

wurde die freie Oxysäure abgeschieden, mit viel Äther ausgeschüttelt und nach dem Trocknen durch starkes Einengen krystallisiert. Zur Reinigung wurde aus Methanol oder aus viel Aceton durch Einengen umkrystallisiert. Zugespitzte flache Nadeln vom Smp. 273—275⁰ korr. unter Opakwerden bei ca. 120⁰. Die Säure ist in Methanol und Aceton ziemlich schwer löslich, noch schwerer in Äther und fast unlöslich in Petroläther. Die optische Drehung wurde in Dioxan bestimmt: $[\alpha]_D^{18} = +50^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1$ in Dioxan). Der mit Diazomethan bereitete Methylester krystallisierte aus Äther-Pentan in feinen Nadeln vom Smp. 141—142⁰ korr.

Die Mikroanalysen wurden im Mikroanalyt. Laboratorium des Instituts (Leitung Privatdoz. Dr. M. Furter) von Hrn. Dr. H. Gysel ausgeführt.

Laboratorium f. organ. Chemie, Eidg. Techn. Hochschule Zürich.

122. Über Bestandteile der Nebennieren-Rinde (X)¹⁾. Zur Kenntnis des Cortico-sterons²⁾

von T. Reichstein.

(27. VII. 37.)

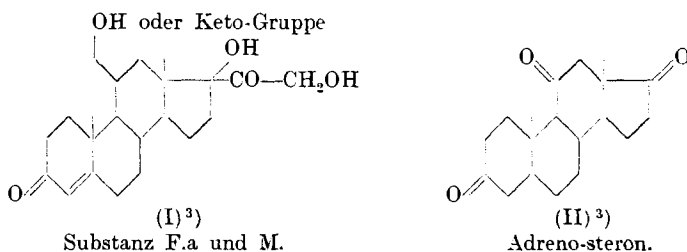
In der VI. Mitteilung dieser Reihe wurde über die Isolierung der Substanzen H, J, K und L aus Extrakten von Rinder-Nebennieren berichtet. Biologisch geprüft wurden inzwischen vorläufig Substanz H und J. Hierbei zeigte es sich, dass Substanz H an epinephrectomierten Ratten eindeutige „Cortinwirkung“ aufwies. Beim *Everse-de Fremery*-Test war in der Dosierung von 1 mg pro Tag und Ratte volle Wirksamkeit festzustellen, mit 0,5 mg reagierten ungefähr die Hälfte der Tiere positiv, die Hälfte negativ. Substanz J war in dieser Beziehung wirkungslos³⁾. Substanz H wurde daher in grösserer Menge bereitet und genauer untersucht. — Zunächst zeigte es sich, dass die als Substanz H bezeichneten Krystalle noch nicht ganz rein waren. Sie stellten zur Hauptsache das Alkoholat einer einheitlichen Verbindung dar, enthielten jedoch noch eine geringe Beimengung einer hochschmelzenden Substanz, die für sich abgetrennt und in etwas grösserer Menge auch noch weiter aus den öligen Teilen der Fraktion C. 17. A. 3. isoliert werden konnte, und die als Substanz M bezeichnet wird.

¹⁾ Ich verdanke die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit der *Haco-Gesellschaft*, Gümligen, sowie Materiallieferung und Tierversuche der *N. V. Organon*, Oss; weitere Tierversuche Herrn Prof. E. Laqueur, Amsterdam, und seinen Mitarbeitern.

²⁾ Einige Resultate dieser Untersuchungen wurden bereits in der 7. Mitteilung publiziert: *De Fremery, Laqueur, Reichstein, Spanhoff, Uyldeert*, *Nature* **139**, 26 (1937).

³⁾ Die Prüfung wurde von den Herren *P. de Fremery* und *R. W. Spanhoff* in Oss durchgeführt.

Substanz M erwies sich als α, β -ungesättigtes Diketon der Formel $C_{21}H_{30}O_5 \pm H_2$. Sie hat einen Schmelzpunkt von 207—210° korr., unter leichter Zersetzung bei langsamem Erhitzen, reduziert alkalische Silbersalzlösung und zeigt die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure¹⁾; sie gibt das typische U.V.-Absorptions-spektrum der α, β -ungesättigten Ketone (vgl. Kurve auf S. 958) und liefert bei der Oxydation mit Chromsäure Adreno-steron (II). Somit ist sie der Substanz F.a ausserordentlich ähnlich und gibt vor allem auch keine Schmelzpunkts-Depression mit derselben. Sie kann aber leicht an der völlig anderen Krystallform erkannt werden. Ferner sind die Acetate verschieden; siehe nächste Mitteilung. F.a wird aus abs. Alkohol oder aus Aceton in schönen Rhomben erhalten, M dagegen aus abs. Alkohol in walzenförmigen Krystallen (evtl. Aggregaten), die in der Aufsicht unter dem Mikroskop rechteckig begrenzt sind. Die Achse der Walze ist im durchfallenden Licht als heller, im auffallenden Licht als dunkler, dicker Strich sichtbar; senkrecht dazu ist oft eine Lamellierung erkennbar (vgl. Skizze, Fig. 3). F.a und M lassen sich aber nicht durch Impfen der übersättigten Lösung ineinander überführen, auch lässt sich die Krystallisation von F.a nicht durch Impfen mit M anregen und umgekehrt, so dass sicher keine Identität vorliegt. Entweder sind die beiden isomer, oder sie unterscheiden sich nur durch den Gehalt an zwei Wasserstoffatomen. Für M kommt somit dieselbe Formel (I) in Betracht, die für F.a gegeben wurde²⁾.



