

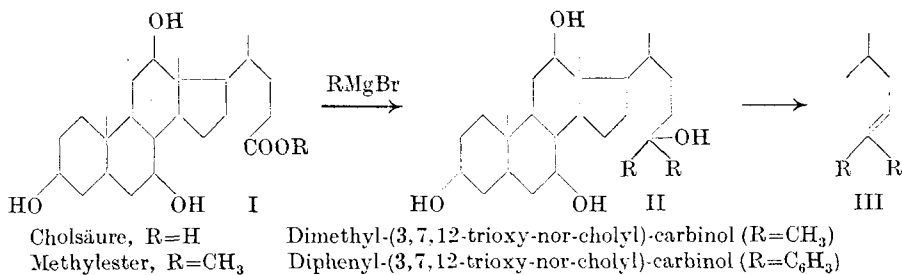
1. Abbau der Cholsäure zu 3,7,12-Trioxo-pregnan-20-on

von H. Morsman, M. Steiger und T. Reichstein.

(21. XI. 36.)

Im Zusammenhang mit Arbeiten über Bestandteile der Nebennieren-Rinde wurde vor einiger Zeit Cholsäure (I, R = H) stufenweise zum 3,7,12-Trioxo-pregnan-20-on (XIV) abgebaut, da dieser Stoff dasselbe Kohlenstoffskelett und eine ähnliche Sauerstoffbelastung besitzt wie verschiedene aus Nebennieren isolierte Verbindungen. Er sollte noch weiteren Umformungen unterzogen werden. Da die ersten beiden Stufen des Cholsäure-Abbaus, die zur Bis-nor-cholsäure (X) führen, soeben auf ganz analogem Wege von Shimizu und Kazuno¹⁾ durchgeführt wurden, sollen die bisherigen Resultate hiermit bekanntgegeben werden.

Der Abbau wurde nach der bekannten Methode von Barbier und Loquin²⁾ durchgeführt, die von Wieland, Schlichting und Jacobi³⁾ für den Abbau von Cholansäure ausgearbeitet und inzwischen häufig benützt wurde. Dass auch Cholansäure-Derivate mit einer Hydroxylgruppe in acetylierter Form analog abgebaut werden können, ist vor kurzem von Dalmer, Werder, Honigmann und Heyns⁴⁾, sowie von Reindel und Niederländer⁵⁾ gezeigt worden. Im Falle der Cholsäure müssen drei Hydroxyle durch die ganze Reaktionsfolge mitgeschleppt werden, was natürlich eine weitere erhebliche Erschwerung bedeutet. Es ist daher bemerkenswert, dass trotzdem noch ganz erträgliche Ausbeuten erhalten wurden. Bis auf die letzte Stufe wurde jeweils sowohl Methyl- wie Phenyl-magnesium-bromid angewendet. Ein wesentlicher Unterschied in den Ausbeuten wurde nicht beobachtet, lediglich in der Krystallisierbarkeit zeigten sich die Methyl-derivate meist stark überlegen.



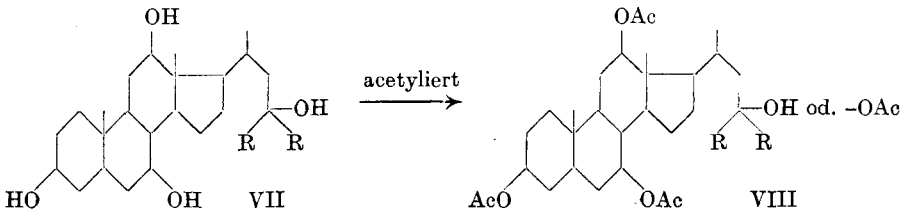
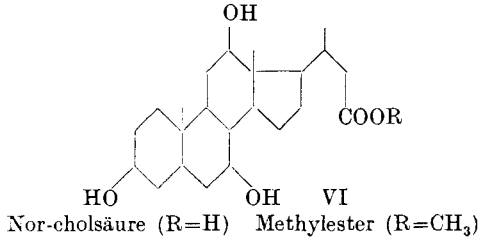
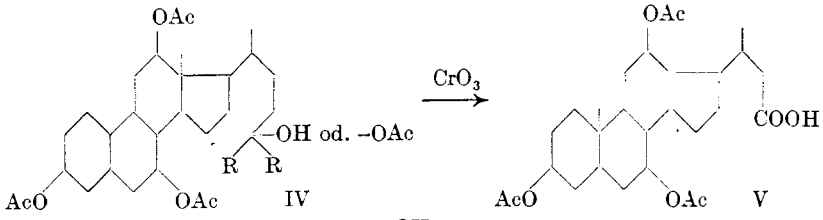
¹⁾ Z. physiol. Ch. **244**, 167 (1936).

²⁾ C. r. **156**, 1443 (1913), vgl. *Bouvet*, Bl. [4] **17**, 202 (1915).

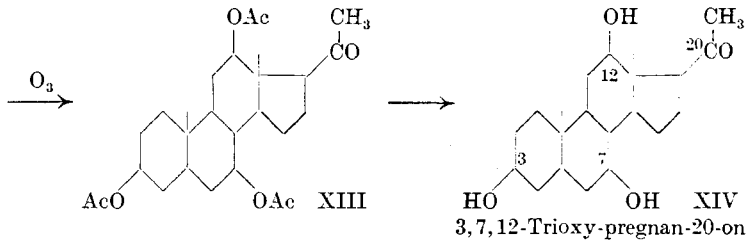
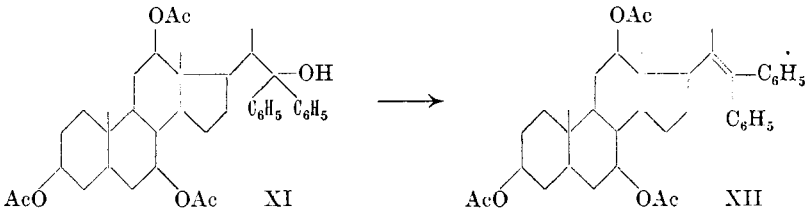
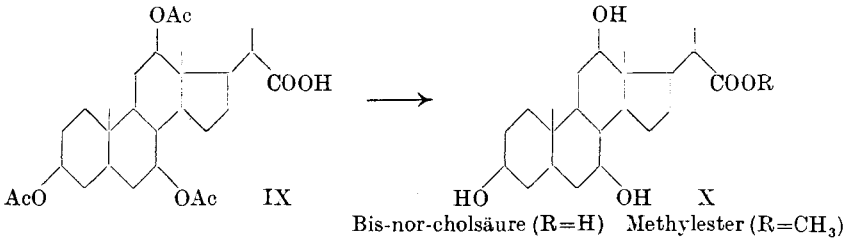
³⁾ Z. physiol. Ch. **161**, 80 (1926).

