

L'alcool est additionné de 5% d'acide acétique et de la quantité convenable de réactif *P* (d'ailleurs très variable suivant la richesse en acétone); après une heure de chauffage à reflux, on distille l'alcool au bain-marie. On effectue ensuite une deuxième distillation, après avoir dissous un excès de sodium pour fixer la petite quantité d'acide acétique entraînée et saponifier une trace d'acétate de méthyle, formée pendant le premier temps de l'opération.

Paris, 11, Square de Port Royal.

**136. Über Bestandteile der Nebennieren-Rinde VI¹⁾.
Trennungsmethoden, sowie Isolierung der Substanzen F. a. H und J
von T. Reichstein.
(29. VIII. 36.)**

In der ersten Mitteilung²⁾ dieser Reihe wurde die Isolierung der Substanzen A—G sowie zweier Nebenprodukte beschrieben. Die hier interessierenden Inhaltsstoffe der Nebennieren-Rinde, in deren rohem Gemisch sich das eigentliche Rindenhormon „Cortin“ vorfindet, stellen ein Gemenge stark sauerstoff-beladener Sterin-abkömmlinge dar, die teils recht schwer voneinander zu trennen sind. Für die Trennung wurde in ausgiebigem Masse von dem neuen Keton-reagens von *A. Girard*³⁾ Gebrauch gemacht, das wohl als das bequemste Reagens angesehen werden kann, das heute bekannt ist, welches die Abtrennung von Ketonen aus Gemischen in schonendster Weise gestattet⁴⁾. Die Ausführung dieser wichtigen Stufe wurde früher nur schematisch angedeutet. Da *Girard* seine Methodik in diesem Heft bekanntgibt⁵⁾, so soll im experimentellen Teil auch gleich die Anwendung zur Trennung von Cortin-Konzentraten beschrieben werden.

Trotz der an sich ungünstigen Löslichkeitsverhältnisse gelingt es auch hier, mit Hilfe von *Girard*-Reagens fast quantitative Tren-

¹⁾ V. Mitteilung siehe dieses Heft, S. 979. Die Arbeit wurde wiederum durch grosszügige Unterstützung seitens der *Haco-Gesellschaft*, Gümlingen, und der *N. V. Organon*, Oss, Holland, ermöglicht, denen auch hier der verbindlichste Dank ausgesprochen sei.

²⁾ Helv. 19, 29 (1936).

³⁾ Franz. Patent 767464; C. 1935, I 959. Herr Dr. *A. Girard* hatte die Freundlichkeit, uns nicht nur die Benützung seines Reagens für diesen Zweck zu gestatten, sondern auch seine speziellen Erfahrungen noch vor der Publikation in diesem Heft zur Verfügung zu stellen, wofür ihm nochmals der beste Dank ausgesprochen sei.

⁴⁾ Die Kritik von *Anchol* und *Schoenheimer*, J. Biol. Chem. 114, 539 (1936), ist bei richtiger Anwendung unberechtigt. Die leichte Spaltbarkeit der Zwischenverbindung ist für die schonende Isolierung von Ketonen aus Gemischen gerade von grösstem Vorteil.

⁵⁾ Helv. 19, 1095 (1936).

nungen zu erreichen. Es wurde bereits früher angegeben, dass die „Cortin-Aktivität“¹⁾ sich vollständig in der Ketonfraktion vorfindet.

Mit dem Reagens lassen sich aber weiter auch partielle Trennungen von verschiedenen Ketonen bis zu einem gewissen Grade durchführen, und zwar in zweierlei Art.

Zunächst kann unter milden Bedingungen (Zimmertemperatur) nur der Teil der Ketone herausgeholt werden, der leicht reagiert (A-Ketone); dann werden unter energischeren Bedingungen die verbleibenden, schwer reagierenden Ketone (B-Ketone) abgetrennt. Andererseits kann die Zwischenverbindung aus Keton und *Girard*-Reagens bei verschiedenen p_H gespalten werden und so die A- und B-Ketone noch in verschiedenen Fraktionen (I, II usw.) in Freiheit gesetzt werden. Der Effekt ist etwa der folgende: Gesättigte Ketone reagieren je nach Substitution („sterische Hinderung“) verschieden rasch, Methylketone und wenig gehinderte, z. B. Cholestanon-Typus, sehr rasch, Benzophenon-Typus usw. sehr schwer, die Zwischenverbindung aus den gesättigten Ketonen lässt sich aber meist schon mit schwachen Säuren rasch spalten. Die α, β -ungesättigten Ketone vom Cholestanon-Typus reagieren sehr rasch, werden aber erst bei stark saurer Reaktion aus der Zwischenverbindung freigesetzt²⁾.

Bei der Trennung der Konzentrate ist es nun so, dass die ganze Cortin-Aktivität in die A-Ketone geht und bei der fraktionierten Spaltung in 4 Fraktionen (I—IV) zur Hauptsache in der Fraktion II gefunden wird, die bei mässig saurer Reaktion freigesetzt wird. Fraktion II enthält allerdings nicht nur gesättigte, sondern auch schon einen Teil α, β -ungesättigter Ketone, so dass eine definitive Entscheidung darüber, ob das richtige Cortin (falls es überhaupt nur einen solchen Körper gibt, der diesen Namen verdient) ein gesättigtes oder ein α, β -ungesättigtes Keton³⁾ darstellt, dadurch noch nicht definitiv ermöglicht ist⁴⁾. Trotzdem stellt diese fraktionierte Trennung eine erhebliche Erleichterung bei der Aufarbeitung und bei der Isolierung von Einzelindividuen dar.

Es soll zunächst ein Schema gegeben werden, das unter Verwendung der geschilderten Arbeitsweise gestattet, die früher er-

¹⁾ Mit „Cortin-Aktivität“ ist hier und im Folgenden der Kürze halber nur der positive Ausfall beim *Everse-de-Fréremy*-Test bezeichnet. Definition siehe *Helv.* **19**, 33 (1936).

²⁾ Was für einem Typus Ketone angehören, die schwer reagieren und schwer wieder freigesetzt werden, wurde noch nicht geprüft. Solche befinden sich in den B. II.-Fraktionen.

³⁾ Auch ein speziell gebauter Aldehyd ist nicht ausgeschlossen, während normale Aldehyde aus der Zwischenverbindung mit *Girard*-Reagens nur äusserst schwer freigesetzt werden.

⁴⁾ Die Tatsache, dass auch Fraktion III (genauer C. 17, A. III) noch deutliche, wenn auch geringere Aktivität aufweist, deutet darauf hin, dass wenigstens ein Teil der Aktivität von α, β -ungesättigten Ketonen hervorgerufen wird.

wähnten Substanzen A, C, D, E, G, sowie eine Reihe von weiteren in reproduzierbarer Weise rein zu isolieren. Von den letzteren sollen vorläufig nur die Substanzen F. a., H und J besonders erwähnt werden¹⁾. Ferner wurde die Aufarbeitung der Roh-extrakte auf Konzentrat noch etwas vereinfacht, was ebenfalls genau angegeben werden soll.

Für die erste Anreicherung wurde diesmal direkt von der Permutit-Fraktion²⁾ ausgegangen, da es sich zeigte, dass bei der Behandlung des Trockenrückstandes dieses Anteils mit Wasser ein erheblicher Anteil der Aktivität (ca. 15—20%) in den nicht wasserlöslichen Resten verbleibt³⁾. Der Trockenrückstand der Permutit-Fraktion wurde daher der Verteilung zwischen Pentan und 30-proz. Methanol unterworfen, wobei die ganze Cortin-Aktivität in die wässrige Schicht übergeführt werden kann. Aus dieser wurde nach gehörigem Einengen aus saurer Lösung in Äther getrieben und möglichst von Säuren befreit. Nach genügendem Einengen der Ätherlösung lässt sich nun nach dem Prinzip von *Pfiffner* und *Vars*⁴⁾ durch oftmaliges Ausschütteln die ganze Aktivität in Wasser treiben. Die im Äther verbleibenden Anteile (als „Ätherrest“ bezeichnet) enthalten eine Reihe interessanter Nebenprodukte, die ebenfalls der Trennung mit *Girard*-Reagens unterzogen wurden. Aus der wässrigen Lösung wird nach Einengen und Ansäuern wieder in Äther getrieben und nochmals entsäuert. So wird das Konzentrat C. 13 erhalten, das dem früher so bezeichneten auch in bezug auf Cortin-Aktivität völlig entspricht, nur in einfacherer Weise und in etwas besserer Ausbeute erhalten wird.

Permutitfraktion aus 1000 kg ganzen Rinder-Nebennieren (in 3—4 Portionen verarbeitet), enthaltend ca. 850 g Trockenrückstand, gaben:

740 g Pentanlösliches (fettartig)

10,4 g Ätherrest

15,4 g Fraktion C. 13. Mit 1 Ratteneinheit in 0,8—1,05 mg⁵⁾.