Bei der biologischen Prüfung zeigte Substanz M in den bisher geprüften, allerdings sicherlich zu geringen Dosen von 0,2 mg pro Tag und Ratte, keine Cortin-Wirksamkeit.

¹⁾ Von Wintersteiner und Pfiffner zuerst für ihre Substanz F beschrieben.

²⁾ Es soll hier nochmals erwähnt werden, dass Substanz F.a sich durch direkten Vergleich, sowie Impfpfrobe mit Substanz F von Wintersteiner und Pfiffner als identisch erwiesen hat. Inzwischen hat mir Herr Dr. Kendall eine Probe seiner Substanz E zugesandt, für die auch hier bestens gedankt sei; sie erwies sich ebenfalls als identisch mit F.a, resp. mit F von Wintersteiner. In den Formeln wurde der letzte Sauerstoff bereits in seine wahrscheinlichste Stellung plaziert (vgl. M. Steiger und T. Reichstein, Helv. 20, 817 (1937)). Er kann dort als sekundäres Hydroxyl oder als Ketogruppe enthalten sein.

³⁾ In diesen und in allen folgenden Formeln wurde der Einfachheit halber der letzte Sauerstoff in 11-Stellung angenommen, obwohl ein ganz sicherer Beweis dafür noch aussteht.

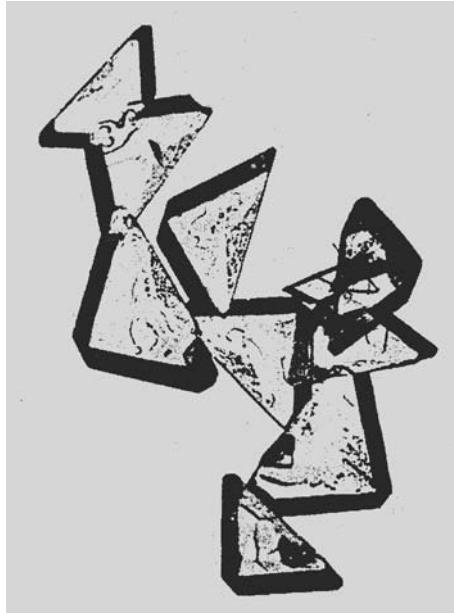


Fig. 1. (Vergrößerung hier ca. 27-fach.)
Cortico-steron aus Aceton¹⁾.

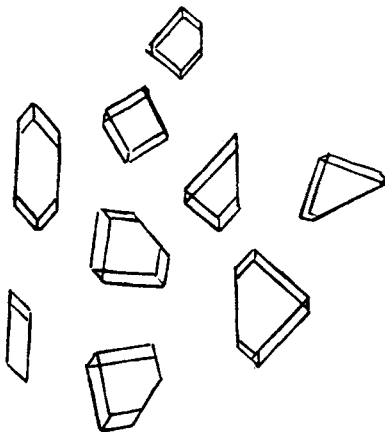


Fig. 2. Cortico-steron.
(Verschiedene Formen aus Aceton.)



Fig. 3. Subst. M.
Walzen und X-Formen aus
Alkohol (im auffallenden Licht).

¹⁾ Die Mikro-Aufnahme verdanke ich Herrn Dr. F. Steindl, Zürich.

Unter Abtrennung der geringen Beimischung von M liess sich nun die Hauptmenge des ursprünglich als Substanz H bezeichneten Präparates in einwandfrei reinem Zustand gewinnen. Dieser Teil zeigte die volle Cortin-Wirksamkeit des ursprünglichen Präparates und wurde daher als „Cortico-steron“ bezeichnet. Die Wirksamkeit im *Everse-de Fremery*-Test war ungefähr dieselbe wie vor der Reinigung¹⁾. Erleichtert wurde die letzte Reinigung durch den Umstand, dass dieser Stoff im Hochvakuum bei Verwendung eines „Molekular-kolbens“ unzersetzt destillierbar ist. Aus Alkohol krystallisiert er in zwei Modifikationen, die sich durch Impfen der übersättigten Lösung beliebig ineinander überführen lassen: entweder als Alkoholat in feinen Nadeln, oder in einer derben Form (schief abgeschnittene, dicke glänzende Platten), die frei von Lösungsmittel ist; die letztere ist schwer löslich und daher die beständigere. Besonders geeignet ist zur Reinigung Aceton, aus dem die derbe Form in charakteristischen, oft fast dreieckigen farblosen Platten erhalten wird. (Vgl. Photographie, Fig. 1; andere Variationen sind in der Skizze Fig. 2 angedeutet.)