⁴⁾ B. **68**, 1814 (1935).

⁵⁾ B. **68**, 1969 (1935).



Dimethyl-(3,7,12-trioxy-bis-nor-choly)-carbinol (R=CH₃)
 Diphenyl-(3,7,12-trioxy-bis-nor-choly)-carbinol (R=C₆H₅)



Experimenteller Teil.

*Cholsäure-methylester*¹⁾.

In geringer Modifikation der Vorschrift von *Werder*²⁾ wurden 200 g Cholsäure in 1,2 Liter Methanol aufgeschwemmt und 15 Minuten ein kräftiger Strom von Salzsäuregas eingeleitet, wobei die Krystalle fast in Lösung gehen und die Mischung ins Sieden gerät. Hierauf wurde noch $\frac{1}{4}$ Stunde unter Rückfluss gekocht und nach dem Erkalten unter Rühren in eine Mischung von 5 Liter Eiswasser und 1,6 Liter n. Sodalösung einlaufen gelassen. Das Ganze wurde in einem grossen Scheidetrichter viermal mit Äther ausgezogen, die Ätherlösung mit eiskalter Lauge, dann mit Wasser gewaschen, getrocknet und durch Destillation von Äther befreit. Der Rückstand wurde aus ca. 800 cm³ Methanol umkrystallisiert. Ausbeute 171,2 g vom Smp. 156—158° korr., aus den Mutterlaugen durch Einengen noch 26,3 g, als Hydrat; dieses schmilzt bei ca. 110—115° oft unvollständig, erstarrt wieder und schmilzt dann wieder bei 155—157° korr.

Dimethyl-3,7,12-trioxy-nor-cholyl-carbinol (II, R = CH₃)³⁾.

Bei grossen Ansätzen ist Methyl-bromid dem meist verwendeten Jodid überlegen. Es wurde wie folgt gearbeitet: In einem Rundkolben von 2 Liter Inhalt mit aufgeschliffenem Rückflusskühler wurden 25 g mit etwas Jod aktivierte Magnesiumspähne mit 400 cm³ absolutem Äther bedeckt und ein Jodkrystall ohne zu schütteln zugegeben. Hierauf wurde der Kühler mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen versehen. Die eine Öffnung schloss ein Calciumchloridrohr, durch die andere wurde ein Gaseinleitungsrohr bis auf den Boden des Kolbens geführt. Durch dieses wurde nun Methylbromid eingeleitet, das zum Trocknen eine Gaswaschflasche mit konzentrierter Schwefelsäure passierte. Zuerst muss langsam eingeleitet werden, bis die Reaktion in Gang kommt, hierauf reguliert man so, dass der siedende Äther noch gut kondensiert wird. Im ganzen sind ca. 105 g Methylbromid nötig, um das Magnesium bis auf geringe Reste in Lösung zu bringen. Hierauf wird eine Lösung von 45 g trockenem Cholsäure-methylester in 200 cm³ heissem absolutem Benzol unter Umschwenken innert 10 Minuten durch den Kühler zufließen gelassen, wobei der Äther weiter selbsttätig im Sieden bleibt und ein ziemlich dicker Brei entsteht, der noch 6 Stunden auf dem Wasserbad unter Rückfluss erhitzt wird. Das Reaktionsprodukt wird hierauf in eine Mischung von 1 kg Eis und 120 cm³ konz. Salzsäure unter Rühren eingegossen und im Scheidetrichter mit Essigester, dann mit Äther ausgeschüttelt. (Bei Verwendung von Äther allein scheidet sich das sehr schwer lösliche Hydrat des Carbinols als unlösliche Masse aus.) Die Essigesterlösungen werden mit verdünnter Salzsäure, dann mit Soda und Eis neutral gewaschen, mit Wasser gewaschen, mit Sulfat getrocknet und durch Destillation zuletzt im Vakuum vollständig von Lösungsmitteln befreit. Der trockene Rückstand wird in 100 cm³ Methanol gelöst, mit 10 g festem Kaliumhydroxyd in 50 cm³ Wasser versetzt und zur Verseifung 1 Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach Zusatz von 50 cm³ Wasser wurde das Methanol im Vakuum entfernt, und der Rückstand nach Zusatz von Eis mit Essigester ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschene und mit Sulfat getrocknete Lösung wurde durch Destillation, zuletzt im Vakuum, vollständig vom Lösungsmittel befreit und im Vakuum gut getrocknet. Der Rückstand wurde aus der 2 $\frac{1}{2}$ -fachen Menge (ca. 125 cm³) trockenem Methanol umkrystallisiert, wodurch die Hauptmenge (25 g) gleich in wasserfreier Form vom Smp. 184—185° korr. erhalten wurde. Aus der Mutterlauge wurden durch Eindampfen und Zusatz von Aceton noch 15 g als Hydrat gefasst; Smp. 126—130° unter Gasentwicklung. Auch aus Äthylalkohol wird das Hydrat erhalten, während Methanol, auch wasserhaltiges, die hochschmelzenden Nadeln liefert.

¹⁾ *Hoppe-Seyler*, J. pr. **89**, 272 (1863); *Schotten*, Z. physiol. Ch. **10**, 175 (1886); *Uraki*, Z. physiol. Ch. **207**, 20 (1932); *Werder*, Diss. München 1927.

²⁾ Diss. München 1927.

³⁾ Vgl. Fussnote 1, S. 3.

Hydrat: 3,265; 3,408 mg Subst. gaben 8,49; 8,886 mg CO₂ und 3,20; 3,25 mg H₂O
130,3 mg verloren nach 2 Stunden bei 135° und 10 mm 6,5 mg H₂O

C ₂₆ H ₄₆ O ₄ · H ₂ O	Ber. C 70,85	H 10,99	H ₂ O 4,09%
	Gef. „ 70,91; 70,99	„ 10,97; 10,67	„ 4,99%

Wasserfreie Form, bei 0,05 mm und 140—145° getrocknet:

4,831 mg Subst. gaben 13,150 mg CO₂ und 4,88 mg H₂O

C ₂₆ H ₄₆ O ₄	Ber. C 73,87	H 10,98%
	Gef. „ 74,24	„ 11,30%

*Dimethyl-3, 7, 12-triacetoxy-nor-cholyl-carbinol-acetat*¹⁾ (IV, R = CH₃).