Die Trennung der Fraktion C. 13 mit *Girard*-Reagens vollzieht sich wie folgt:

¹⁾ Die Isolierung von H ist noch nicht immer reproduzierbar.

²⁾ Gewonnen nach *Swingle* und *Pfiffner* (Lit. vgl. *Pfiffner*, *Wintersteiner*, *Vars*, *J. Biol. Chem.* **111**, 585 (1935)). Die Methode von *Swingle* und *Pfiffner* zur Gewinnung von Rohextrakten dürfte als die sicherste gelten, wenn man eine möglichst vollständige Extraktion der Cortin-aktiven Bestandteile erreichen will.

³⁾ Dies konnte durch passende Anreicherung festgestellt werden, da die biologische Bestimmung sonst viel zu ungenau ist. Die Wasserreste wurden für sich der Trennung unterzogen, wobei die oben angegebene Menge eines Konzentrates erhalten wurde, das dieselbe Aktivität und analoge Löslichkeit zeigte wie C. 13.

⁴⁾ *J. Biol. Chem.* **106**, 645 (1934). Vgl. ferner *Pfiffner*, *Wintersteiner*, *Vars*, *J. Biol. Chem.* **111**, 585 (1935).

⁵⁾ Früher waren aus 1000 kg Drüse insgesamt 13,5 g von C. 13. und C. 13. a. gewonnen worden, die ungefähr dieselbe Aktivität zeigten.

Zuerst wird bei Zimmertemperatur behandelt und aus den in Reaktion getretenen Anteilen bei steigender Acidität die vier Fraktionen der „C. 17. A.“-Ketone abgeschieden. Die A-Keton-freien Anteile werden dann in der Hitze behandelt und aus den in Reaktion getretenen Anteilen die „C. 17. B.“-Ketone (in zwei Fraktionen) freigesetzt. Erhalten wurde aus den 15,4 g der Fraktion C. 13:

	Bezeichnung der Fraktion	Acidität bei Freisetzung	Cortinaktivität bei 0,35 mg pro Tag u. Ratte
0,59 g	C. 17. A. I.	Essigsauer bis Lakmus rot	Inaktiv (0 von 5 Tieren positiv)
1,20 g	C. 17. A. II.	Weinsauer bis Kongo grau	Stark positiv (6 von 8 Tieren positiv)
1,96 g	C. 17. A. III.	Salzsauer bis Kongoeben blau	Kaum wirksam (3 von 7 Tieren positiv)
1,00 g	C. 17. A. IV.	Normal-salzsauer	Inaktiv (1 von 5 Tieren positiv)
4,75 g	Total an C. 17-A-Ketonen ¹⁾		
0,88 g	C. 17. B. I.	Eben Kongosauer	Gemisch der B-Ketone
0,66 g	C. 17. B. II.	Normal-salzsauer	Inaktiv bis 2 mg pro Tag und Ratte
1,54 g	Total an B-Ketonen		
6,56 g	C. 16. (Ketonfreies)		Inaktiv auf 2 mg pro Tag und Ratte
2,64 g	Verluste (hauptsächlich wahrscheinlich noch an Säuren, die vorher nicht völlig entfernt wurden).		

Substanz A lässt sich aus der ketonfreien Fraktion C. 16. rasch und in reichlicher Menge (ca. 1,1 g roher Krystalle) gewinnen, wenn man diese in zwei Teilen Aceton löst, ebensoviel Toluol und dann eine kleine Menge Wasser zusetzt. Weitere geringe Mengen aus der Mutterlauge nach Entfernung von Phenolen mit Alkali. Die Konstitutionen ist früher gegeben worden²⁾.

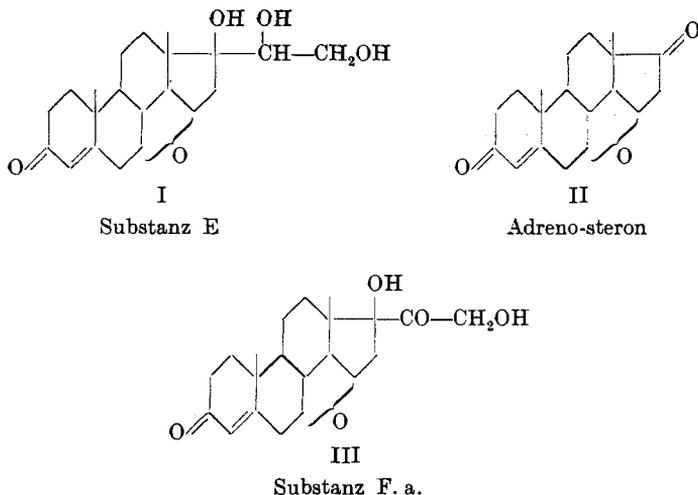
Substanz C und D werden aus den B-Ketonen gewonnen, die ebenfalls aus wenig feuchtem Aceton-Toluol reichlich aber langsam krystallisieren. Das Krystallisat ist ein Gemisch, aus dem die beiden Substanzen auf die früher beschriebene mühsame Art isoliert werden. Die weiter darin enthaltenen Substanzen sind noch nicht rein isoliert. Die voraussichtliche Konstitution ist ebenfalls früher gegeben worden.

¹⁾ Früher waren 5,3 g „Ketonfraktion“ erhalten worden (mit ca. 3 Ratteneinheiten pro mg), die unter etwas energischeren Bedingungen gewonnen, bereits etwas B-Ketone enthalten dürften.

²⁾ IV. Mitteilung Helv. **19**, 402 (1936). Vgl. ferner V. Mitteilung, dieses Heft S. 979.

Substanz E wurde nicht neu bereitet, da der früher angegebene Weg (Oxydation der Begleiter mit Silberoxyd) leicht reproduzierbar ist und die Konstitution mit den verbliebenen Materialresten im Sinne der Teilformel (I) weitgehend wahrscheinlich gemacht werden konnte¹⁾. Es zeigte sich nämlich, dass Substanz E im U.V.-Absorptions-Spektrum eine starke Bande bei ca. 240 $m\mu$ aufweist und somit ein α, β -ungesättigtes Keton darstellt. Dementsprechend erwies sich das früher²⁾ erwähnte Abbauprodukt, das durch Oxydation mit Chromsäure entsteht, als Adrenosteron II³⁾ (Mischprobe, äussere Krystallform). Die Bruttoformel von Substanz E war früher als $C_{21}H_{34}O_5 \pm H_2$ aus dem Semicarbazon errechnet worden, die Unsicherheit war aber wegen der geringen Menge besonders gross. Da dem Adrenosteron mit grösster Wahrscheinlichkeit die Formel $C_{19}H_{24}O_3$ zukommt, so folgt, dass die Formel von Substanz E in $C_{21}H_{30-32}O_5$ abgeändert werden muss, was mit den früher gegebenen Analysen ebenfalls noch verträglich ist.

(Das letzte Sauerstoffatom ist wieder unbestimmt gelassen und durch die Klammer lediglich als vorhanden angedeutet worden.)



U. V.-Absorptions-spektren der Substanzen E, F. a. und H in Alkohol⁴⁾. Es handelt sich wie früher nur um orientierende Messungen, die den Zweck hatten, festzustellen, ob überhaupt eine Bande vorhanden ist und die mit recht geringen Materialmengen ausgeführt wurden (ca. 1 mg). Sie machen daher keinen Anspruch auf Präzision. (Vgl. I. Mitteilung.)

¹⁾ Danach dürfte sie zur Hauptsache in Fraktion C. 17. A. III enthalten sein.

²⁾ Helv. 19, 402, besonders 412 (1936).

³⁾ Helv. 19, 223 (1936).

⁴⁾ Ich verdanke diese wiederum der freundlichen Vermittlung von Herrn Prof. R. Kuhn, Heidelberg.

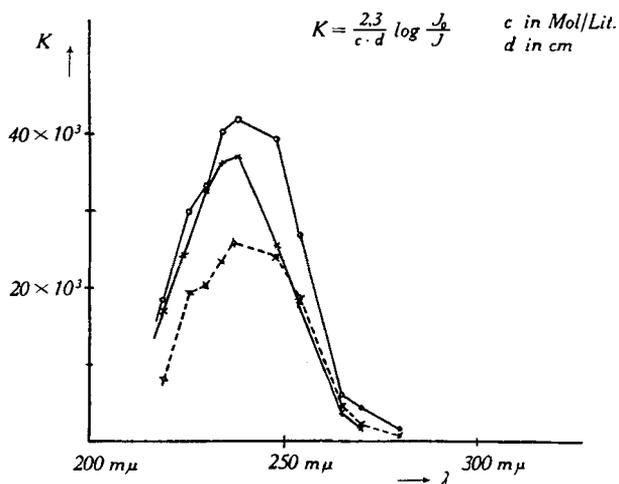


Fig. 1.