Cortico-steron zeigt den Smp. 180—182° korr. und in lufttrockenem Zustand die spez. Drehung $[\alpha]_D^{15} = +223^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1$ in abs. Alkohol). Es gibt mit konz. Schwefelsäure die grüne Fluoreszenzreaktion von *Wintersteiner*²⁾, reduziert alkalische Silbersalzlösung und zeigt im U.V.-Absorptions-Spektrum die typische Bande der α, β -ungesättigten Ketone. Es sei hier nochmals eine etwas genauere Kurve der reinen Substanz reproduziert³⁾. Die Brutto-Zusammensetzung wurde durch verschiedene Analysen, auch von Derivaten, zu $C_{21}H_{30}O_4$ ermittelt, wobei die genaue Wasserstoffzahl durch Abbauresultate bestätigt wird. Das Cortico-steron unterscheidet sich somit von den meisten der früher beschriebenen Verbindungen der C_{21} -Reihe hauptsächlich dadurch, dass es nur 4 Sauerstoffatome besitzt. Zwei davon lassen sich durch Derivate, besser noch indirekt als Ketogruppen nachweisen. Ein weiteres ist als leicht acylierbare Hydroxylgruppe vorhanden. Eine weitgehende Klärung bringt die Oxydation mit Chromsäure. Es entsteht hier, im Gegensatz zu den Verbindungen der C_{21} - O_5 -Serie, die dabei neutrale Ketone liefern, eine Säure $C_{20}H_{26}O_4$ ⁴⁾. Nimmt man an, dass das Cortico-steron, wie

¹⁾ Nature **139**, 26 (1937).

²⁾ Diese Reaktion wird also von den Substanzen E, F.a, M und Cortico-steron (nach unserer Nomenklatur) gegeben.

³⁾ Diese Aufnahmen verdanke ich der Freundlichkeit von Herrn Dr. *Mohler*, Zürich. Sie sind im *Hilger*-Quarz-Spektrographen E_2 mit Substanzmengen von ca. 1 mg durchgeführt worden. Als Platten dienten Ilford Zenith extra sensitiv. Die *Schwarzschild*'sche Konstante wurde zu 0,9 eingesetzt, $\log \epsilon$ nach *V. Henri*, Physik. Z. **14**, 515 (1913), berechnet. $\epsilon = \frac{1}{c \cdot d} \log \frac{J_0}{J}$; $c = \text{Mol/L}$, d in cm.

⁴⁾ Dürfte mit Säure 1 von *Mason, Myers, Kendall*, J. biol. Chem. **114**, 613 (1936), identisch sein, vgl. weiter unten.

früher vermutet, eine ähnliche Konstitution besitzt wie die in-
zwischen aufgeklärten Substanzen der $C_{21}-O_5$ -Serie (Subst. A, C, D,
E, F.a und M), so lassen sich die erwähnten Eigenschaften ohne

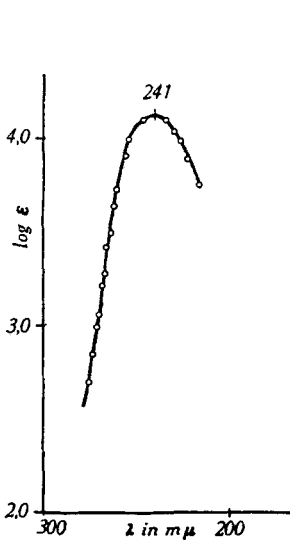


Fig. 4.

Substanz M 0,000109-molar in Alkohol.

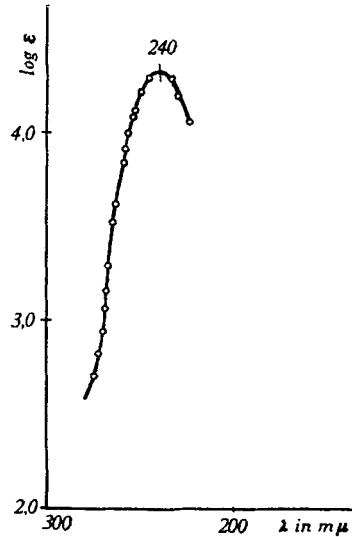
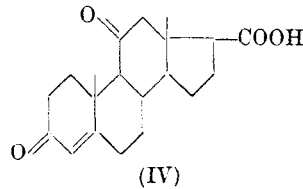
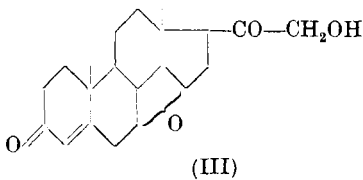


Fig. 5.

Cortico-steron 0,000134-molar in Alkohol.

Zwang nur mit der Formel (III) vereinigen, wenn die Lage und
Funktion des letzten Sauerstoffs noch offen gelassen wird¹⁾. Die ent-
stehende Säure hat Formel (IV) (wobei der letzte Sauerstoff gleich
an die heute wahrscheinlichste Stelle gesetzt ist).



Inzwischen ist das Cortico-steron auch von *Kendall* und Mit-
arbeitern²⁾ isoliert worden. In dieser Mitteilung wird allerdings
lediglich erwähnt, dass sich Cortico-steron mit dem von diesen
Autoren schon etwas früher isolierten und als compound B benannten
Stoff³⁾ als identisch erwiesen hat. Dies ist deshalb nicht ganz richtig,
weil *Kendall* und Mitarbeiter in ihrer ursprünglichen Mitteilung³⁾

¹⁾ Diese Formel wurde im Dezember 1936 anlässlich einer schweiz. Patentanmeldung
erstmalig schriftlich niedergelegt.

²⁾ *Kendall, Mason, Hoehn, Mc. Kenzie*, Proc. Staff Meetings Mayo Clinic **12**, 136
(1937).

³⁾ *Mason, Myers, Kendall*, J. biol. Chem. **114**, 613 (1936).