64 g Carbinol, von dem ein kleiner Teil noch etwas Krystallwasser enthielt, wurden mit 300 cm³ wasserfreiem Pyridin (nach *Zerewitinoff* getrocknet) und 300 cm³ frisch destilliertem Essigsäure-anhydrid 18 Stunden auf dem siedenden Wasserbad unter Feuchtigkeitsausschluss erhitzt. Hierauf wurde im Vakuum bei 60° Badtemperatur zur Trockne gedampft, mit Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit verdünnter Salzsäure und Sodalösung neutral gewaschen, getrocknet und hinterliess 92 g Rohprodukt. Aus 100 cm³ Benzin (Sdp. 70—80°) wurden 47 g Krystalle vom Smp. 108,5—112° erhalten. Die Mutterlaugen gaben nach dem Einengen und Zusatz von Pentan noch 23 g Krystalle, die von 105—111° schmolzen, total 70 g. Zur Analyse wurde eine Probe nochmals aus Petroläther umkrystallisiert und bei 65° und 0,05 mm getrocknet. Smp. 108—111° korr.

4,754 mg Subst. gaben 12,000 mg CO₂ und 3,810 mg H₂O

C ₃₄ H ₅₄ O ₈	Ber. C 69,10	H 9,22%
	Gef. „ 68,84	„ 8,97%

Bei einer *Zerewitinoff*-Bestimmung wurde kein aktiver Wasserstoff gefunden; es dürften somit alle vier Hydroxyle acetyliert sein²⁾.

Partielle Acetylierung: Acetylierte man weniger energisch, z. B. 8 Stunden bei 55—60°, so wurde ein öliges Produkt erhalten, das bei der *Zerewitinoff*-Bestimmung 2,70 und 3,30% OH ergab, während sich für ein Tri-acetylprodukt C₃₂H₅₂O₇ ein Gehalt von 3,10% Hydroxyl berechnet. Beim Erhitzen von 4,4 g Carbinol-hydrat mit 4 g wasserfreiem Natrium-acetat und 15 cm³ Essigsäure-anhydrid auf dem Wasserbad während 18 Stunden entstand ein Produkt, das aus Petroläther schön krystallisierte, aber immer sehr unscharf bei 60—80° schmolz. Ausbeute an Krystallen 4,3 g. Die Bestimmung nach *Zerewitinoff* in Anisol bei 80° gab 3,64% Hydroxyl. Diese partiell acetylierten Produkte gaben bei der Oxydation mit Chromsäure ähnliche Ausbeuten an Nor-cholsäure wie das Tetracetat.

Tri-acetyl-nor-cholsäure (V)¹⁾.

90 g Tetracetyl-carbinol (IV) wurden in 1,5 Liter gereinigtem Eisessig (zur Reinigung 8 Stunden mit Chromsäure unter Rückfluss kochen und dann abdestillieren) gelöst, auf 90—95° erhitzt und unter Rühren bei dieser Temperatur innerhalb 2 Stunden eine Lösung von 61 g Chromtrioxyd (entsprechend 6 Sauerstoffatomen) in 60 cm³ Wasser und 500 cm³ Eisessig zugetropft. Dann wurde noch 5 Stunden bei derselben Temperatur weitergerührt. Hierauf wurde im Vakuum bei 60° Badtemperatur zum Syrup eingedampft, der Rückstand mit Wasser und Äther in einen Scheidetrichter gespült und zunächst vollständig mit verdünnter Schwefelsäure ausgewaschen, bis diese ganz farblos ablief. Dann wurden die sauren Anteile mit verdünnter Natronlauge bei ständiger Gegenwart von Eis ausgezogen und durch Zusatz von Salzsäure sofort in Freiheit gesetzt und mit Äther gesammelt. Es resultierten 17 g Neutralprodukte sowie 57 g Rohsäure nach gutem Trocknen im Vakuum zur Entfernung von Essigsäure-Resten. Aus den Neutralprodukten

¹⁾ Vgl. Fussnote 1, S. 3.

²⁾ Vgl. einen analogen Fall bei *Wieland, Schlichting, Jacobi*, Z. physiol. Ch. **161**, 82 (1926).

liess sich mit *Girard*-Reagens 10 g Ketongemisch und 6,3 g Ketonfreies abtrennen. Die Rohsäure, ein zähes Harz, wurde in 100 cm³ Aceton gelöst, worauf bald Krystallisation eintrat, die durch längeres Stehen bei -15° vervollständigt wurde. Durch Abnutschen und Nachwaschen mit stark gekühltem Aceton, dann mit Petroläther, wurden 22 g Krystalle vom Smp. 105—108° gewonnen. Aus den Mutterlaugen durch Einengen und Zusatz von Petroläther kamen noch 10 g von demselben Schmelzpunkt heraus. (Aus den verbliebenen 25 g harziger Säure wurden durch alkalische Verseifung noch 17 g rohe Trioxy-säuren gewonnen, die aus Aceton zunächst 11 g krystallisierte Nor-cholsäure lieferten. Aus der Mutterlauge schied sich nach 14-tägigem Stehen 1,8 g Bis-nor-cholsäure ab, die nach einmaligem Umkrystallisieren aus Eisessig analysenrein war und den Smp. 298 bis 304° korr. unter Zersetzung zeigte.)

Zur Analyse wurde nochmals aus Aceton umkrystallisiert, wodurch der Schmelzpunkt nicht verändert wurde, und eine Stunde bei 50° und 0,05 mm getrocknet. $[\alpha]_D^{18} = + 86,5^{\circ}$ ($c = 0,6358$ in absolutem Alkohol.)

2,949 mg Subst. gaben 7,239 mg CO₂ und 2,28 mg H₂O
 $C_{29}H_{44}O_8$ Ber. C 66,88 H 8,52%
 Gef. „ 66,95 „ 8,65%

Die Säure ist leicht löslich in den üblichen organischen Lösungsmitteln ausser Petroläther. Das Kalium- und Natriumsalz sind leicht löslich in Wasser und fallen nur aus sehr konzentrierter Lösung bei starker Kühlung aus.

Methylester. Hergestellt in Äther mit Diazomethan und aus Petroläther krystallisiert, zeigt der Ester einen Smp. von 70—71°. Zur Analyse wurde 1 Stunde bei 50° und 0,05 mm getrocknet.

3,240 mg Subst. gaben 8,01 mg CO₂ 2,49 mg H₂O
 $C_{30}H_{46}O_8$ Ber. C 67,37 H 8,68%
 Gef. „ 67,43 „ 8,62%

Nor-cholsäure (VI)¹⁾.