- Subst. H $c = 0,565 \times 10^{-3}$ (Für Mol 318 ber.)
- x—x— Subst. F. a. $c = 1,32 \times 10^{-3}$
- ◇—◇— Subst. E $c = 0,504 \times 10^{-3}$
d überall 0,121 cm.

Die Konstitution des Adrenosterons (II) ist zwar bisher erst auf Grund des positiven Ausfalls des Hahnenkammtests aufgestellt worden. Sie hat aber durch die chemische Aufklärung des gesättigten Diketons ($C_{19}H_{28}O_3$ vom Smp. 178° korr.) weiter sehr an Wahrscheinlichkeit gewonnen, und es soll versucht werden, sie durch Hydrierung zu diesem Diketon sicherzustellen¹).

Substanz F. a. In der Fraktion C. 17. A. III. ist auch das α, β -ungesättigte Diketon reichlich enthalten, dessen Disemicarbazon (Substanz F) früher isoliert wurde. Durch die Trennung ist es so weit angereichert, dass es nunmehr leicht gelingt, das freie Diketon selber (als Substanz F. a. bezeichnet) in krystallisiertem Zustand abzuscheiden. Nach den Verbrennungswerten und dem Abbauresultat kommt ihm die Formel $C_{21}H_{28-30}O_5$ zu. Der Schmelzpunkt ist nicht sehr charakteristisch und liegt bei ca. 215° korr. unter Zersetzung, je nach Erhitzungsgeschwindigkeit und Krystallgrösse oft mehrere Grade tiefer oder höher. $[\alpha]_D = \text{ca. } +200^\circ \pm 8^\circ$ (Alkohol). Es zeigt im U.V.-Absorptions-spektrum die typische Bande der α, β -ungesättigten Ketone (vgl. Fig. 1). Charakteristisch ist die Krystallform. Aus Alkohol, auch aus wasserhaltigem, werden schön ausgebildete, rhombisch begrenzte Körner erhalten. Die Krystalle sind nach Mischprobe, äusserer Form und nach Impfprobe beurteilt identisch mit Compound F von Wintersteiner und Pfiffner²) und

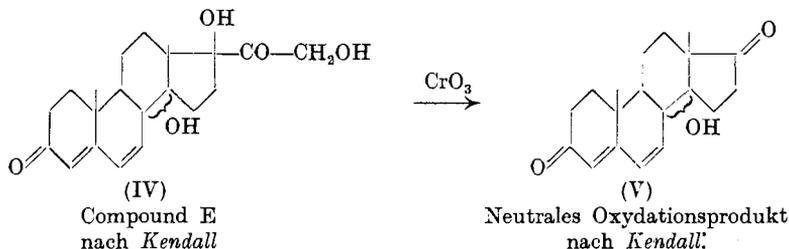
¹) Anm. bei der Korrektur: Dies ist inzwischen geschehen, womit das Kohlenstoff-skelett des Adrenosterons sowie der Substanzen E und Fa als gesichert gelten kann.

²) J. Biol. Chem. 114 (Nr. 1), lxxx (1936), Vortrag in Washington.

geben wie dieses eine intensive grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure¹). Sie dürften vermutlich, auch identisch sein mit Compound E von *Kendall* und Mitarbeitern²). Die Substanz F. a. erwies sich an Ratten beim *Everse-de-Frémercy*-test bei einer Dosierung von 0,8 mg täglich als unwirksam und ebenfalls als unwirksam im Hahnenkamm-test an Kapaunen bei einer Dosierung von 25 γ täglich, bei direktem Aufstreichen auf den Kamm in 0,1 cm³ Öl. (Androsteron-Einheit 0,7 γ .) *Wintersteiner* und *Pfiffner* fanden ihr Compound F an Hunden als unwirksam. *Kendall* und Mitarbeiter geben an, dass ihr Compound E eindeutige Wirkung des Rindenhormons zeigt, z. B. bei *Ingle's Test* an der Ratte³), jedoch quantitativ in weit geringerem Grade als richtiges „Cortin“. Leider sind keine Zahlen angegeben, so dass nicht entschieden werden kann, ob er wesentlich höhere Dosen gespritzt hat als wir von unserer Substanz F. a.

Die Konstitution von Substanz F. a. kann mit grosser Wahrscheinlichkeit durch die oben gegebene Teilformel (III) ausgedrückt werden, die sich daraus ergibt, dass durch Oxydation mit Chromsäure wieder Adrenosteron (II) gebildet wird, das auf diesem Wege sogar noch etwas reiner erhalten wurde als das direkt aus der Drüse isolierte Material. (Selbstverständlich gelten hier dieselben Vorbehalte wie bezüglich der Formel von Substanz E.)

Kendall und Mitarbeiter geben in ihrer letzten Notiz⁴) erstmalig eine provisorische Formel für eine ihrer krystallisierten Substanzen, und zwar für Compound E, nämlich die folgende (IV):



¹) Ausgeführt nach Privatmitteilung von Herrn Prof. *O. Wintersteiner*: Kleinen Krystall auf Objektträger mit Deckglas zerdrücken, einen kleinen Tropfen konz. Schwefelsäure dazwischengeben und auf schwarzer Unterlage beobachten. Nach knapp einer Minute entwickelt sich die Färbung. Das Disemicarbazon gibt dieselbe Reaktion, aber schwächer und erst nach längerem Stehen oder leichtem Wärmen.

²) *Mason, Myers, Kendall*, *J. biol. Chem.* **114** (Nr. 1), lvii (1936), Vortrag in Washington. *J. biol. Chem.* **114**, 613 (1936). *Proc. Staff Meetings Mayo Clinic* **11**, 350 (Sitzung vom 27. Mai 1936).

³) *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* **31**, 163 (1933—34); *Amer. J. Physiol.* **113**, 200 (1935). Bei dem Test wird die Arbeitsfähigkeit adrenaletomierter Ratten gemessen.

⁴) *Mason, Myers, Kendall*, *Proc. Staff Meetings Mayo Clinic* **11**, 350 (Sitzung vom 27. Mai 1936).

Sie stützt sich vor allem auf die Bruttozusammensetzung $C_{21}H_{28}O_5$, die Oxydierbarkeit mit Perjodsäure zu einer Säure $C_{20}H_{26}O_5$ und mit Chromsäure zu einem Diketon $C_{19}H_{24}O_3$ vom Smp. 214—217° unkor. (was mit dem für Adrenosteron 222—224 korr. gefundenen sehr gut übereinstimmt), das eine Kammwachstumswirksamkeit an Kapaunen entfaltet, die ca. $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{8}$ derjenigen von Androsteron beträgt. Die ungesättigte Natur wurde aus dem Spektrum erschlossen, das dem von Androsteron-dion ähnlich ist. Die drei Hydroxyle in (IV) wurden durch *Zerewitinoff*-Bestimmung festgestellt, die zwei Carbonylgruppen durch Verbrauch von *Grignard*-Reagens¹⁾ sowie als Bis-dinitro-phenylhydrazon. Diese Formulierung stimmt weitgehend mit den in der IV. Mitteilung²⁾ für die gesättigten Vertreter der C_{21} — O_5 -Reihe, sowie in der II. Mitteilung³⁾ für Adrenosteron gegebenen Formeln überein. Beim letzteren weicht sie nur darin ab, dass eine weitere Doppelbindung in 6-Stellung angenommen ist, sowie dass das unbestimmte Sauerstoffatom als tertiäres Hydroxyl definiert ist.

Beide Unterschiede scheinen unbegründet. Die zweite Doppelbindung ist äusserst unwahrscheinlich, in dieser Lage sicher falsch, da ein solcher Körper nicht bei 240 $m\mu$, sondern viel langwelliger absorbieren müsste. Die Definition des letzten Sauerstoffatoms als tertiäres Hydroxyl ist nicht genügend gesichert. *Kendall* stützt sich dabei nur auf die *Zerewitinoff*-Bestimmung der Verbindung $C_{21}H_{28}O_5$. Diese Bestimmung, die an sich schon nur mit grösster Vorsicht zur Entscheidung bei so stark sauerstoffhaltigen Verbindungen herangezogen werden kann, ist hier besonders unsicher, wo es sich um ein α, β -ungesättigtes Keton handelt, das durch seine erhöhte Enolisierungstendenz ein weiteres Hydroxyl vortäuschen kann. *Kendall*'s Resultate sind viel besser mit Formel (III) und (II) vereinbar, wobei das letzte Sauerstoffatom noch unbestimmt bleiben muss⁴⁾. Auch die Entstehung einer Säure $C_{20}H_{26}O_5$ durch Oxydation mit Perjodsäure steht in bestem Einklang mit diesen Formeln; sie dürfte die Formel (VI) besitzen⁵⁾.