über Compound B für diesen Stoff einen Smp. 135—139° (also mehr als 40° tiefer wie für Cortico-steron), ferner abweichende Drehungs- und Analysenwerte angeben. Auch über die biologische Wirksamkeit ist nichts erwähnt. Die erste Mitteilung kann somit nicht als Priorität für die Isolierung von Cortico-steron und die Auffindung seiner Wirksamkeit gelten. Abgesehen von dieser Unvollständigkeit stellt die genannte Mitteilung einen sehr wertvollen Beitrag zur Kenntnis des Nebennieren-Rinden-Hormons in zwei Richtungen dar. Erstens koordiniert sie die durch verschiedene Methoden erhaltenen Resultate in erfreulicher Weise. Insbesondere findet *Kendall* eine sehr ähnliche biologische Aktivität wie wir und bestätigt, dass Cortico-steron von allen bisher in reinem Zustand isolierten Substanzen die stärkste Wirksamkeit aufweist¹⁾. Ferner gibt er für Cortico-steron eine passende Formel, nämlich (V), die aus den oben erwähnten Gründen sicher im wesentlichen das Richtige trifft. Sie ist allerdings von ihm bisher ebensowenig wirklich bewiesen und stützt sich im wesentlichen auf Analogien mit dem hier bewiesenen Grundskelett der verschiedenen Substanzen der C₂₁-O₅-Reihe. Darüber hinaus führt *Kendall* jedoch die ersten sehr triftigen Gründe dafür an, dass das letzte, damals nicht untergebrachte Sauerstoffatom in Form einer sekundären Hydroxylgruppe enthalten ist. Diese wird in 12-Stellung angenommen, um die Reaktionsfähigkeit, auch nach Oxydation zur Ketogruppe (an Abbauprodukten) zu erklären²⁾.

Obwohl beabsichtigt war, die Struktur des Cortico-sterons erst nach definitiver Beweisführung mitzuteilen, soll wegen der erwähnten Publikation jetzt schon provisorisch darauf eingegangen werden.

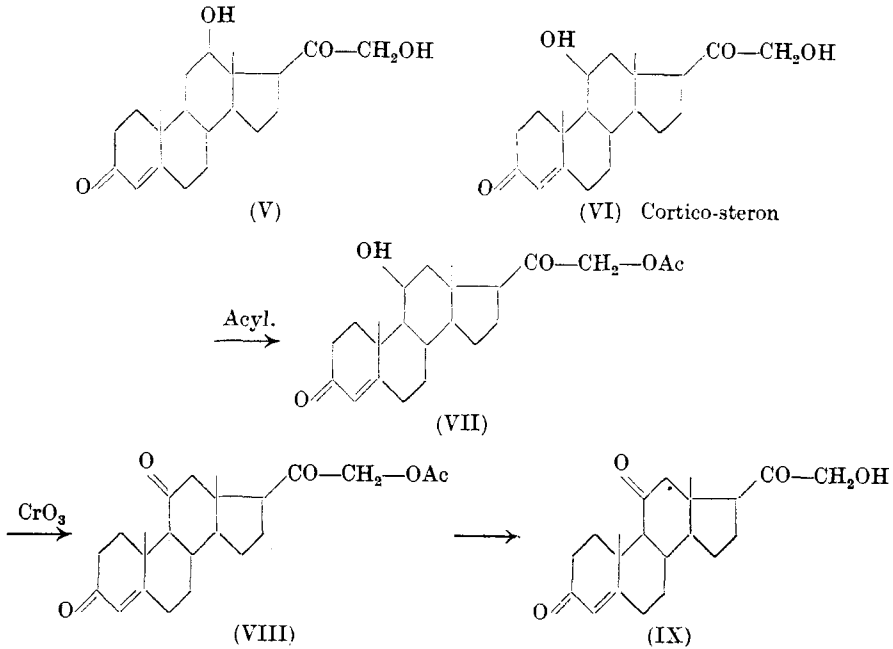
Dass tatsächlich das letzte Sauerstoffatom im Cortico-steron als sekundäres Hydroxyl vorhanden ist, lässt sich auf etwas direkterem Weg, als dem von *Kendall* und Mitarbeitern beschrittenen, bestätigen. Aus Cortico-steron (VI) lassen sich durch Acylierung leicht Monoester der voraussichtlichen Formel (VII) herstellen³⁾. Sie zeigen biologisch noch starke Cortin-Aktivität, reduzieren alkalische Silber-salzlösung und weisen das Spektrum der α, β -ungesättigten Ketone auf. Durch milde Oxydation mit Chromsäure lässt sich nun beispielsweise das Acetat (VII) zu einer Verbindung (VIII) dehydrieren, die ebenfalls die reduzierende Gruppierung noch enthält, was ohne Zwang nur so zu deuten ist, dass Dehydrierung an einer sekundären Hydro-

¹⁾ Sie erwähnen, dass sie noch stärker wirksame, amorphe, wasserlösliche Präparate herstellen konnten, was in Übereinstimmung mit Resultaten von *Wintersteiner* und *Pfiffner*, sowie mit unseren steht.

²⁾ Inzwischen erschien eine Mitteilung von *Kendall, Mason, Hoehn, McKenzie*, Proc. Staff Meetings Mayo Clinic **12**, 270 (1937), in der die 12-Stellung verworfen und 11-Stellung angenommen wird (Sitzung vom 28. April 1937).