12 g Triacetyl-nor-cholsäure wurden mit einer Lösung von 7,5 g Kaliumhydroxyd in 15 cm³ Wasser und 50 cm³ Methanol zwei Stunden unter Rückfluss gekocht. Dann wurde abgekühlt und langsam mit verdünnter Salzsäure angesäuert, wobei die Säure krystallin ausfiel. Sie wurde abgenutscht und mit 30-proz. Methanol, dann mit Wasser gut gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 7,5 g Hydrat, die unter dem Mikroskop bei 147—150° unter Zersetzung schmelzen, dann wieder erstarren und bei ca. 172° erneut schmelzen. Aus der Mutterlauge wurde der Rest nach Einengen im Vakuum mit Äther ausgeschüttelt. Die auf ein kleines Volum eingengte Ätherlösung krystallisierte besonders nach Durchschütteln mit wenig Wasser allmählich weitgehend; nach Zusatz von etwas Aceton wurde abgenutscht und mit Aceton gewaschen; so wurden noch 2 g gewonnen, die einen Smp. von ca. 190° zeigten. Zur Analyse wurde aus Aceton umkrystallisiert und im Hochvakuum 1 Stunde bei 125° getrocknet. Die Substanz zeigte dann einen Smp. 188—192° korr. und erwies sich als sehr hygroskopisch; aus diesem Grund dürfte die Analyse nicht ganz stimmen. $[\alpha]_D^{18} = + 59,4^{\circ}$ ($c = 0,4711$ in absolutem Alkohol).

Die Einwage geschah ohne Schweinchen.

4,348 mg Subst. gaben 11,038 mg CO₂ und 3,80 mg H₂O
 10,287 mg Subst. verbr. 1,219 cm³ 0,02 n. NaOH (korr.)
 $C_{23}H_{38}O_5$ Ber. C 70,00 H 9,71 Äquiv.-Gew. 394
 Gef. „ 69,26 „ 9,78 „ 422

Bei einem anderen Ansatz wurde die rohe Nor-cholsäure in Benzol aufgenommen, aus welchem Lösungsmittel sie dann schnell in kleinen Krystallen ausfiel, die erst bei 200° korr. schmolzen.

¹⁾ Vgl. Fussnote 1, S. 3.

Methylester.

7 g Nor-cholsäure wurden in 50 cm³ Methanol gelöst, 5 Minuten lang trockenes Salzsäuregas eingeleitet, bis die Lösung fast ins Sieden geriet, und hierauf noch 10 Minuten unter Rückfluss gekocht. Die Hälfte des Methanols wurde im Vakuum entfernt, und der Rückstand auf Eis gegossen und mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit Sodalösung neutralgewaschen; nach dem Trocknen hinterliess sie 7,5 g rohen Ester. Er wurde durch Zusatz von Äther zu einem dünnen Syrup gelöst, der nach sechsstündigem Stehen zu einem dicken Brei von Nadeln erstarrte, die abgenutscht und mit Äther gewaschen wurden. Ausbeute 5,5 g vom Smp. 159—161° korr. Die Mutterlauge gab noch eine kleine zusätzliche Menge. Aus Methanol krystallisiert der Ester mit dem Lösungsmittel und kann leicht in Riesenkrystallen erhalten werden, die mehrere Gramm schwer sind und beim Liegen an der Luft verwittern. In frischem Zustand schmelzen sie je nach Erhitzungsart zwischen 110—125° unscharf, darauf tritt Erstarrung zu feinen Nadeln ein, die bei 160—161° schmelzen. Zur Analyse diente eine luft-trockene Probe.

3,975 mg Subst. gaben 10,26 mg CO₂ 3,55 mg H₂O

4,298 mg Subst. gaben 2,625 mg AgJ (*Zeisel*)

C₂₄H₄₀O₅ Ber. C 70,54 H 9,87 -OCH₃ 7,60%

Gef. „ 70,42 „ 9,99 „ 8,06%

1,268 g der aus Methanol erhaltenen Krystalle hatten nach 3 Wochen an der Luft 0,271 (= 21,4%) an Gewicht verloren; für einen Gehalt von 4 Mol Methanol würden sich 21,05% berechnen. Der Ester ist recht leicht löslich in Methanol, in amorphem Zustand ebenfalls leicht in Äther; er krystallisiert daraus nach einigem Stehen aus und ist dann in Äther sehr schwer löslich. Krystallisation aus Äther tritt aber nur ein, wenn der Methylalkohol vorher vollständig entfernt worden war. $[\alpha]_D^{18} = + 37,5^{\circ}$ ($c = 0,4275$ in absolutem Alkohol).

Dimethyl-(3, 7, 12-trioxy-bis-nor-cholyl)-carbinol (VII)¹.

5 g Nor-cholsäure-methylester wurden in 100 cm³ Benzol gelöst und innerhalb einiger Minuten in die Methyl-magnesiumbromid-lösung (aus 3 g Magnesiumspähnen, 100 cm³ Äther und 15 g Methylbromid) einlaufen gelassen. Der entstandene Brei wurde 3 Stunden unter Rückfluss gekocht und hierauf in eine Mischung von 200 g Eis und 20 cm³ konz. Salzsäure eingerührt. Ein erheblicher Teil von schwer löslichen Krystallen schied sich an der Zwischenschicht ab und wurde durch Filtration und Nachwaschen mit Wasser und Äther gewonnen (2,5 g). Die verbleibenden Lösungen wurden im Scheidetrichter getrennt, und die wässrige Schicht noch mit Essigester ausgeschüttelt. Nach dem Neutralwaschen wurde zur Trockne gebracht, wobei 2,1 g Rückstand resultierte. Dieser wurde mit den Krystallen zusammen in 30 cm³ Methanol gelöst, mit 2 g Kaliumhydroxyd und 5 g Wasser versetzt und eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Vor dem Erkalten wurde mit Wasser angespritzt, wodurch die Hauptmenge krystallin ausfiel. Die Mutterlauge wurde im Vakuum vom Methanol befreit und nach Zusatz von Eis mit Essigester ausgezogen. Zum Umkrystallisieren wurde in möglichst wenig (ca. 5fache Menge) Methanol heiss gelöst und durch mehrfaches Einengen nach Zusatz von Aceton jenes verdrängt. Ausbeute 4 g schöne Nadeln vom Smp. 238—242° korr. unter Zersetzung. Schwer löslich in Aceton und in Äther, leicht in Alkohol und Methanol.

Die Acetylierung geschah wie beim höheren Homologen beschrieben. Das Rohprodukt krystallisierte nach Anreiben mit wenig Petroläther und zeigte einen Smp. von 129—131°. Umkrystallisiert aus Benzin Smp. 131—132°.

Triacetyl-bis-nor-cholsäure (IX)¹.

5 g obigen Tetracetats wurden mit 3,5 g Chromtrioxyd oxydiert, wie beim höheren Homologen beschrieben, und ergaben 1,3 g Neutrales (dies gab bei der Trennung mit *Girard*-Reagens 0,8 g Ketongemisch und 0,5 g Ketonfreies) sowie 2,7 g harzige Säure, die nicht zur Krystallisation zu bringen war.