¹⁾ In einer für Mikrobestimmungen verkleinerten Apparatur nach dem Prinzip von *Kohler* und *Richtmyer*, Am. Soc. 52, 3736 (1930).

²⁾ Helv. 19, 402 (1936).

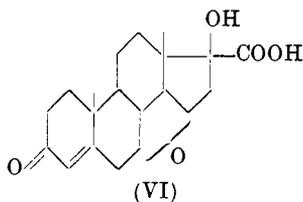
³⁾ Helv. 19, 223 (1936)

⁴⁾ Ein tertiäres Hydroxyl ist nicht ausgeschlossen, nur unbewiesen; wahrscheinlicher ist ein Oxydring.

⁵⁾ Eine analoge Säure haben wir aus Substanz C erhalten (unpubliziert). Dieser Verlauf der Reaktion mit Perjodsäure kann besonders als vorläufige Stütze der Dioxyaceton-Gruppierung der Seitenkette angesehen werden, für deren Vorhandensein ein direkter Beweis bisher nicht vorlag. Dies beruht darauf, dass α -Oxysäuren von Perjodsäure kaum angegriffen werden (vgl. *Clutterbuck*, *Reuter*, Soc. 1935, 1467), während sie von Bleitetracetat rasch zu Keton abgebaut werden. Glycerin-derivate



und vermutlich auch Glycerin-aldehyd-derivate $RR'COH-CHOH-CHO$ geben daher



Substanz H wurde ebenfalls aus Fraktion C. 17. A. III. isoliert. Ein sicher reproduzierbarer Weg ist allerdings noch nicht gefunden. Ist man im Besitz von Impfkristallen, so gelingt die Krystallisation meist, aber nicht immer. Der Stoff ist nämlich sehr löslich in den Lösungsmitteln, die in Betracht kommen. Wenig kalter Alkohol hat sich zur Entfernung des Syrups am besten bewährt. Die Substanz krystallisiert daraus in langen, meist zu Büscheln vereinigten Nadeln. Sie werden bei ca. 80° opak, wobei unter dem Mikroskop deutlich das Entweichen von Lösungsmitteln zu beobachten ist. Bei raschem Erhitzen kann auch partielles Schmelzen und Wiedererstarren eintreten; der eigentliche Schmelzpunkt liegt bei ca. 163—167°, anscheinend ohne Zersetzung. Sie zeigt ein starkes Absorptionsband im U.V. bei ca. 240 m μ (vgl. Figur) und stellt daher, entsprechend dem Isolierungsweg, ein α , β -ungesättigtes Keton dar. Im Hochvakuum scheint sie unzersetzt destillierbar zu sein. Sie gibt dieselbe grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure wie F. a. In Wasser bzw. wässrigem Alkohol löst sie sich leichter als diese. Die Verbrennung einer bei 100° im Hochvakuum getrockneten Probe gab Werte, die auf C₁₉H₂₆O₄ der C₂₃H₃₂O₅ stimmen würden. Das letztere gab Veranlassung zu der Vermutung, dass es sich um ein Kunstprodukt handeln könnte, z. B. einen Enol-äthyl-äther oder ein Äthyl-glucosid von F. a., denen die Formel C₂₃H₃₂₋₃₄O₅ zukäme. Das negative Resultat einer *Zeisel*-Bestimmung spricht jedoch dagegen, so dass die erste Formel wahrscheinlicher ist. Sie muss noch durch Derivate gestützt werden, sobald mehr Material vorhanden ist. Substanz H schmeckt nicht bitter, während F. a. stark bitter schmeckt; alkalische Silberlösung wird von beiden stark reduziert. Die Prüfung auf Cortin-Wirksamkeit ist noch nicht abgeschlossen.

Trennung des Äther-Restes.

Diese wurde ganz analog mit *Girard*-Reagens in A-Ketone, B-Ketone und Keton-freies durchgeführt. Die A-Ketone wurden

sowohl mit Perjodsäure, wie mit Bleitetracetat das Keton RR'CO, während Dioxy-aceton-derivate RR'COH—CO—CH₂OH mit Perjodsäure hauptsächlich die Säure RR'COH—COOH, mit Bleitetracetat jedoch wieder Keton RR'CO liefern. Die Reaktion beginnt offenbar an dem Ende, welches das primäre Hydroxyl trägt. Überschüssige Chromsäure baut natürlich, alle 3 Gruppierungen zu Keton ab.

wieder in vier, die B-Ketone in zwei Fraktionen zerlegt. Das Ketonfreie wurde gleich mit Alkali von Phenolen befreit. Die Trennungen sind hier wegen geringerer Wasserlöslichkeit viel einfacher durchführbar. Folgendes Resultat wurde erhalten. Die 10,38 g „Äther-rest“ gaben

0,36 g	Ä-Rest A. I
1,60 g	Ä-Rest A. II
0,83 g	Ä-Rest A. III
0,58 g	Ä-Rest A. IV
3,37 g	Total an Ä-Rest-A-Ketonen
0,58 g	Ä-Rest-B. I
0,28 g	Ä-Rest-B. II
0,86 g	Total an Ä-Rest-B-Ketonen
5,16 g	Ketonfreier-Ä-Rest
0,99 g	Verluste (wasserlösliche Stoffe und Säuren, beim Entsäuern der Einzelfraktionen verworfen)

Die 5,16 g ketonfreier Ä-Rest gaben nach Trennung mit Alkali:

0,80 g	Phenole (ketonfrei aus Ä-Rest)
3,08 g	Ketonfreier Ä-Rest-phenolfrei.

Entsprechend einem Verlust von 1,28 g (wahrscheinlich zur Hauptsache an Säuren aus leicht verseifbaren Estern).

Angeregt durch die Publikation von *Callow* und *Parkes* (Proc. Physiol. Soc., 14. März 1936, J. Physiol. **87**, 16), welche fanden, dass in gewissen Extrakten von Nebennieren sich oestrogene sowie Stoffe mit Corpus-luteum-Wirkung vorfinden, wurde die Phenolfraktion auf Brunstwirkung an der Maus geprüft. Die Ausführung verdanke ich der Freundlichkeit von Herrn Prof. *E. Laqueur*, Amsterdam. Es zeigte sich, dass der rohen Fraktion in der Tat deutliche Brunstwirkung zukommt. Die Einheit lag bei 220—330 γ . Die Einheiten der drei bekanntesten natürlichen Hormone dieser Gruppe liegen bei der verwendeten Methodik wie folgt: Oestron 0,1 γ , Oestradiol 0,05 γ , Oestratriol 7—10 γ .

In obigem Rohgemisch ist die Anwesenheit von Oestron recht unwahrscheinlich, da es sich um eine ketonfreie Fraktion handelt.

Die meisten der genannten Fraktionen lassen sich teilweise kristallisieren; doch ist die Isolierung der Einzelindividuen noch zu wenig vorgeschritten, so dass darüber später berichtet wird. Aus Ä-Rest A. III und IV lässt sich Adrenosteron gewinnen, daneben noch mindestens zwei weitere Ketone, Substanz K (Nadeln Smp. ca. 175°) und Substanz L (Smp. ca. 255° korr.). Es sei hier nur die Gewinnung von Substanz J erwähnt, da sie offenbar einer Gruppe angehört, die sich von den bisher isolierten etwas unterscheiden.

Substanz J wird leicht aus dem „Ketonfreien Ä-Rest phenolfrei“ als Hydrat abgeschieden, wenn diese Fraktion in Aceton-Toluolmischung gelöst mit etwas Wasser versetzt wird. Ausbeute ca. 10% der Rohfraktion. Der reine Körper kristallisiert aus feuchtem Aceton evtl. nach Zusatz von Äther in prächtigen flachen Nadeln, die meist an beiden Enden doppelseitig zugespitzt sind. Sie werden bei ca. 120° opak unter Wasserverlust und schmelzen bei 216—217° korr. unzersetzt, wobei kurz vorher Umwandlung der Krystalle (in

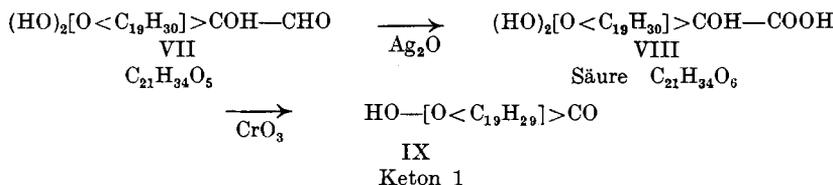
Rhomboeder) beobachtet werden kann, evtl. durch Umsublimation. Die Substanz ist im Hochvakuum unzerstört sublimierbar. Die Verbrennung spricht für die Formel $C_{21}H_{34-36}O_3$. Es handelt sich offenbar um einen (mehrwertigen) Alkohol, da mit Chromsäure ein viel tiefer schmelzendes Neutralprodukt erhalten wird. Die Fällbarkeit mit Digitonin spricht dafür, dass ebenfalls ein Derivat des Cholestanols vorliegt.