³⁾ Schweiz. Patentanmeldung (1936).

xylgruppe eingetreten ist. Anschliessende saure Verseifung liefert das freie Oxyketon (IX), das somit als Dehydro-cortico-steron bezeichnet werden kann. Dieser Stoff sollte nach den von *Kendall* und



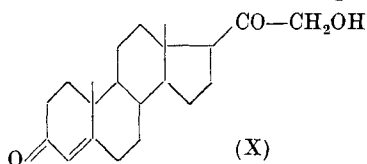
Dehydro-cortico-steron = Substanz A von *Kendall*.

Mitarbeitern beschriebenen Abbauresultaten mit dem von diesen Autoren aus Nebennieren direkt isolierten und als Compound A bezeichneten Stoff identisch sein, der ebenfalls noch starke Cortinaktivität besitzt. Er wurde hier durch direkte Isolierung noch nicht erhalten. In der Tat zeigte das Dehydro-cortico-steron nicht nur denselben Schmelzpunkt wie Compound A, sondern auch die Mischprobe mit einem freundlichst von *Kendall* übersandten Vergleichspräparat gab keine Depression. Auch die Krystallform war nicht zu unterscheiden, sodass die Identität wohl begründet ist. Die Substanz ähnelt dem Cortico-steron im Schmelzpunkt und Aussehen stark, krystallisiert etwas weniger gut als dieses und gibt mit ihm eine sehr deutliche Schmelzpunkts-Depression. Sie gibt jedoch die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure nicht, was die einfachste Unterscheidungsmöglichkeit bietet.

Die Anwesenheit einer sekundären Hydroxylgruppe darf im Cortico-steron somit als weitgehend gesichert gelten. Viel unsicherer ist jedoch die Unterbringung in 12-Stellung. Aus dem Verhalten des Cortico-sterons allein und seiner bisher bekannten Abbauprodukte kann vorläufig überhaupt noch keine Stellung mit Sicherheit abge-

leitet werden. Nimmt man aber die Analogie mit den Substanzen A, C, D, E, F.a und M als Hypothese weiter zu Hilfe, so kann, wie in der letzten Mitteilung¹⁾ gezeigt wurde, mit grosser Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass sich dieses Sauerstoffatom entweder in 11- oder in 12-Stellung befinden muss, wobei der 11-Stellung rein chemisch die grössere Wahrscheinlichkeit zukommt. Daher gibt Formel (VI) für Cortico-steron die heute wahrscheinlichste Struktur wieder. Die definitive Entscheidung muss dem genauen Beweis vorbehalten bleiben²⁾.

Abgesehen von der Unsicherheit der Stellung der letzten Hydroxylgruppe spricht für die Annahme, dass dem Cortico-steron wirklich die in Formel (VI) zum Ausdruck gebrachte Struktur zukommt, nicht nur die erwähnte Analogie mit den weitgehend bewiesenen Strukturen der Begleitstoffe (A, C, D usw.), sondern vor allem auch der Umstand, dass das künstlich aus Stigmasterin bereitete Desoxycortico-steron³⁾ (= 21-Oxy-progesteron) der Formel (X) in Tierversuch ungefähr dieselbe Cortin-Aktivität zeigte wie Cortico-steron selbst.



Es soll noch erwähnt werden, dass sich die in der VI. Mitteilung kurz erwähnte Substanz K als fast reines Cortico-steron erwiesen hat, so dass sie als neue Verbindung zu streichen ist. Gleichzeitig seien die folgenden Druckfehler berichtigt:

Errata:

Helv. 19, 407 (1936). Erste Zeile der Kleinschrift soll heissen: 2 cm³ Perjodatlösung (statt Perjodsäure).

Seite 403. In der Formel sind die zwei Methylgruppen an C₁₀ und C₁₃ vergessen.

Seite 1114. Zeile 8 soll heissen: Androsten-dion (statt Androsteron-dion).

Seite 1122, Zeile 2 soll heissen: 300 mg (statt 300 g).

Helv. 20, 820 (1937). In Formel (XII) ist die Methylgruppe an C₁₀ vergessen.

Experimenteller Teil.

Isolierung von Cortico-steron, Substanz M und E.

Die Anreicherung und die Abscheidung der krystallisierten Substanz H geschah genau wie in Mitteilung VI beschrieben. Die

¹⁾ M. Steiger und T. Reichstein, Helv. 20, 817 (1937).

²⁾ Kendall, Mason, Hoehn, McKenzie, Proc. Staff. Meetings Mayo Clinic 12, 270 (1937), geben in einer kurzen Mitteilung (ohne experimentelle Einzelheiten) an, dass 12-Stellung ausgeschlossen ist. Unter der Annahme, dass die Analogie mit den Stoffen der C₂₁-O₅-Reihe besteht, verbleibt somit noch 11-Stellung, die auch aus chemischen Gründen am wahrscheinlichsten ist, was von Steiger und Reichstein, Nature 139, 925 (1937) hervorgehoben wurde.