¹) Vgl. Fussnote 1, S. 3.

Bis-nor-cholsäure (X)¹⁾.

Die 2,7 g acetylierter Säure wurden mit der Lösung von 1,7 g Kaliumhydroxyd in 3,5 cm³ Wasser und 12 cm³ Methanol 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Zusatz von etwas Wasser wurde das Methanol im Vakuum entfernt, die Lösung mit 20 cm³ Äther bedeckt und mit Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt. An der Zwischenschicht scheiden sich reichlich Krystalle aus, die abgesaugt, mit Wasser und Äther gewaschen werden. Die Lösungen werden getrennt und die wässrige Phase nochmals mit Äther ausgeschüttelt. Dieser hinterlässt nach dem Trocknen noch 1 g Rückstand, der auf Zusatz von Aceton allmählich weitere Krystalle abscheidet. Ausbeute total 1,1 g vom Smp. 285—296° korr. Zur Analyse wurde aus 50 Teilen Dioxan umkrystallisiert. Smp. 298—301 korr. unter Zersetzung. Die Krystalle bilden glänzende, harte, rechteckige Körner. Sie wurden bei 0,05 mm und 120° getrocknet.

3,122 mg Subst. gaben 7,967 mg CO₂ 2,81 mg H₂O
 6,370 mg Subst. verbrauchten 0,838 cm³ 0,02-n. NaOH (korr.)
 C₂₂H₃₆O₅ Ber. C 69,43 H 9,55% Äquiv.-Gew. 380,3
 Gef. „ 69,60 „ 10,08% „ 380

Die Säure zeichnet sich durch ihre Schwerlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln aus. Ausser aus Dioxan krystallisiert sie auch gut aus Eisessig oder verdünntem Methanol. $[\alpha]_D^{18} = +13,8^\circ$ (c = 0,578 in absolutem Alkohol).

Diphenyl-(3,7,12-trioxy-nor-cholyl)-carbinol (II, R=C₆H₅).

42,5 g trockene Magnesiumspähne werden mit 300 cm³ absolutem Äther überdeckt, 10 g frisch destilliertes Brombenzol und ein Jodkrystall zugegeben. Nach kräftigem Einsetzen der Reaktion wird durch den Kühler eine Mischung von 270 g Brombenzol in 600 cm³ Äther so zugetropft, dass der Äther ständig im Sieden bleibt (Dauer 2 Stunden); zum Schluss wird 15 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt. Dann werden innerhalb 15 Minuten 50 g Cholsäuremethylester, in 200 cm³ absolutem Benzol gelöst, unter Umschwenken zufließen gelassen und der Brei noch 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wird allmählich unter Rühren auf 2 kg Eis gegossen und starke Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion zugefügt. Es wird im Scheidetrichter abgetrennt und noch dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen werden mit verdünnter Salzsäure, dann gründlich mit Lauge und Wasser gewaschen, getrocknet und durch Destillation vom Äther befreit. Der Rückstand wurde mit 7 g Kaliumhydroxyd in 20 cm³ Wasser und 200 cm³ Methanol eine Stunde unter Rückfluss erhitzt, nach Zusatz von Wasser im Vakuum vom Methanol befreit und mit Äther ausgeschüttelt. Die gewaschene und getrocknete Ätherlösung hinterliess 90 g Syrup, der in 200 cm³ absolutem Benzol heiss aufgenommen wurde. Zu dieser Lösung werden in der Wärme unter Schütteln allmählich 2—3 g Wasser zugetropft, die sich fast vollständig auflösen, worauf sich das Hydrat des Carbinols als dicker Brei abscheidet. Nach dem Erkalten wird noch mit Petroläther verdünnt, bis der Brei filtrierbar ist, hierauf abgenutscht und mit etwas Benzol, dann mit Petroläther

¹⁾ Vgl. Fussnote 1, S. 3.

gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 42 g. Smp. unscharf ca. 111—120°, bei weiterem Erhitzen tritt meist gegen 150 bis 160° Umwandlung in Nadeln ein, die bei 202—205° korr. schmelzen. Zur Analyse wurde nochmals analog umkrystallisiert und bei 70° und 0,05 mm getrocknet.

3,512 mg Subst. gaben 10,17 mg CO₂ und 2,88 mg H₂O

C₃₈H₅₀O₄ Ber. C 79,06 H 9,22%

Gef. „ 78,98 „ 9,18%

Das Carbinol ist in den meisten organischen Lösungsmitteln, ausser in Petroläther, leicht löslich, wenn es wasserfrei ist. $[\alpha]_D^{17} = +23,8^\circ$ ($c = 0,5463$ in absolutem Alkohol).

Bei einem zweiten Versuch wurden analog aus 95 g Cholsäure-methylester 90 g des Diphenyl-carbinols erhalten.

Acetylierung und Oxydation. 40 g Carbinol mit 200 cm³ Essigsäure-anhydrid und 200 cm³ wasserfreiem Pyridin während 20 Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, gaben nach der Aufarbeitung, wie beim Dimethyl-carbinol beschrieben, 45 g Acetylprodukt als schaumige Masse, die nicht krystallisierte. Zur Oxydation wurde in 800 cm³ Eisessig aufgenommen und bei 90—95° innerhalb 30 Minuten eine Lösung von 27 g Chromtrioxyd in 25 cm³ Wasser und 250 cm³ Eisessig zulaufen gelassen. Anschliessend wurde noch 3 Stunden weiter erhitzt. Die Aufarbeitung gab 28 g Rohsäuren, daraus mit Aceton und Aceton-Petroläther 18 g krystallisierte Triacetyl-nor-cholsäure; (aus den verbleibenden syrupösen acetylierten Säuren wurden nach Verseifung ca. 4,6 g freie Oxysäuren und daraus 2,4 g krystallisierte Nor-cholsäure und 0,6 g Bis-nor-cholsäure erhalten). Die 18 g krystallisierte Triacetyl-nor-cholsäure gaben 12,6 g Nor-cholsäure; Totalausbeute an letzterer somit 15 g. Zwei grössere Ansätze gaben ganz analoge Ausbeuten.

Diphenyl-(3,7,12-trioxy-nor-cholylden)-methan (III).

2,5 g Diphenyl-carbinol (Smp. 110—120°) wurden mit 25 cm³ absolutem Benzol und einem Jodkrystall eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Beim Abkühlen krystallisierte 1,6 g der ungesättigten Verbindung aus vom Smp. 220—230°. Sie ist schwer löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln. Zur Analyse wurden die Krystalle mit absolutem Alkohol, dann mit Äther verrührt, abgutscht und gut gewaschen, der Schmelzpunkt blieb unverändert. Getrocknet wurde bei 110° und 0,05 mm.

