

Der Körper ist in Aceton noch schwerer löslich, in Äther und Benzol nur spureweise. Auch Wasser löst schwer. Zum Nachweis, dass es sich um ein Monoketon handelt, wurde das Semicarbazon hergestellt.

Semicarbazon. 9,8 mg Subst. C wurden mit 1,5 cm<sup>3</sup> methylalkoholischer Semicarbazidlösung 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, im Vakuum bei 30° zum Syrup gedampft und dieser mit wenig Wasser gefällt. Das schön pulverige Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen und schmolz bei 220—222° korr. unter Zersetzung. Die Krystallisation erfolgt nicht sehr gut, am besten wie folgt. Man löst in absolutem Alkohol, filtriert, engt im Vakuum zum dünnen Syrup ein. Nach Einsetzen der Krystallisation setzt man etwas frischen Alkohol zu und erwärmt vorsichtig. Die Krystalle sind jetzt schwer löslich in Alkohol. Die kleine Spitzenfraktion zeigte den Smp. 265—267° korr. unter Zersetzung und reichte knapp für eine Stickstoffbestimmung.

0,910 mg Subst. gaben 0,081 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (21°, 723 mm). Gef. N 9,83%

Die Hauptmenge als zweite Fraktion vom Smp. 243—245° korr. unter leichter Zersetzung gab einen ganz ähnlichen Stickstoffgehalt.

1,272 (!) mg Subst. gaben 2,880 mg CO<sub>2</sub> und 1,00 mg H<sub>2</sub>O

2,344 mg Subst. gaben 0,198 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> 20° 723 mm

C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub> Ber. C 62,37 H 8,82 N 9,92%

Gef. „ 63,19 „ 6,99 „ 9,36% und oben 9,83%

Dass die C-H-Werte nicht gut stimmen, ist in Anbetracht der sehr geringen Ein-  
wage und der schwierigen Krystallisierbarkeit kein Wunder. Sie genügen jedoch voll-  
kommen, um die Mono-keton-natur der Substanz C zu beweisen.

*Substanz D.* Der Körper krystallisiert in reiner Form sowohl aus Aceton wie aus absolutem Alkohol (in dem er recht leicht löslich ist) in glasklaren Körnern. Zur Unterscheidung von C ist bisher nur die Betrachtung der Krystalle unter dem Mikroskop geeignet. Der Schmelzpunkt liegt bei ca. 230—238° korr. unter Zersetzung, etwas verschieden je nach Erhitzungsgeschwindigkeit.  $[\alpha]_D^{20} = +66^\circ \pm 1,5^\circ$  (c = 0,865 in absolutem Alkohol). Er reduziert alkalische Silberlösung rasch und stark in der Kälte und ist möglicherweise mit C isomer. Nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 80° nicht hygroskopisch.

3,310 mg Subst. gaben 8,29 mg CO<sub>2</sub> und 2,86 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub> Ber. C 68,41 H 9,87%

C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> Ber. „ 68,81 „ 9,37%

Gef. „ 68,30 „ 9,67%

Zum Nachweis der Mono-keton-natur diene wieder das Semicarbazon. Es ist das bisher beste Semicarbazon der Gruppe und wurde aus 8,75 mg wie das analoge aus C bereitet, das Rohprodukt krystallisierte aber sofort sehr schön aus absolutem Alkohol in feinen

glänzenden Blättchen von dem hohen Smp. 327—329° korr. unter Zersetzung, die bei 100° im Hochvakuum 40 Minuten getrocknet wurden, aber wahrscheinlich noch Krystallwasser enthielten.

1,243 (!) mg Subst. gaben 2,75 mg CO<sub>2</sub> und 1,05 mg H<sub>2</sub>O  
 2,500 mg Subst. gaben 0,225 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> 23° 723 mm

C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> O <sub>5</sub> N <sub>3</sub>	Ber. C	62,37	H	8,82	N	9,92%
C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> O <sub>5</sub> N <sub>3</sub> · H <sub>2</sub> O	Ber. „	59,82	„	8,91	„	9,53%
	Gef. „	60,34	„	9,45	„	9,87%

Die C-H-Werte können wegen der zu kleinen Einwage wiederum nur als Näherungen angesehen werden. Es dürfte wiederum kaum zweifelhaft sein, dass Substanz D ein Monoketon darstellt.