Es muss zum Schluss noch auf die ausführliche Publikation von *Mason, Myers* und *Kendall*¹⁾ eingegangen werden. Es wird dort die eingehendste Beschreibung der erhaltenen Krystallisate gegeben, die bisher von diesem Arbeitskreis mitgeteilt wurde. Isoliert wurden:

Compound A. Prismen, Smp. 177—179,5⁰ (unkorr.), $[\alpha]_{5461}^{25} = +347^0$ (Benzol), Zusammensetzung $C_{26}H_{36}O_5$. Oxydation mit CrO_3 gibt die Säure 1 der Zusammensetzung $C_{20}H_{26}O_4$.

Compound B. Nadelrosetten, Smp. 135—139⁰ (unkorr.), Zusammensetzung $C_{24}H_{34-36}O_5$. Oxydation mit CrO_3 gibt möglicherweise Säure 2 der Zusammensetzung $C_{20}H_{28}O_4$.

Compound C. Nicht rein erhalten. Seine Anwesenheit wurde auf Grund von Abbauresultaten an Gemischen erschlossen. Zusammensetzung $C_{21}H_{34}O_5$, die wie folgt aufgelöst wird:



Es soll ein Aldehyd mit drei Hydroxylen und einem Äthersauerstoff vorliegen. Ein tertiäres Hydroxyl soll der Aldehydgruppe benachbart sein, da durch Oxydation mit Ag_2O die Säure 3 (VIII) $C_{21}H_{34}O_6$ entsteht, die durch weitere Oxydation mit CrO_3 unter Wasserabspaltung ein ungesättigtes Keton $C_{20}H_{30}O_3$ (Keton 1, Formel IX) ergibt.

Compound D. Hexagonale Platten aus Aceton, Smp. 214—216⁰ uncorr. $[\alpha]_{5461}^{25} = +29^0$ (Aceton). Formel $C_{20}H_{34-36}O_5$. CrO_3 -Oxydation gibt das Keton 3, $C_{18}H_{24}O_3$. Die Verbindung wird als identisch angesehen mit Compound A von *Wintersteiner* und *Pfiffner* sowie mit meiner Substanz A, worüber kaum ein Zweifel herrschen kann.

Compound E. $C_{21}H_{30}O_5$ resp. $C_{21}H_{28}O_5$ nach der letzten Publikation. Auf diese wurde bereits oben eingegangen.

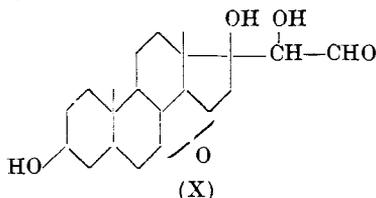
Kendall hebt hervor, dass von diesen fünf Substanzen nur sein Compound D mit Compound A von *Wintersteiner* und *Pfiffner*, sowie mit meiner Substanz A identisch sein dürfte. Ferner weichen seine Abbauresultate und die darauf gegründeten Schlussfolgerungen erheblich von meinen ab. Da dies geeignet ist, in das ohnehin komplizierte Gebiet noch mehr Unsicherheit zu bringen, so sollen einige Resultate kritisch verglichen werden. Dies hat lediglich den Zweck, zu zeigen, dass die experimentellen Daten *Kendall's* in vielen wichtigen Punkten weitgehend mit den hier gefundenen Resultaten in

¹⁾ J. Biol. Chem. 114, 613 (1936).

Einklang stehen, dass sie jedoch hauptsächlich in der Deutung voneinander abweichen¹⁾.

Zunächst übersehen *Kendall* und Mitarbeiter offenbar, dass ihr Compound E als Di-semicarbazon (Subst. F) von mir bereits isoliert wurde. (Inzwischen ist das freie Diketon von *Wintersteiner* und *Pfiffner* (Compound F), sowie hier (als Substanz F. a.) beschrieben, so dass auch dieser Stoff von allen drei Arbeitskreisen erhalten wurde.) Dass ihre Compound A und B bisher von anderer Seite nicht erhalten wurden, liegt voraussichtlich daran, dass sie diese Stoffe aus den leicht in Benzol löslichen Anteilen abgetrennt haben, die ungefähr dem hier als „Äther-Rest“ benannten Gemisch entsprechen, welcher bisher noch nicht eingehend auf Einzelindividuen abgesucht wurde²⁾. Diesem Teil kommt auch keine Cortin-Wirkung zu.

Compound C von *Kendall* kann nicht direkt verglichen werden, da es nicht in Substanz isoliert, sondern nur durch Abbauprodukte charakterisiert ist. Sollte sich die gegebene Teilformel bewahrheiten, so würde diesem Körper ein völlig anderes Skelett zukommen als den bisher in reinem Zustand isolierten Vertretern, was wenig überzeugend ist. Falls wirklich ein Aldehyd vorliegt, so würde die folgende Teilformel (X)



(Klammer deutet Oxydring in nicht definierter Stellung an.)

viel mehr Wahrscheinlichkeit haben. Die Formel gibt zahlreiche Möglichkeiten für Umlagerungen mit Alkalien und mit Säuren, welche die bisherigen Diskrepanzen in den Resultaten verursachen könnten. Sie würde der früher von *Kendall* vertretenen Ansicht, die von mir zitiert wurde³⁾, besser entsprechen als die neuerdings gegebene Formulierung.

¹⁾ Dass die von *Wintersteiner* und *Pfiffner* erhaltenen Substanzen teilweise mit den hier beschriebenen identisch waren, trotz verschiedener Isolierungsmethoden, wurde schon früher hervorgehoben.

²⁾ In einer Bemerkung (S. 629) spricht *Kendall* von der Möglichkeit, dass meine Substanzen C, D und E Gemische darstellen. Das ist natürlich nicht ganz auszuschliessen, jedoch sehr unwahrscheinlich, denn diese Stoffe sind ja nicht nur bis zur weitgehenden Konstanz der Eigenschaften gereinigt, sondern auch durch Derivate (Semicarbazone) charakterisiert, sowie durch Abbau bis auf wenige Einzelheiten in der Konstitution sichergestellt. Substanz E unterscheidet sich von C und D ausserdem sehr scharf durch ihren ungesättigten Charakter (Spektrum) sowie dadurch, dass sie alkalische Silber-salzlösung nicht reduziert. Was die Schwierigkeiten anbelangt, welche die Trennung der Rohkrystallisate verursacht, so soll gerade durch die gegebenen Daten gezeigt werden, wie sie sich teilweise durch geeignete Verwendung von *Girard*-Reagens überwinden lassen.

³⁾ Helv. 19, 32 (1936).

Compound D von *Kendall* ist, wie von ihm hervorgehoben wird, zweifellos identisch mit Compound A von *Wintersteiner* und *Pfiffner* sowie mit meiner Substanz A. Er will diesem Stoff jedoch die Formel $C_{20}H_{34-36}O_5$ zuerteilen, während von mir früher $C_{21}H_{36}O_5 \pm H_2$ aufgestellt und inzwischen durch Abbau $C_{21}H_{34-36}O_5$ gesichert wurde. Seine zu tiefen C-Werte dürften durch die Hygroskopizität verursacht sein. Die durch lange Einwirkung von Mineralsäure erhaltenen Krystalle können für die Entscheidung nicht herangezogen werden, da sie nicht mehr die genuine Substanz, sondern ein Umlagerungsprodukt (evtl. Gemisch) darstellen¹⁾.

Es wurde früher die Arbeitshypothese aufgestellt, dass die hier interessierenden Inhaltsstoffe der Nebennieren-rinde zur Hauptsache die 21-Kohlenstoffatome des Pregnan- bzw. Allo-pregnanskeletts aufweisen. Diese Hypothese hat sich bisher bewährt, mit der Einschränkung, dass offenbar auch Stoffe der 19-Kohlenstoffreihe (Androstan-skelett) frei vorkommen, die also lediglich die Seitenkette nicht enthalten. Die Substanzen A und B von *Kendall* entsprechen zwar dieser Annahme nicht, da ihnen die Formeln $C_{26}H_{36}O_5$ und $C_{24}H_{34-36}O_5$ zugeschrieben werden. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass diese Formeln nach Herstellung von Derivaten noch eine Revision in obigem Sinne erfahren müssen. Der Abbau mit Chromsäure zu den Säuren 1 und 2 ($C_{20}H_{26}O_4$ und $C_{20}H_{28}O_4$) spricht auf jeden Fall sehr für diese Möglichkeit.