3,364 mg Subst. gaben 10,004 mg CO₂ und 2,75 mg H₂O

C₃₆H₄₈O₃ Ber. C 81,76 H 9,16%

Gef. „ 81,11 „ 9,12%

Der Körper ist deutlich ungesättigt gegen Brom in Chloroform. Er entstand auch dann, als 0,5 g Carbinol in 20 cm³ Benzol mit einem Tropfen konz. Salzsäure ½ Stunde unter Rückfluss gekocht

wurde (Ausbeute 0,1 g). Ferner wurde er zufällig erhalten, als bei einem Ansatz aus 49 g Cholsäure-methylester mit Phenylmagnesiumbromid die Ätherlösung des Reaktionsproduktes vor der Verseifung nicht mit Alkalien gewaschen wurde (offenbar durch die Einwirkung der vorhandenen Jod- oder Säure-reste). Nach anschliessender alkalischer Verseifung resultierten 80 g Rohsyrop, die beim Aufkochen mit 200 cm³ Benzol sofort krystallisierten und 40 g des ungesättigten Stoffes lieferten. $[\alpha]_D^{18} = + 52,8^{\circ}$ ($c = 0,6057$ in absolutem Alkohol).

Acetylierung. 29 g der ungesättigten Verbindung lieferten, wie üblich mit 150 cm³ Essigsäure-anhydrid und 150 g trockenem Pyridin 20 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt, bei der Aufarbeitung 34 g neutrales Öl, das schwer löslich in Benzin war. Aus der Eisessiglösung wurde es mit Wasser krystallin gefällt (Smp. 83—85°), aus anderen Lösungsmitteln wurde auch nach dem Impfen nur ein öliges Produkt erhalten.

Ozonisierung des Acetylproduktes. 12 g Acetylprodukt wurden in 100 cm³ reinem Essigester bei 0° $\frac{3}{4}$ Stunden lang ozonisiert (entsprechend ca. 1,2 g Ozon = 1,5 Mol). Die Lösung war dann gegen Brom in Eisessig gesättigt.

Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 cm³ Wasser und 25 cm³ Eisessig versetzt und unter Schütteln eine Lösung von 5 g Kaliumpermanganat in 200 cm³ Wasser bei Zimmertemperatur allmählich zugegeben. Zuletzt blieb die rote Farbe gerade bestehen. Es wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Die Trennung mit Lauge und Eis gab 8 g neutralen Syrup, der noch Aldehydreaktion zeigte (ammoniakalische Silberlösung in Methanol), sowie ca. 2 g Säuren, diese gaben mit Aceton-Petroläther 1,9 g krystallisierte Triacetylnor-cholsäure.

Oxydation mit Chromsäure. 19,6 g der acetylierten Verbindung wurden mit 12 g Chromsäure-anhydrid in Eisessig oxydiert. Die Aufarbeitung gab 7 g Neutralteile, sowie 13,3 g rohe Säure, daraus 9,4 g krystallisierte Triacetylnor-cholsäure.

Abbau der Nor-cholsäure über das Diphenyl-carbinol (VII, R=C₆H₅).

Zu einer Lösung, die aus 4,25 g Magnesiumspähnen und 28 g Brombenzol in 150 cm³ Äther bereitet war, wurde 5 g Nor-cholsäure-methylester in 100 cm³ absolutem Benzol zufließen gelassen und die Mischung 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Aufarbeitung und alkalische Verseifung geschah wie beim höheren Homologen. Es resultierte 8,5 g neutraler Syrup, der nicht zur Krystallisation zu bringen war. Daher wurde mit wenig Benzol verflüssigt und durch Zusatz von viel Pentan gefällt, im Mörser ausgerieben und mit Pentan gewaschen. Das Carbinol wurde nochmals aus wenig Benzol

analog gefällt. Die Lösungen wurden zur Trockne gebracht und der halbkristalline Rückstand mit reinem Pentan ausgerieben, wobei noch etwas unlösliches Carbinol abgetrennt wurde. Im Pentan blieb 1,8 g Diphenyl. Es wurden 5,7 g amorphes Carbinol erhalten.

Die Acetylierung der 5,7 g, wie beim höheren Homologen, lieferte 6,9 g Acetylprodukt, das ebenfalls nicht kristallisierte; es wurde im amorphen Zustand oxydiert.

Die Oxydation, wie beim höheren Homologen mit Chromsäure, gab 3 g rohe Triacetyl-bis-nor-cholsäure. Diese lieferte bei der Verseifung 1,8 g reine kristallisierte Bis-nor-cholsäure. Ein grösserer Ansatz mit 30 g Nor-cholsäure-methylester lieferte analog 10 g Bis-nor-cholsäure.

Bis-nor-cholsäure-methylester.

4,9 g Bis-nor-cholsäure wurde mit Methylalkohol und Salzsäure verestert, wie beim höheren Homologen beschrieben. Der resultierende Ester konnte nur als Hydrat kristallisiert werden. Er wurde hierzu in 250 cm³ Äther gelöst, die Lösung mit 125 cm³ Pentan und hierauf tropfenweise unter Umschütteln mit 0,35 cm³ Wasser versetzt. Nach ca. 10 Minuten begann die Krystallisation, die recht langsam weiterschritt. Es wurden farblose grosse Nadelbüschel erhalten. Nach 10 Stunden wurde abgesaugt, mit Äther und Pentan gewaschen; Ausbeute 2,9 g. Eine kleine Menge freier Säure wird zurückerhalten. Zur Analyse wurde nochmals aus Äther unter Zusatz einer Spur Wasser umkristallisiert; die Substanz wurde vorher durch Eindampfen mit Benzol getrocknet. Die Krystalle wurden fein gepulvert und an der Luft getrocknet. Sie zeigten einen Smp. 97—98°, wurden bei weiterem Erwärmen bei ca. 125—140° wieder fest und die entstandenen Nadelbüschel schmolzen erneut bei 156—159°. Die lufttrockene Substanz scheint $\frac{1}{2}$ Mol Krystallwasser zu enthalten. $[\alpha]_D^{17} = +22,0^{\circ}$ (c = 0,5448 in absolutem Alkohol.)

3,770; 2,826 mg Subst. gaben 9,46; 7,09 mg CO₂ und 3,18; 2,35 mg H₂O

$C_{23}H_{38}O_5 \cdot \frac{1}{2}H_2O$	Ber. C 68,43	H 9,74%
	Gef. .. 68,43; 68,43	.. 9,44; 9,31%

Diphenyl-(3, 7, 12-triacetoxy-ter-nor-cholyl)-carbinol (XI).