*Fraktion C. 17 a.*

Die Fraktion stellt eine hell-rötlichbräunliche glasige Masse dar mit ähnlichen Löslichkeiten wie die obenerwähnten Fraktionen. Die Absorptionskurve, wie die biologische Aktivität ist im theoretischen Teil erwähnt. Sie reduziert alkalische Silberlösung stark.

Hydrierungsversuch. 200 mg Fraktion C. 17a wurden, in 3 cm<sup>3</sup> Alkohol gelöst, mit 2 cm<sup>3</sup> alkoholischer Nickel-Kieselgelsuspension versetzt, im Rotier-Autoklaven wie bei Substanz A beschrieben, behandelt. Die Maximaltemperatur war 135°, bei dieser betrug der Druck 165 Atm. Nach Erkalten wurde mit reinem Alkohol aufgenommen, filtriert und über einer Spur gewaschener Kohle geklärt. Nach dem Verdampfen des Alkohols und gutem Trocknen verblieben ca. 165 mg fast farbloses glasiges Material, das alkalische Silberlösung in verdünntem Methanol kaum mehr reduzierte. Nach Lösen in wenig Aceton und Zusatz von Toluol bis fast zur Trübung trat nach einiger Zeit Krystallisation ein. Die Krystalle wurden abgenutscht und mit wenig Aceton-Toluol gewaschen. Ausbeute 19 mg Rohprodukt. Smp. ca. 185—204° nach starkem Sintern bei ca. 125° und Wiederfestwerden. Aus wenig absolutem Alkohol wurden feine lange Nadeln erhalten. Unzersetzt im Hochvakuum bei 0,05 mm und ca. 270° Blocktemperatur destillierbar. Der Schmelzpunkt wurde nicht scharf erhalten, sondern lag bei ca. 204—217° korr. ohne Zersetzung.

4,068 mg Subst. gaben 10,63 mg CO<sub>2</sub> und 3,56 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	Ber. C	71,93	H	9,81%
C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Ber. „	71,53	„	10,03%
	Gef. „	71,27	„	9,79%

Von einer Molekulargewichtsbestimmung, die wegen dem ohne Zersetzung erfolgenden Schmelzpunkt möglich wäre, wurde abgesehen, da die Sublimationstemperatur schwer mit einer viel kleineren oder viel grösseren Formel vereinbar wäre, sie passt sehr gut auf diese.



*Isolierung von Substanz G.*

1,96 g der Fraktion C. 17a wurden mit *Girard*-Reagens fraktioniert in vier Teile getrennt. Die genauen Bedingungen werden später bekannt gegeben. Der vierte Teil (252 mg) krystallisierte nach Zusatz von 1 cm<sup>3</sup> 50-proz. Alkohol nach einigen Tagen bei -10°. (Dieser Teil schien auch nach den Löslichkeiten etwas verschieden von den übrigen und war besonders in Äther etc. leichter löslich als diese.) Die Krystalle konnten mit auf -80° vorgekühltem Alkohol am besten abgenutscht werden. In Aceton waren sie erheblich, in Äther ebenfalls viel leichter löslich, als die oben genannten Körper der C<sub>21</sub>-O<sub>5</sub>-Reihe. Aus den Mutterlaugen wurden nach Einengen, Trocknen und langem Ausfrieren aus 1 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol noch weitere Mengen erhalten. Insgesamt 26 mg Rohprodukt, das sich am besten aus absolutem Alkohol event. unter Zusatz von absolutem Äther umkrystallisieren liess. Farblose, oft zu Drusen vereinigte Blättchen vom Smp. 220—223° korr., unzersetzt.  $[\alpha]_D^{20} = +262^{\circ}$  (c = 1 in absolutem Alkohol, was eine leicht übersättigte Lösung darstellt). Die Drehung musste an einem nicht ganz analysereinen Produkt gemessen werden. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 0,05 mm und 190—200° Blocktemperatur sublimiert. Der Körper reduziert alkalische Silberlösung langsam aber deutlich. Eisen(III)chlorid-reaktion negativ. Er ist unlöslich in wässriger Natronlauge, sowie frei von Stickstoff.