Unklar ist schliesslich noch, wem die Verschiedenheit der von *Kendall* durch Abbau erhaltenen drei Ketone 1, 2 und 3 besteht, für die verschiedene Formeln $C_{20}H_{30}O_3$, $C_{19}H_{28}O_3$ und $C_{18}H_{24}O_3$ gegeben werden, während die Schmelzpunkte praktisch identisch sind (159—161° unkor.) und die Analysenresultate nur sehr wenig voneinander abweichen. Nach dem Schmelzpunkt ist übrigens keines der drei Ketone weder mit meinem Oxyketon $C_{19}H_{28-30}O_3$ (Smp. ca. 236° korr.) noch mit dem Diketon $C_{19}H_{26}O_3$ (Smp. 178° korr. also ca. 174° unkor.) identisch. Er kommt jedoch dem als Zwischenprodukt erhaltenen, nicht sicher charakterisierten Diketon $C_{19}H_{28}O_3$ (?) vom Smp. ca. 156° nahe. Möglicherweise handelt es sich aber um ein Umlagerungsprodukt durch Mineralsäure; denn Keton 3 ($C_{18}H_{24}O_3$) soll eine CO-Gruppe sowie ein Hydroxyl enthalten.

¹⁾ Es wurde schon früher mitgeteilt (Helv. 19, 38 (1936)), dass die Verbindung gegen Mineralsäure in der Hitze nicht beständig ist. Die lange Einwirkung in der Kälte nach *Kendall* dürfte dieselbe Wirkung haben. Dies folgt schon aus den viel tieferen Schmelzpunkten der mit Mineralsäure behandelten Proben. Das normale Hydrat verliert sein Krystallwasser, wie früher beschrieben, allmählich unter Opakwerden, dann folgt wahrscheinlich Umwandlung in eine andere Krystallform bei ca. 160°, die nicht mehr hygroskopisch ist. Schmelzen erfolgt erst bei 222° korr. in guter Übereinstimmung mit *Kendall's* Smp. 214—216° unkor. für die nicht mit Säure umgelagerte Substanz.

Experimenteller Teil.

Das alkoholische Permutit-Filtrat aus 250 kg ganzen Rinder-Nebennieren (es soll leicht lakmussauer reagieren) wird filtriert, im Vakuum zur Trockne gedampft und der Rückstand (ca. 225 g) mit 2,5 Liter reinem Pentan in einen grossen Scheidetrichter gespült. Drei weitere kleinere Scheidetrichter werden mit je $\frac{1}{2}$ Liter Pentan beschickt. Man schüttelt 25—30 mal mit je 180 cm³ einer Mischung von 3 Volumen Methanol und 7 Volumen destilliertem Wasser aus, wobei jedesmal ca. 2 cm³ 2-n. Salzsäure zugegeben werden zur Erleichterung der Trennung¹⁾. Die klaren wässrigen (hellbraunen) Auszüge passieren der Reihe nach die drei weiteren Pentanschichten, wo sie durch energisches Schütteln völlig von fettartigen Resten befreit werden. Die vereinigten Pentanlösungen geben nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdestillieren des Pentans ca. 190 g „Pentanlösliches“ (fettartig), das allmählich kristallin erstarrt.

Die wässrigen Auszüge werden mit Soda so weit neutralisiert, dass Kongo nicht mehr gebläut, aber Lakmus noch deutlich gerötet wird, und im Vakuum auf 90 cm³ eingeengt. Der braune Rückstand wird mit Salzsäure bis zur eben rein blauen Reaktion auf Kongo versetzt und 18 mal mit je 350 cm³ frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Jeder Auszug wird zur Entsäuerung in einen zweiten Scheidetrichter übergossen und dort mit 30 cm³ gesättigter Kaliumbicarbonatlösung, der einige cm³ 30-proz. Pottaschelösung zugesetzt werden, energisch geschüttelt. Es wird so viel Pottaschelösung zugegeben, dass die wässrige Schicht nach dem Schütteln Phenolphthaleinpapier eben deutlich rötet. Die Kaliumcarbonat-bicarbonat-schicht wird nicht erneuert, trotzdem sie sich allmählich dunkelbraun färbt, sondern für alle Ätherauszüge wieder verwendet, lediglich nach jeder Schüttelung einer neuen Ätherportion durch Zusatz von Pottasche auf die nötige Alkalität ergänzt. Die entsäuerten, leicht bräunlich gefärbten, zuletzt fast farblosen Ätherlösungen werden sukzessive über Natriumsulfat getrocknet und dann zusammen auf 300 cm³ eingeengt. Hierauf wird in einen Scheidetrichter gespült und 24 mal mit je 100 cm³ destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Die wässrigen Auszüge werden der Reihe nach noch in einem zweiten Scheidetrichter, der 50 cm³ Äther enthält,

¹⁾ Bei Emulsionsbildung gelingt es oft, durch Zugabe von 10 cm³ Salzsäure eine Trennung zu erreichen, sonst muss die Emulsion durch Zentrifugieren getrennt werden, was sehr lästig ist. Das Zentrifugat besteht aus einer klaren wässrigen Schicht, die abgetrennt wird; die aufschwimmenden fetten Anteile werden für sich gut mit 30-proz. Methanol ausgeschüttelt und filtriert. In den zweiten Scheidetrichter sollen nur ganz klare Lösungen kommen. Glatt gelingt die Trennung meist, wenn man weniger Pentan verwendet (ca. 6-fache Menge des Trockenrückstandes, in obigem Fall also ca. 1,4 Liter). Dann muss aber mindestens 40 mal ausgeschüttelt werden, um möglichst alles Hormon zu gewinnen.

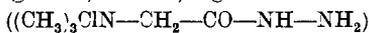
nachgeschüttelt. (Der Äther im ersten Trichter muss ab und zu etwas ergänzt werden.) Die verbleibenden Ätherlösungen geben nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Entfernung des Äthers durch Destillation 2,6 g „Ätherrest“.

Die wässrigen Auszüge werden auf leicht lakmussaure Reaktion eingestellt und im Vakuum auf 90 cm³ eingengt. Nach Zusatz von Salzsäure bis zur eben kongosauren Reaktion wird 16mal mit je 350 cm³ frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt und wie oben mit Kaliumcarbonal-bicarbonat entsäuert. Nach dem Trocknen und Abdestillieren des Äthers, zuletzt im Vakuum, verbleiben ca. 3,9 g Fraktion C. 13. als hellbraune schaumige Masse (nach dem Trocknen im Hochvakuum). Das Produkt enthält die Ratteneinheit in ca. 0,8 bis 1,05 mg.

Trennung von C. 13 mit Girard-Reagens.

Die Ausbeuten sind als Durchschnittswerte von drei Versuchen angegeben, die untereinander wenig variierten. Die Trennung wurde bis zur Ausschüttelung aller A-Ketone mit Äther und Entsäuerung stets an einem Tage durchgeführt, wobei man recht früh beginnen muss, um sie soweit zu Ende zu bringen.

3,9 g Fraktion C. 13 werden in einem geräumigen Rundkolben in 39 cm³ Methanol gelöst, mit 4,3 g *Girard*-Reagens T



und 2,1 cm³ Eisessig versetzt. Nach kurzem Umschwenken tritt klare Lösung ein; es wird verschlossen 1½—2 Stunden stehengelassen. Dann wird mit Kältemischung abgekühlt, mit 33 cm³ 2-n. Sodalösung versetzt und das Methanol durch längeres Evakuieren bei 0° (ca. 30 Minuten) vollständig entfernt. Hierauf wird 8mal mit je 600 cm³ frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Der Äther hinterlässt nach dem Trocknen¹⁾ 2,2 g A-Keton-freies.

Der wässrige Teil wird mit Salzsäure bis zur eben deutlich lakmussauren Reaktion versetzt und 6mal mit je 470 cm³ frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Nach jeder Schüttelung wird kontrolliert, ob die wässrige Phase noch sauer reagiert und, wenn nötig, noch Salzsäure zugetropft. Die Ätherauszüge werden wie oben entsäuert. Sie hinterlassen nach dem Trocknen 168 mg Fraktion C. 17. A. I. (Inaktiv auf 0,35 mg pro Tag und Ratte.)

Die verbleibende wässrige Lösung wird mit Weinsäure versetzt, bis Kongopapier eben grau angefärbt wird (ca. 6,5 cm³ 20-proz. Lösung sind nötig; es fallen dadurch allmählich reichlich feste Salze aus, die nicht weiter stören) und 7mal mit je 470 cm³ Äther ausge-

¹⁾ Das zum Trocknen der leicht trüben Ätherlösungen verwendete Natriumsulfat wird zur Gewinnung kleiner Mengen mitgerissener Reste von Ketonverbindung zum Schluss mit Methanol ausgezogen, der Auszug im Vakuum eingedampft und der Rückstand zum wässrigen Teil gegeben.

schüttelt. Diese werden wie oben entsäuert und hinterlassen nach dem Trocknen 300 g Fraktion C. 17. A. II (stark aktiv auf 0,35 mg, kaum aktiv auf 0,2 mg pro Tag und Ratte).