4,1 g Bis-nor-cholsäure-methylester wurden durch Eindampfen mit etwas Benzol und längeres Evakuieren gut getrocknet, in 20 cm³ Benzol gelöst und zur Grignard-Lösung aus 4,2 g Magnesium und 28 g Brombenzol in 200 cm³ Äther gegeben. Die Mischung wurde 6 Stunden unter Rückfluss gekocht, wie in den anderen Fällen aufgearbeitet und mit der Lösung von 7 g Kaliumhydroxyd in 2 cm³ Wasser und 20 cm³ Methanol zur Verseifung 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die Aufarbeitung gab 5,1 g Neutralprodukt als

Harz, das nicht krystallisierte und daher durch Ausreiben mit Pentan, wie beim höheren Homologen gereinigt wurde. Erhalten 3,8 g amorphes Carbinol.

Acetylierung. Die Acetylierung mit 30 g Pyridin und 30 g Essigsäure-anhydrid, wie in den obigen Fällen, ergab ein Neutralprodukt, das beim Einengen der Ätherlösung sofort krystallisierte; weitere Mengen kommen ebenfalls durch vorsichtigen Zusatz von Pentan heraus. Ausbeute: 3 g Krystalle vom Smp. 252° korr. Zur Analyse wurde eine Probe in 50 Teilen absolutem Äther gelöst, filtriert und stark eingeengt. Nach dem Abnutschen wurde mit Äther-Pentan gewaschen; Smp. 253—255° korr. ohne merkbare Zersetzung. $[\alpha]_D^{18} = +23,11^\circ$ ($c = 0,649$ in absolutem Alkohol). Der Stoff ist in kleinen Mengen im Hochvakuum unzersetzt sublimierbar.

3,572 mg Subst. gaben 9,73 mg CO₂ und 2,60 mg H₂O
 $C_{30}H_{52}O_7$ Ber. C 74,48 H 8,13%
 Gef. „ 74,29 „ 8,14%

1,1-Diphenyl-methyl-(3,7,12-triacetoxy-äthiocholy)-äthylen (XII).

Die Wasserabspaltung aus dem obigen Carbinol wurde mit verschiedenen Mitteln versucht, so mit wenig Jod in Essigsäure-anhydrid, mit Essigsäure-anhydrid allein im Bombenrohr bei 165—170°, mit Thionylechlorid in Toluol, sowie mit Eisessig. Letzterer bewährte sich weitaus am besten. 2,2 g krystallisiertes Triacetyl-carbinol wurden in 20 cm³ reinstem Eisessig 6 Stunden unter Rückfluss gekocht (Ölbad 165°); hierauf wurde im Vakuum vollständig eingedampft und der Rückstand in 10 cm³ Methanol heiss aufgenommen. Es tritt bald Krystallisation ein, die durch längeres Stehen bei 0° vervollständigt wird. Nach dem Abnutschen wird mit etwas Methanol gewaschen. Ausbeute 1,5 g feine Nadeln vom Smp. 182—183° korr. Aus der Mutterlauge kamen durch Einengen noch 0,2 g heraus. Zur Analyse wurde aus absolutem Alkohol umkrystallisiert, wodurch der Schmelzpunkt nicht mehr geändert wurde. $[\alpha]_D^{20} = +423,6^\circ$ ($c = 0,5265$ in absolutem Alkohol).

4,363 mg Subst. gaben 12,28 mg CO₂ und 3,12 mg H₂O
 $C_{40}H_{50}O_6$ Ber. C 76,63 H 8,05%
 Gef. „ 76,76 „ 8,00%

Durch Kochen des Carbinols mit 10 Teilen Essigsäure-anhydrid und einer Spur Jod während 2 Stunden unter Rückfluss tritt nur teilweise Dehydratisierung ein. Aus dem Reaktionsprodukt wird mit Äther-Pentan zunächst die Hauptmenge unverändertes Carbinol abgeschieden, aus der öligen Mutterlauge durch Zusatz von Methanol eine kleine Menge des Wasserabspaltungsproduktes. Essigsäure-anhydrid allein bewirkt ungefähr dasselbe, nur muss man dann am besten 3 Stunden im Bombenrohr auf 165—170° erhitzen. Ausbeute

ca. 10% und 50% unverändertes Carbinol zurück. Mit Thionylechlorid wurde überhaupt nichts Krystallisierbares erhalten, auch nicht nach kurzem Kochen mit Chinolin.

3,7,12-Triacetoxy-pregnan-20-on (XIII).

1,25 g der ungesättigten Verbindung (XII) wurden in 100 cm³ reinem Chloroform gelöst und bei 0° 20 Minuten lang ozonisiert (entsprechend ca. 0,28 g Ozon, während theoretisch 0,1 g nötig sind). Eine Kontrolle mit Brom ist kaum möglich, da die ungesättigte Verbindung Brom nur sehr träge aufnimmt. Das Chloroform wurde im Vakuum entfernt, die letzten Reste durch Zusatz von etwas Eisessig und erneutes Einengen im Vakuum. Dann wurden 30 cm³ Eisessig und etwas Zinkspähne zugegeben und unter Umschwenken auf dem Wasserbad erwärmt, bis eine Probe auf feuchtem Kaliumjodid-Stärke-Papier keine Blaufärbung mehr hervorrief. Es wurde im Vakuum zur Trockne gebracht, mit etwas Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit verdünnter Salzsäure, dann mit Soda gewaschen und hinterliess nach dem Trocknen 1,4 g farbloses Öl.

Dieses wurde zur Isolierung des Ketons mit 3 g *Girard-Reagens T*¹⁾, 20 cm³ Methanol und 1 cm³ Eisessig 2—3 Minuten gekocht und noch ½ Stunde lauwarm stehen gelassen. Nach Abkühlen mit Kältemischung wurde die eiskalte Mischung von 18 cm³ 2-n. Sodalösung und 12 cm³ Wasser zugegeben und 3 Mal bei 0° mit Äther rasch ausgeschüttelt. (Aus der Ätherlösung nach dem Trocknen etc. wurden 0,6 g „Ketonfreies“ erhalten.) Die alkalisch-wässrige Lösung wurde mit Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt und bei Zimmertemperatur 3 Mal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen wurden mit Soda neutral gewaschen und hinterliessen nach dem Trocknen 0,6 g Keton als farbloses Öl. Es wurde in wenig Äther gelöst und mit Pentan bis zur beginnenden Trübung versetzt. Nach 2 Stunden begann die Ausscheidung von Krystallen, die sich rasch vermehrten. Zum Schluss wurde abgenutscht und mit Pentan gewaschen. Ausbeute 545 mg Krystalle vom Smp. 132—134°. Zur Analyse wurde im Molekularkolben²⁾ bei 0,05 mm destilliert, wobei die Substanz bei 180—190° Badtemperatur übergang. Das Destillat wurde nochmals aus Äther-Pentan umkrystallisiert, wobei sich recht langsam sehr schöne Büschel von Blättchen abschieden, die einen Smp. 134—135° korr. und ein $[\alpha]_D^{20} = +120,7^\circ$ (c = 0,83 in absolutem Alkohol) zeigten. Sie enthalten offenbar Wasser, jedenfalls konnten erst richtige Resultate bei der Verbrennung erhalten werden, als die Substanz im Schiffchen zuerst eine Stunde

¹⁾ Helv. **19**, 1095 (1936).