3,419 mg Subst. gaben 9,42 mg CO<sub>2</sub> und 2,46 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	Ber. C	75,48	H	7,75%
C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	Ber. „	74,94	„	8,39%
	Gef. „	75,14	„	8,05%

Zum Nachweis der Diketon-natur diente das Di-semicarbazon. Aus 10 mg fast analysereiner Substanz G, wie bei den vorigen bereitet. Das Rohprodukt fiel auf Zusatz von Wasser als gallertige Masse aus, die schwer filtrierbar war. Nach gutem Trocknen krystallisiert es aus wenig wasserfreiem Alkohol in sehr feinen aber deutlichen Kryställchen ohne amorphe Beimischungen. Es zeigt keinen Schmelzpunkt, sondern zersetzt sich bei ca. 270° allmählich unter Dunkelfärbung ohne zu schmelzen, zeigt also darin Ähnlichkeit mit dem anderen Disemicarbazon (Substanz F). Getrocknet wurde es bei 0,2 mm und 100°. Es erwies sich als leicht hygroskopisch, konnte aber gerade noch normal gewogen werden. (Die C-H-Werte sind aber trotzdem als nicht ganz zuverlässig zu betrachten.)

3,570 mg Subst. gaben 7,73 mg CO<sub>2</sub> und 2,27 mg H<sub>2</sub>O

1,300 mg Subst. gaben 0,245 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (20°, 718 mm)

C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> N <sub>6</sub>	Ber. C	59,65	H	7,51	N	20,85%
	Gef. „	59,05	„	7,12	„	20,74%

Der Körper gibt eine starke Absorptionsbande im Ultraviolett bei ca. 235 mμ. Die wahrscheinlichste, aber noch weiter zu sichernde

Formel ist  $C_{18}H_{24}O_3$ , wobei 2 Sauerstoffe als Ketogruppen fungieren und wahrscheinlich zu einer konjugiert eine Doppelbindung vorhanden ist.

*Verseifung des pentanlöslichen Fettes.*

100 g „pentanlösliches Fett“ (alle bei der Ausschüttelung der Pentanlösungen mit 20-proz. Methanol in der oberen Schicht verbliebenen Anteile) wurden in einem Schliffkolben mit der Lösung von 30 g Kaliumhydroxyd, 20 g Wasser und 200 cm<sup>3</sup> Methanol 1 Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde mit 700 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt, mit Salzsäure angesäuert und die Fettsäuren (incl. Cholesterin etc.) mit viel Pentan ausgeschüttelt. Die Pentanlösungen wurden noch dreimal mit 20-proz. Methanol ausgeschüttelt. (Im Pentan verblieben ca. 90 g rohe Fettsäuren incl. pentanlöslich Unverseifbares.) Die vereinigten wässrig-methylalkoholischen Lösungen wurden bis zur knapp lakmussauren Reaktion neutralisiert und im Vakuum auf 50 cm<sup>3</sup> eingengt. Nach Zusatz von konz. Salzsäure bis zur stark kongosauren Reaktion wurde der Salzbrei 10 mal mit je 400 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen wurden sukzessive zur Entsäuerung mit einer kleinen Menge starker Pottaschelösung (immer derselben unter event. Zusatz weiterer Pottasche) durchgeschüttelt. Sie hinterliessen 650 mg Extrakt, die nach Zusatz von etwas Aceton und einer Spur Äther bald nadelige Krystalle abschieden (schwefelhaltiger Körper).

Der wässrige Salzbrei wurde mit der Pottaschelösung vereinigt, und nach Zusatz von starker Pottasche bis zur eben alkalischen Reaktion mit viel Methanol versetzt. Nach dem Abnutschen der Salze wurde die Methanol-lösung im Vakuum völlig zur Trockne gedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen, wodurch weitere Salzreste entfernt wurden. Die alkoholische Lösung hinterliess beim Eindampfen im Vakuum einen Syrup, der bei der Hochvakuumdestillation unter 0,1 mm fast ohne Rückstand bei 130—160° überging (Hauptmenge bis 140°) und aus fast reinem Glycerin bestand. Ausbeute ca. 8,8 g.