Die verbleibende wässrige Lösung wurde jeweils über Mittag ca. 1½ Stunden stengelassen und hierauf mit starker Salzsäure versetzt, bis Kongo eben rein blau gefärbt wird, und wie oben 7 mal mit je 470 cm³ Äther ausgeschüttelt. Dieser hinterlässt nach dem Entsäuern und Trocknen 490 mg Fraktion C. 17. A. III. (Kaum aktiv auf 0,35 mg, inaktiv auf 0,2 mg pro Tag und Ratte.)

Die verbleibende wässrige Lösung wurde mit $\frac{1}{10}$ Volum konz. Salzsäure versetzt und 6 mal mit je 470 cm³ Äther ausgeschüttelt. Entsäuert und getrocknet hinterliess sie 250 mg Fraktion C. 17. A. IV. (Inaktiv auf 0,35 mg pro Tag und Ratte.)

Die verbleibende wässrige Lösung wurde verworfen. Nach Zugabe von noch mehr Salzsäure und leichtem Wärmen lassen sich daraus nur noch ganz geringe Substanzmengen mit Äther ausschütteln.

Die 2,2 g A-Keton-freies werden in 22 cm³ Methanol gelöst, mit 2,4 g *Girard*-Reagens T und 1,2 cm³ Eisessig versetzt und ½ Stunde unter Rückfluss gekocht. Dann wird unter starker Kühlung mit 21 cm³ 2-n. Sodalösung versetzt, der Methylalkohol im Vakuum entfernt und 8 mal mit je 600 cm³ Äther (frisch destilliert) ausgeschüttelt. Die getrocknete Ätherlösung hinterliess 1,64 g Fraktion C. 16 (Keton-freies).

Der wässrige Teil wurde mit Salzsäure bis zur knapp kongo-sauren Reaktion versetzt und 5 mal mit je 400 cm³ Äther ausgeschüttelt. Nach dem Entsäuern und Trocknen hinterliess er 220 mg Fraktion C. 17. B. I.

Der wässrige Rückstand wurde mit $\frac{1}{10}$ Volum konz. Salzsäure versetzt und 5 mal mit je 450 cm³ Äther ausgeschüttelt. Nach dem Entsäuern und Trocknen wurden 165 mg Fraktion C. 17. B. II erhalten.

Ein Gemisch der zwei Ketonfraktionen C. 17. B. I. und C. 17. B. II. in gleichem Verhältnis, wie sie gewonnen wurden, war inaktiv auf 2 mg pro Tag und Ratte.

Trennung des „Ätherrestes“ mit Girard-Reagens.

Diese wurde ganz analog durchgeführt, nur dass jeweils zum Ausschütteln viel weniger Äther (immer nur frisch destilliert verwendet) genommen wurde, nämlich ca. $\frac{1}{4}$ der oben angegebenen Mengen. Die Entsäuerung wurde auch jeweils zweimal mit Pottaschelösung vorgenommen. Die Ausbeuten sind bereits im theoretischen Teil angegeben. Die meisten der erhaltenen Fraktionen krystallisieren schon spontan oder auf Zusatz geeigneter Lösungsmittel. Die Isolierung der Einzelindividuen wird später mitgeteilt. Der aus 10,38 g „Ä-Rest“ (aus 1000 kg Drüse) erhaltene „ketonfreie Ä-Rest“

(5,16 g) wurde hier auch sofort durch erschöpfendes Ausschütteln mit eiskalter, ca. normaler Natronlauge von Phenolen befreit. Aus den alkalischen Auszügen wurden die Phenole mit Salzsäure in Freiheit gesetzt, mit Äther aufgenommen und mit Soda entsäuert. Erhalten wurden 3,08 g „Phenolfreier, ketonfreier Ä-Rest“, sowie 0,8 g Phenole (ketonfrei aus Ä-Rest), was einem Verlust von 1,28 g entspricht.

Die Phenole geben grüne Eisen(III)chlorid-Reaktion, die auf Zusatz von wenig Alkali in Rot umschlägt. Sie stellen ein kompliziertes Gemisch dar. Durch fraktionierte Destillation lässt sich in kleiner Menge ein krystallisierter Anteil gewinnen, der dieselbe Brenzcatechinreaktion gibt. Die oestrogene Wirksamkeit der Rohfraktion wurde bereits erwähnt.

Isolierung von Substanz A. 6,56 g Fraktion C. 16 (ketonfrei aus 1000 kg Drüse) werden in 10 cm³ Aceton gelöst, mit 7 cm³ Toluol und hierauf mit 0,6 cm³ Wasser versetzt, das sich beim Umschütteln fast ganz löst. Die Krystallisation setzt fast sofort ein und wird durch Stehen über Nacht vervollständigt. Hierauf wird abgenutscht, mit Aceton-Toluol, wenig reinem Aceton, Aceton-Äther, dann mit Äther gewaschen. Ausbeute 1,1 g rohe Substanz A, die wie früher beschrieben gereinigt wird. Die öligen Mutterlaugen werden im Vakuum von Lösungsmittel befreit und der Rückstand (ca. 5,46 g) zur Entfernung von Phenolen mit überschüssiger wässriger Natronlauge aufgeschüttelt und 10mal mit je 500 cm³ Äther ausgeschüttelt. Erhalten wurden 3,1 g Fraktion C. 16 phenolfrei, aus der noch ca. 0,2 g Substanz A wie oben auskrystallisiert werden konnten. Aus der alkalischen Lösung wurden die „Phenole aus C. 16“ gewonnen.

Die Ketonfraktionen C. 17. B. I und II liefern ca. 25% ihres Gewichtes an Krystallen, wenn sie wie oben mit wenig Aceton-Toluol und einer Spur Wasser mehrere Tage verschlossen stehengelassen werden (schneller beim Impfen). Die Trennung der Rohkrystalle ist mühsam, bisher wurden nur die bereits beschriebenen Ketone: Substanz C und D daraus rein abgeschieden. Weitere Komponenten, die in Aceton leichter löslich sind, wurden noch nicht rein erhalten.

Substanz H. Dies ist die einzige der beschriebenen Substanzen, für die ein sicher reproduzierbarer Weg noch nicht angegeben werden kann, wahrscheinlich wegen der grossen Löslichkeit.

Die Ketofraktionen C. 17. A. III. wurden im Hochvakuum getrocknet und mit dem halben Gewicht absoluten Alkohols verflüssigt gut verschlossen stehengelassen. Eine Probe krystallisierte spontan über Nacht unter Abscheidung strahliger Nadelbüschel. Durch Impfen konnten die meisten anderen Proben, nicht alle, zur Krystallisation angeregt werden. Es wurde auf *Willstätter*-Nagel

abgenutzt, mit wenig kaltem Alkohol, dann mit Alkohol-Äther, Benzol und Äther gewaschen. Das Rohprodukt stellte fast farblose Nadeln dar, die beim Erwärmen gegen 80° opak wurden und bei 160—167° schmolzen. Zur Reinigung wurde aus wenig Alkohol umkrystallisiert und wie oben gewaschen. Die farblosen Nadeln werden bei ca. 80° opak, wobei unter dem Mikroskop deutlich das Entweichen von Lösungsmittel zu beobachten ist; bei raschem Erhitzen kann teilweises Schmelzen und Wiedererstarren eintreten. Der Schmelzpunkt blieb nicht ganz scharf bei 163—167° korr., anscheinend ohne weitere Zersetzung. Die Substanz scheint im Hochvakuum auch unzersetzt sublimierbar zu sein. $[\alpha]_D^{19} = +205^{\circ} \pm 3^{\circ}$ ($c = 0,92$ in abs. Alkohol). Die Substanz ist leicht löslich in Alkohol, Aceton, Chloroform und wässrigem Alkohol. Sie gibt mit konz. Schwefelsäure dieselbe grüne Fluoreszenzreaktion wie F. a., schmeckt aber zum Unterschied von der letzteren nicht bitter. Zur Analyse wurde 1 Stunde bei 100—105° und 0,1 mm getrocknet. Die Probe war dann nicht hygroskopisch.

3,875 mg Subst. gaben 10,12 mg CO ₂ und 2,89 mg H ₂ O	
C ₁₉ H ₂₆ O ₄ (318,21)	Ber. C 71,55 H 8,24%
C ₂₂ H ₃₂ O ₅ (388,26)	Ber. „ 71,09 „ 8,32%
	Gef. „ 71,22 „ 8,34%

Das Absorptionsspektrum ist im theoretischen Teil wiedergegeben. Eine Zeisel-Bestimmung gab ein ganz negatives Resultat. Alkalische Silberlösung wird stark reduziert.