²⁾ *Neracher und Reichstein*, Helv. **19**, 1382 (1936).

bei 0,05 mm und 100—120° getrocknet, dann noch 10 Minuten bei gleichem Vakuum etwas über den Schmelzpunkt erhitzt und nach dem Erkalten und Einlassen von getrockneter Luft zur Wägung sofort in ein tariertes Schweinchen gegeben wurde, das bis zum völligen Temperatúrausgleich in einem kleinen Exsikkator neben der Wage belassen wurde. Die getrocknete Probe ist hygroskopisch.

5,168 mg Subst. gaben 12,935 mg CO₂ und 3,93 mg H₂O
 $C_{27}H_{40}O_7$ (476,3) Ber. C 68,02 H 8,46%
 Gef. „ 68,26 „ 8,51%

Das Triacetat ist in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln ausser Petroläther sehr leicht löslich.

3,7,12-Trioxy-pregnan-20-on (XIV).

400 mg Triacetyl-ke-ton (XIII) wurden mit 6 Mol methyl-alkoholisch-wässriger Kalilauge 30 Minuten unter Rückfluss leicht gekocht. Nach Zusatz von Wasser wurde das Methanol im Vakuum entfernt und der Rückstand bei 0° mit reinstem, frisch destillierten Essigester 3 Mal rasch ausgeschüttelt. Die mit etwas Wasser gewaschenen und mit Sulfat getrockneten Auszüge hinterliessen beim Eindampfen im Vakuum einen dicken, leicht gelblichen Honig, der aus wenig Aceton unter Zusatz von zwei Tropfen Wasser und Äther bis zur Trübung bald krystallisierte. Ausbeute 100 mg Krystalle vom Smp. 120—127° unter Zersetzung (Wasserabgabe). In wasserfreier Form konnte das Keton nicht krystallisiert erhalten werden. Zur Analyse wurde nochmals aus feuchtem Aceton-Äther umkrystallisiert. Die optische Drehung wurde nach gründlichem Trocknen im Messkölbchen (bis über den Schmelzpunkt) bestimmt. $[\alpha]_D^{25} = +107,75^\circ$ ($c = 0,1123$ in absolutem Alkohol). Da das wasserfreie Keton noch hygroskopisch ist als (XIII), mussten hier dieselben Vorsichts-massregeln ergriffen werden. Zur Trocknung wurde zuerst 1 Stunde im Schiffchen bei 0,05 mm auf 100—110°, dann noch 10 Minuten auf 135°, also über den Schmelzpunkt erhitzt, wobei beim Schmelzen noch deutliche Gasentwicklung beobachtet wurde, die nach kurzer Zeit nachliess.

4,226 mg Subst. gaben 11,29 mg CO₂ und 3,66 mg H₂O
 $C_{21}H_{34}O_4$ (350,2) Ber. C 71,96 H 9,79%
 Gef. „ 72,35 „ 9,69%

Die Substanz ist in Äther und Benzol ziemlich schwer löslich, leicht lösen: Alkohol, Methanol, Eisessig und Essigester.

Zusammenfassung.

Der Abbau liefert aus 100 g Cholsäure sowohl über die Dimethyl- wie über die Diphenyl-carbinole etwa gleich viel, nämlich ca. 40 g Nor-cholsäure, daraus ca. 10 g Bis-nor-cholsäure und aus dieser ca.

1,5 g Triacetoxy-pregnanon. (Die alkalische Verseifung des letzteren zum freien Trioxyketon dürfte sich noch etwas verbessern lassen und 0,5—0,8 g davon liefern¹.)

Die Analysen wurden grösstenteils im Mikrochemischen Laboratorium des Instituts (Leitung Dr. M. Furter), einige auch bei Dr. Schöller (Berlin) ausgeführt.

Laboratorium für organische Chemie Eidg. Techn.
Hochschule Zürich.

2. Azofarbstoffe und Immunbiologie.

Schultz-Dale'sche Versuche mit Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin

von Hans Ed. Fierz-David, Werner Jadassohn und Werner Felix Zürcher.

(12. XII. 36.)

1933 teilten *Landsteiner* und *van der Scheer*²) mit, dass es ihnen gelungen sei, bei mit Azoproteinen vorbehandelten Meerschweinchen durch Injektion von Azofarbstoffen, die die gleiche Azokomponente enthielten, wie das sensibilisierende Antigen, anaphylaktischen Schock auszulösen. Verwendet wurde von den beiden Autoren:

1. zur Vorbehandlung ein Azoprotein, hergestellt aus 4-Amino-suberanilsäure und Globulin aus Pferdeserum; resp. ein Azoprotein, hergestellt aus 4-Amino-succinanilsäure und Globulin aus Pferdeserum.

2. zur Auslösung des anaphylaktischen Schocks Bis-p-suberanilsäure-azo-resorcin resp. Bis-p-succinanilsäure-azo-resorcin.

Diese Versuche bringen insofern etwas vollkommen Neues, als es hier zum ersten Male gelungen ist, den anaphylaktischen Schock mit einer chemisch bekannten Substanz auszulösen.

Der sog. anaphylaktische Versuch.

Anaphylaktische Experimente wurden früher und werden jetzt auch meist noch mit chemisch ganz undefinierbaren Eiweisskörper enthaltenden Gemischen durchgeführt, in erster Linie mit Seren.

Das gewöhnliche Vorgehen beim anaphylaktischen Experiment ist folgendes: Man injiziert einem Meerschweinchen eine kleine Menge artfremden Serums, was von dem Tier anstandslos getragen wird. Einige Zeit später injiziert man das gleiche Serum in einer für nicht vorbehandelte Tiere vollkommen indifferenten Menge intravenös; das vorbehandelte Meerschweinchen erkrankt unter den charakteristischen Symptomen des

¹) Eine weitere Verbesserung der Ausbeute lässt sich erzielen, wenn man den Bis-nor-cholsäure-methylester nicht isoliert, sondern mit Diazomethan bereitet (Säure in Methanol gelöst, direkt roh verwendet). Statt 1,5 g Triacetyl-keton erhält man dann ca. 2,8 g.

²) *Landsteiner* und *van der Scheer*, J. Exp. Med. 56, 399 (1932); 57, S. 633 (1933).