³⁾ M. Steiger und T. Reichstein, Nature 139, 925 (1937).

dort befindliche Angabe, dass die Isolierung von Substanz H nicht immer reproduzierbar ist, hat sich als unrichtig erwiesen. Unter genauer Befolgung der dort gegebenen Vorschrift, aber nach 2—3-wöchigem Stehen der mit $\frac{1}{2}$ Teil abs. Alkohol verflüssigten und mit einer Spur H-Krystallen angeimpften Fraktionen C.17.A.3. bei -10° (zweckmässig im Vakuum eingeschmolzen), trat inzwischen in allen Fällen reichliche Krystallisation ein. Zur Abtrennung wird direkt, oder nach Zusatz einer kleinen weiteren Menge trockenen Alkohols abgenutscht und mit wenig auf -80° gekühltem Alkohol, dann mit Benzol gewaschen. Die erhaltenen, etwas gelblichen, feinen Nadeln schmelzen unscharf bei ca. $160-170^{\circ}$. Sie sind sehr löslich in Chloroform und Aceton, wenig in Benzol. Insgesamt standen 4,1 g Fraktion C.17.A.3. zur Verfügung, die 900 mg der Krystalle lieferten. (Verarbeitung der öligen Teile vergleiche weiter unten. Weitere Mengen von Cortico-steron liessen sich auch noch aus den Keton-Fraktionen des „Äther-Restes“ gewinnen, die dementsprechend und entgegen der früher gemachten Angabe auch nicht biologisch ganz inaktiv, sondern nur schwächer aktiv, als die C.17-Fraktionen waren.) Die rohen H-Krystalle werden nun zweckmässig aus Aceton weiter gereinigt.

Sie werden in Aceton gelöst, im Vakuum eingedampft und der harzige Rückstand zur Entfernung aller Alkoholreste gut evakuiert. Es wird in wenig Aceton gelöst; diese Lösung gibt nach längerem Stehen kompakte, glänzende Krystalle. Die Lösung wird abdekantiert und die Krystalle mit wenig Aceton, dann mit Äther gewaschen. Verfügt man über Impfkryalle der derben Form, so tritt die Krystallisation sehr rasch ein und das Produkt ist viel reiner, als das langsam abgeschiedene. Man legt die bei $175-179^{\circ}$ korr. schmelzenden Anteile zusammen auf die Seite. Weniger reine können durch einmaliges Umkrystallisieren aus Aceton (Einengen und Impfen) rasch auf diesen Reinheitsgrad gebracht werden. Aus der Mutterlauge wird durch Einengen und eventuell geringen Ätherzusatz bei rascher Krystallisation meist noch eine zweite ebenso reine Portion erhalten. Die Mutterlauge wird im Vakuum getrocknet, mit wenig Aceton gelöst und mit der ca. vierfachen Menge Benzol, nicht ganz bis zur Trübung, versetzt. Nach ca. 2-tägigem Stehen (Impfen mit Subst. M beschleunigt stark) scheidet sich ein fast farbloses Krystallpulver ab. Es wird abgenutscht, mit Aceton-Benzol, dann mit Äther gewaschen. Die Krystalle schmelzen bei ca. 200° und stellen rohe Substanz M dar. Die Mutterlauge wird im Vakuum eingedampft, zur Vorreinigung mit wenig Aceton gelöst und mit viel frisch destilliertem Äther versetzt. Die ausfallenden Flocken werden nach einigem Stehen abfiltriert und nochmals analog aus Aceton mit Äther umgefällt und dann verworfen. Die klaren Lösungen werden auf ein kleines Volum eingeengt, mit Äther nicht ganz zur Trübung versetzt und

mit Cortico-steron geimpft. Es tritt rasch Krystallisation ein. Die Mutterlauge gibt meist nochmals eine reine Portion, dann kann erneut eine kleine Menge Substanz M wie oben abgetrennt werden usw. Aus 900 mg roher H-Krystalle wurden 750 mg Cortico-steron vom Smp. 175—179° sowie ca. 80 mg Substanz M erhalten. Die verbleibenden letzten Mutterlaugen waren äusserst gering und wurden mit dem öligen Teil der Fraktion C.17.A.3. vereinigt.

Trennung der öligen Teile der Fraktion C.17.A.3, aus der die 900 mg H-Krystalle gewonnen worden waren¹). Die im Vakuum schaumig getrocknete Masse wog noch 3,2 g und wurde mit 15 cm³ absolutem Benzol versetzt, wobei völlige Lösung eintrat. Dann wurde unter Schütteln allmählich mit 500 cm³ reinstem frisch destilliertem Benzol versetzt, wobei etwas Harz ausfiel. Das Benzol wurde in einen Scheidetrichter gegeben und das verbleibende Harz mit kleinen Portionen, insgesamt 250 cm³, reinstem destilliertem Wasser durchgeschüttelt und dieses ebenfalls in den Scheidetrichter gegeben. Die Mischung wurde 5 Minuten sehr energisch geschüttelt und längere Zeit stehen gelassen, wobei sich noch eine kleine Menge Harz an den Wänden abschied. Die Flüssigkeiten wurden in einen neuen Scheidetrichter übergegossen und alle Harzteile noch mit insgesamt 200 Wasser und 150 Benzol durchgeschüttelt und die Lösungen zur Hauptmenge gegeben. Das verbleibende Harz wurde mit Aceton gesammelt und im Vakuum vollständig getrocknet. (Erhalten wurden ca. 0,15 g Harz I aus C.17.A.3.) Nach mehrstündigem Stehen der Hauptlösungen wurde die klare, schwach gelbliche Wasserschicht abgelassen und in einem zweiten Scheidetrichter mit 250 cm³ frischem Benzol durchgeschüttelt, dann abgelassen. Die Benzolschichten wurden der Reihe nach noch mit einer frischen Wasserportion von 250 cm³ energisch geschüttelt. Die mit Sulfat getrockneten Benzolschichten wurden nach Filtration von Sulfat Spuren im reduzierten Vakuum (Badtemperatur 40°) stark eingengt, dann im vollen Vakuum gut getrocknet. Der Rückstand (1,75 g Benzollösliches aus C.17.A.3.) wurde in wenig Aceton gelöst, mit Äther nicht ganz bis zur Trübung versetzt und mit Cortico-steron geimpft 1—2 Wochen im Eisschrank gut verschlossen stehen gelassen. Es wurden noch ca. 150 mg Cortico-steron erhalten, frei von Substanz M. (Eine weitere Menge kann durch Chromatographie erhalten werden, vgl. spätere Mitteilung.) Das zum Trocknen der Benzollösung benützte Sulfat wurde mit reinstem Aceton ausgezogen und diese Auszüge zusammen mit den wässrigen Schichten im Vakuum bei 40° auf 20—25 cm³ eingengt, wobei sich allmählich Harz abschied. Dieser Rückstand wurde 5 Mal mit insgesamt 800 cm³