*Der schwefelhaltige Körper aus der Verseifung.*

Die oben erwähnten nadeligen Krystalle wurden durch Abnutschen und Nachwaschen mit Aceton-Äther isoliert. Rohausbeute 90 mg vom Smp. 108—111°. Zur Reinigung wurde aus viel Aceton durch Einengen umkrystallisiert. Es wurden farblose Nadeln vom Smp. 113—114,5° korr. erhalten. Eine Probe erwies sich als unzersetzt destillierbar bei 0,1 mm und 150—160° Aussentemperatur. Der Körper ist leicht löslich in Wasser, Alkohol und Methanol, schwer in Aceton, noch schwerer in Äther. Die wässrige Lösung reagiert neutral, gibt keine Eisen(III)chlorid- und auch auf Zusatz von wenig

Alkali keine Nitroprussidreaktion. Alkalische Silberlösung wird nicht reduziert, jedoch wird Kaliumpermanganat auch bei 0° sofort entfärbt. Am wahrscheinlichsten handelt es sich daher um ein aliphatisches Trioxy-sulfid oder um ein Di-oxy-sulfoxyd.

3,351 mg Subst. gaben 4,16 mg CO<sub>2</sub> und 2,12 mg H<sub>2</sub>O

2,550 mg Subst. gaben 4,422 mg BaSO<sub>4</sub>

C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>SO<sub>3</sub> Ber. C 34,85 H 7,30 S 23,14%

Gef. „ 33,86 „ 7,08 „ 23,82

Trotz der schlechten Übereinstimmung der Analysenwerte dürfte wohl kaum eine andere Formel in Betracht kommen. Zum Vergleich wurde das Äthyl-[2-oxy-äthyl]-sulfon<sup>1)</sup> C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>—SO<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH hergestellt und zwar durch Oxydation des entsprechenden Sulfids<sup>2)</sup> mit Kaliumpermanganat bei 0°. Der auf diese Art in guter Ausbeute erhaltene Körper krystallisierte rasch und zeigte den Smp. ca. 35—38° (aus wenig Aceton mit viel Äther), war aber an der Luft zerfließlich. Der Siedepunkt lag ebenfalls bedeutend tiefer als bei der aus Cortin isolierten Substanz, nämlich unter 0,1 mm bei 100—120° Aussen-temperatur, was mit der für die letztere angenommenen Konstitution verträglich wäre. Die wässrige Lösung war gegen Permanganat in der Kälte längere Zeit beständig.

#### *Glycerin-monopalmitat.*

Das früher erwähnte krystalline Nebenprodukt wurde zur Voreinigung in Äther gelöst und mit wässriger Salzsäure, dann mit Wasser gewaschen, getrocknet und von Äther befreit. Der Rückstand wurde zuerst aus Benzin, dann noch dreimal aus Aceton umkrystallisiert, das erste Mal unter Zusatz von etwas Kohle. Der Schmelzpunkt blieb konstant bei 72,5—73°. Der Körper ist im Hochvakuum bei 0,1 mm und ca. 190° (in kleinen Mengen) unzersetzt destillierbar. Bei einem Titrationsversuch erwies er sich als völlig neutral.

3,542 mg Subst. gaben 8,975 mg CO<sub>2</sub> und 11,31 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>19</sub>H<sub>35</sub>O<sub>4</sub> Ber. C 69,03 H 11,60%

Gef. „ 69,07 „ 11,31%

Bei der alkalischen Verseifung wird als pentanlösliche Säure reine Palmitinsäure (Smp. 55—57°, Mischprobe) erhalten.

Die Mikroanalysen wurden von Herrn Dr. M. Furter und Frl. T. Ziegler ausgeführt.

Laboratorium für organische Chemie  
Eidg. Techn. Hochschule Zürich.

<sup>1)</sup> Otto, J. pr. [2] 36, 443 (1887).

<sup>2)</sup> Demuth, V. Meyer, A. 240, 310 (1887).