Substanz F. a. Diese wird aus derselben Ketonfraktion C. 17. A. III., sowie aus C. 17. A. IV. gewonnen. Am einfachsten beschafft man sich Impfkristalle, wenn man die im Vakuum schaumig getrocknete Fraktion in 2—3 Teilen Chloroform löst und dies langsam eindunsten lässt. (Dies Verfahren ist von *Wintersteiner* und *Pfiffner*¹⁾ angegeben worden.) Nach längstens 2 Tagen ist reichliche Krystallisation eingetreten. Man verdünnt mit etwas Chloroform, saugt ab, wäscht mit demselben Lösungsmittel, dann mit Äther nach. Das nadelige Rohprodukt wird aus Alkohol evtl. unter Zusatz von Wasser umkrystallisiert. Ist man im Besitz von Impfkristallen, so gelingt die Isolierung auch leicht, wenn man die getrocknete Fraktion mit dem halben Gewicht abs. Alkohol verflüssigt und beimpft stehen lässt. Dies hat den Vorteil, dass die Mutterlaugen sich weniger stark braun färben als mit Chloroform. Die Ausbeute ist etwas weniger gut; man kann sie aber steigern durch vorsichtigen Wasserzusatz zur alkoholischen Lösung und längeres Stehen bei 0°. Ausbeute ca. 10—15% der Rohfraktionen.

Zur Analyse wurde nochmals aus abs. Alkohol umkrystallisiert, mit Alkohol-Äther, dann mit Äther gewaschen, wobei schön aus-

¹⁾ J. Biol. Chem. 111, 599 (1935).

gebildete, rhombisch (anscheinend gleichseitig) begrenzte Körner erhalten werden. Sie wurden 45 Minuten bei 100° und 0,1 mm getrocknet und waren dann nicht hygroskopisch.

3,413 mg Subst. gaben 8,72 mg CO ₂ und 2,50 mg H ₂ O		
C ₂₁ H ₃₀ O ₅ (362,24)	Ber. C	69,57
	H	8,35%
C ₂₁ H ₂₈ O ₅ (360,22)	Ber. „	69,96
	„	7,84%
	Gef. „	69,68
	„	8,20%

Der Schmelzpunkt liegt bei ca. 215° korr. unter Zersetzung und ist stark abhängig von der Erhitzungsgeschwindigkeit, sowie von der Intensität des vorhergehenden Verreibens. $[\alpha]_D^{25} = \text{ca. } +200^\circ \pm 8^\circ$ ($c = 1,1$ in abs. Alkohol). Die Substanz schmeckt bitter und gibt die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure. Alkalische Silbersalzlösung wird stark reduziert. Im *Everse-de-Fréremy*-Test erwies sie sich bis zu 0,8 mg pro Tag und Ratte als inaktiv. Ebenso war sie unwirksam beim Hahnenkammtest (Schmiertest) bis zu 25 $\gamma/0,1 \text{ cm}^3$ Öl täglich (Androsteron-Einheit 0,7 γ).

Oxydation zu Adrenosteron.

20 mg Substanz F. a. wurden in 2 cm³ Eisessig gelöst und mit 2,5 cm³ 1-proz. Chromtrioxyd-Eisessig-Lösung (= 25 mg CrO₃) versetzt. Es fiel wieder eine braune Fällung aus, die allmählich in Lösung ging. Nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur (22°) wurde mit Wasser versetzt, der Chromsäureüberschuss durch eine Spur Bisulfit zerstört und die Mischung im Vakuum fast zur Trockne gedampft. Nach Zusatz von Wasser wurde mit Äther ausgeschüttelt und dieser mit verdünnter Lauge entsäuert. Aus der Lauge fiel beim Ansäuern nur eine Spur organischer Säure aus. Der Neutralteil krystallisierte beim Einengen der getrockneten Ätherlösung und Zusatz von Pentan in schönen Blättchen. Ausbeute 8 mg, Smp. 222 bis 224° korr. Eine Probe wurde noch aus abs. Alkohol umkrystallisiert, wobei meist achteckige Blättchen erhalten wurden, die oft fast quadratischen Habitus zeigten mit unter 45° abgeschnittenen Ecken. Der Schmelzpunkt war unverändert. Die Mischprobe mit Adrenosteron, das ganz analog krystallisiert, zeigte keine Depression. Aus der ersten Mutterlauge wurde noch eine Spur Nadelbüschel erhalten, die etwas tiefer und unschärfer schmolzen¹⁾.

Eine Probe der Substanz F. a. wurde auch mit Bleitetraacetat (ca. 2,5 Mol) in Eisessig bei 50° (2 Stunden) oxydiert. Der Neutralteil krystallisierte aus Alkohol in Nadeln vom Smp. 206—215° und wurde noch nicht weiter untersucht.

Identifizierung des Oxydationsproduktes von Substanz E mit Chromsäure als Adrenosteron.

Es lag von früher ca. 1 mg des neutralen Oxydationsproduktes vor, das aus Äther umkrystallisiert wurde. Es wurden schöne Blättchen vom Smp. 211—216° korr. erhalten. Da die Menge für eine

¹⁾ Vgl. Fussnote 1, S. 1126.

völlige Reinigung nicht ausreichte, wurde die Mischprobe mit einem Präparat von Adrenosteron ausgeführt, das ebenfalls nicht ganz rein war und bei 211—217° schmolz. Die Mischprobe zeigte denselben Smp. 211—217°. (Schmelzpunkte gelten für stark verriebenes Material, vgl. ¹.)

Substanz J. Der „phenol- und ketonfreie Ä-Rest“ wird mit demselben Volum Aceton verflüssigt, mit 2 Volum Toluol und ca. 0,1 Teilen Wasser versetzt. Nach Stehen über Nacht (beim Impfen sofort) scheiden sich reichliche Krystallmengen ab, die, abgesaugt, mit Aceton-Toluol, dann mit wenig reinem Aceton und schliesslich mit Äther gewaschen werden. Ausbeute ca. 10—15% der Rohfraktion. Schmelzpunkt roh ca. 200—205° nach Opakwerden bei ca. 120°. Zur Reinigung wurde die ganze Menge zunächst im Molekularkolben im Hochvakuum (0,02 mm) sublimiert (Badtemp. ca. 170°, im Röhrchen sublimiert die Substanz sehr langsam bei ca. 200° Blocktemperatur), dann aus feuchtem Aceton durch Einengen umkrystallisiert. Es wurden lange flache Nadeln erhalten, die an den Enden schief abgeschnitten sind. Aus den Mutterlaugen nach Ätherzusatz noch reichliche Mengen als sehr feine wollige Nadeln. Die Krystalle werden beim Erhitzen bei 120—130° opak und schmelzen bei 216—217° korr. Kurz vorher kann unter dem Mikroskop Umwandlung in Rhomben beobachtet werden, wahrscheinlich durch Umsublimation. Zur Analyse wurde im Hochvakuum sublimiert, die Substanz ist dann nicht besonders hygroskopisch.

2,970 mg Subst. gaben 8,15 mg CO₂ und 2,90 mg H₂O

C ₂₁ H ₃₄ O ₃ (334,27)	Ber. C 75,39	H 10,28%
C ₂₁ H ₃₆ O ₃ (336,29)	Ber. „ 75,00	„ 10,81%
	Gef. „ 74,83	„ 10,92%

Mit 1-proz. Digitoninlösung in 90-proz. Alkohol tritt nach kurzer Zeit eine, auch beim Erwärmen schwer lösliche Fällung auf. Eine Probe (11 mg) der Substanz J wurde in Eisessig mit Chromsäure (15 mg CrO₃) bei Zimmertemperatur oxydiert (2 Tage). Die zuerst ausfallende orange Fällung ging schon nach wenigen Minuten in Lösung. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde ein leicht ätherlösliches Neutralprodukt erhalten vom Smp. ca. 126°. Es krystallisiert aus ätherhaltigem Pentan oder wässrigem Methanol.

Die Analysen wurden von H. Gysel ausgeführt.

Hahnenkammteste, sowie Prüfung auf Brunstwirkung an der Maus verdanke ich der Freundlichkeit von Herrn Prof. E. Laqueur, Amsterdam, die Durchführung der Everse-de Frémery-Teste den Herren Dr. de Frémery und Spanhoff im Laboratorium der N. V. Organon, Oss.

Laboratorium für organische Chemie, Eidg. Techn.
Hochschule Zürich.

¹) Der Schmelzpunkt des Adrenosterons ist stark von der Art des vorherigen Verreibens abhängig. Sehr stark verriebene Proben schmolzen unter dem Mikroskop (Kofler'scher Block) schon bei 215—220° korr., die wiedererstartete Schmelze bei 214 bis 218° korr.