¹) Eine ähnliche, nur viel kompliziertere Methode geben *Mason, Myers, Kendall*, *J. Biol. Chem.* 114, 613 (1936), an, die aber dort auf Roh-Extrakte angewendet wird, während hier reine Keto-Fraktion vorliegt.

reinstem Benzol sehr energisch ausgeschüttelt, wobei das Harz sich allmählich verringerte, aber nicht ganz löste. Die mit Sulfat getrockneten Benzolauszüge wurden nach Filtration im reduzierten Vakuum stark eingeengt und zuletzt im vollen Vakuum ganz getrocknet. Es verblieben 0,7 g „Benzolextrakt aus C.17.A.3“. Diese wurden in wenig Aceton gelöst, mit Äther nicht ganz bis zur Trübung versetzt und gaben nach zweitägigem Stehen (resp. beim Impfen mit Substanz M schneller) ca. 150 mg Substanz M.

Das zum Trocknen der Benzolextrakte verwendete Sulfat wurde mit etwas Aceton ausgezogen und diese Auszüge zum benzolunlöslichen Harz-Wasser-Rückstand gegeben. Nach Entfernung des Acetons im Vakuum wurde so lange stehen gelassen, bis sich die kleinen Harzteilchen an der Wand abgesetzt hatten. Die klare wässrige Lösung wurde in einen kleinen Kolben abgegossen und die Harzreste nochmals mit etwas Wasser nachgewaschen.

Dieses unlösliche Harz wurde mit Aceton gesammelt und die Lösung im Vakuum vollständig getrocknet. Es verblieben 0,4 g „Harz II aus C.17A.3“. Zur Reinigung wurde in wenig Aceton gelöst und mit viel reinem Äther versetzt. Die ausfallenden Flocken wurden abfiltriert und nochmals umgefällt. Die vereinigten Lösungen wurden eingedampft, im Vakuum getrocknet, mit wenig Aceton gelöst, mit Toluol nicht ganz bis zur Fällung versetzt und nach Zugabe von 2 Tropfen Wasser gut verschlossen stehen gelassen. Über Nacht schieden sich Krystalle aus, die durch Dekantieren und Nachwaschen mit acetonhaltigem Toluol und dann mit Äther gereinigt wurden. Sie erwiesen sich als rohe Substanz E, die früher nicht direkt, sondern erst nach Wegoxydation der Begleitstoffe mit Silberoxyd erhalten wurde. Zur Reinigung wird aus Aceton-Wasser durch Einengen im Vakuum umkrystallisiert.

Die vom Harz abdekantierte wässrige Lösung wurde im Vakuum zur Trockne gebracht. Ausbeute 0,2 g „Wasserlösliches aus C.17.A.3.“, die ganz analog wie das Harz zuerst mit Aceton-Äther gereinigt wurden und dann aus feuchtem Aceton-Toluol krystallisierten. Die Krystalle waren wiederum Substanz E. Eine sehr kleine Menge von E liess sich auch aus dem Benzolextrakt, nach Abtrennung von Substanz M unter obigen Bedingungen (Aceton-Toluol-Wasser nach Impfen) gewinnen.

Cortico-steron.

Das vorgereinigte Cortico-steron kann leicht durch Krystallisation aus Aceton vollständig gereinigt werden. Um es mit möglichst geringen Verlusten sofort rein und farblos zu erhalten, schaltet man zweckmässig eine Vakuumdestillation ein. Im „Molekularkolben“ werden Portionen von ca. 300 mg im Vakuum bei 0,01 mm und ca. 190—200° Badtemperatur in ca. einer Stunde überdestilliert.

Es verbleibt ein geringer dunkler Rückstand. Das Destillat wird aus Aceton sofort rein weiss vom Smp. 179—181° korr. erhalten, der nach einer weiteren Krystallisation auf 180—182° korr. steigt. Er ist etwas abhängig von der Art des vorherigen Verreibens und etwas, wenn auch weniger, von der Erhitzungsgeschwindigkeit, trotzdem keine Zersetzung zu beobachten ist. Die Krystalle zeigen die im theoretischen Teil abgebildete Form. Die Umwandlungen in Alkohol lassen sich wie folgt demonstrieren. Die konzentrierte Alkohollösung gibt beim Erkalten meist sehr rasch die nadelige Form (Alkoholat). Diese wird besonders leicht aus Alkohollösung durch Benzolzusatz erhalten. Die mit den Nadeln durchsetzte absolute alkoholische Lösung ist verschlossen meist sehr lange haltbar (besonders bei nicht zu hochgradig gereinigten Präparaten). Lässt man einen winzigen Krystall der derben Form einfallen, oder entsteht ein solcher spontan, so wächst er und andere neu sich bildende Begleiter auf Kosten der Nadeln allmählich, bis diese zunächst in der Umgebung, und dann vollständig aufgezehrt sind. Es können auf diese Weise besonders schöne und reine Exemplare gezüchtet werden. Aus wässrigem Alkohol wird immer die derbe Form erhalten. Dies ist ein Grund für die frühere unrichtige Angabe, dass H-Substanz in Wasser leichter löslich ist als die meisten Vertreter der C₂₁-O₅-Serie. Die nadelige Form löst sich allerdings auffallend leicht in Wasser resp. in sehr stark verdünntem Alkohol; eine solche Lösung ist aber übersättigt und gibt nach einigen Tagen spontan, beim Impfen sofort eine Abscheidung der derben Form.

Zur Analyse wurde eine gepulverte Probe direkt im Schiffchen zunächst eine halbe Stunde bei 120° im Hochvakuum getrocknet, dann wurde bis zum Schmelzen erwärmt und 4—5 Minuten auf 185° gehalten. Nach raschem Erkalten im Vakuum und Einlassen trockener Luft wurde sofort in den Exsikkator gestellt und kurz darauf verbrannt.

3,939 mg Subst. gaben 10,51 mg CO ₂ und 3,12 mg H ₂ O		
C ₂₁ H ₃₀ O ₄ (346,24)	Ber. C 72,78	H 8,81%
C ₂₁ H ₂₈ O ₄ (344,22)	Ber. „ 73,21	„ 8,22%
	Gef. „ 72,77	„ 8,86%

Das $[\alpha]_D^{15}$ einer luft-trockenen Probe betrug $+223^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1$ in absolutem Alkohol). Die Substanz reduziert, in wenig Methanol gelöst, alkalische Silbersalzlösung sofort in der Kälte. Sie gibt die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure sehr stark. Das U. V.-Absorptions-spektrum ist im theoretischen Teil wiedergegeben.

Cortico-steron-acetat. 30 mg Cortico-steron, 140 mg Pyridin und 60 mg Essigsäure-anhydrid wurden eingeschmolzen 24 Stunden stehen gelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft und nach Zusatz von etwas Wasser nochmals im Vakuum eingengt. Das getrocknete Rohprodukt (Ausbeute ca. 30 mg) wurde zweimal aus wenig Aceton unter Ätherzusatz, dann nochmals aus sehr wenig

Aceton allein umkrystallisiert. Es zeigte verschiedene Formen (Körner oder Blättchenbüschel), die aber alle genau gleich schmolzen und zwar doppelt. Zunächst bei ca. 145—146,5°, worauf sich Nadeln bildeten, die bei 152,5—153° korr. nochmals schmolzen.

Zur Analyse wurde im Schiffchen im Hochvakuum 20 Minuten bei 100—110° getrocknet, dann zum Schmelzen erhitzt und noch 5 Minuten bei 150° belassen und im Vakuum abgekühlt.

3,821 mg Subst. gaben 10,02 mg CO ₂ und 2,79 mg H ₂ O		
C ₂₃ H ₃₂ O ₅ (388,26)	Ber. C 71,09	H 8,32%
	Gef. „ 71,52	„ 8,17%

Cortico-steron-butyrat. 50 mg Cortico-steron, 200 mg Pyridin und 100 mg Buttersäure-anhydrid wurden 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde mit wenig Pentan verrieben, das krystalline Produkt abgenutscht, mit Pentan und Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet und zunächst aus Äther, durch Einengen, dann aus wenig Aceton mit Äther umkrystallisiert. Es wurden 50 mg schöne Nadeln erhalten, die bei 170—171° korr. schmolzen. Dieses Derivat ist für die Charakterisierung sehr geeignet.

Cortico-steron-benzoat. 50 mg Cortico-steron wurden in 200 mg Pyridin gelöst und hierauf mit der Lösung von 50 mg frisch destilliertem Benzoylchlorid in 0,5 cm³ absolutem Äther versetzt. Nach kurzem Stehen wurde der Äther abdestilliert und der Rückstand mit Wasser verrieben und abfiltriert. Es wurde mit Wasser, dann mit Äther-Pentan-Mischung gewaschen, getrocknet und aus wenig Aceton mit Ätherzusatz umkrystallisiert. Erhalten wurden 52 mg vom Smp. 201—202° korr.

Saurer Bernsteinsäure-ester des Cortico-sterons 20 mg Cortico-steron, 80 mg Pyridin und 30 mg frisch gereinigtes Bernsteinsäure-anhydrid wurden durch leichtes Wärmen gelöst und 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, worauf sich Krystalle abge-schieden hatten, die unverändertes Bernsteinsäure-anhydrid darstellten. Es wurde in Äther aufgenommen, zweimal mit verdünnter Salzsäure gewaschen, die Estersäure mit wässriger Sodalösung ausgezogen und mit Salzsäure bei 0° gefällt. Die Fällung wird bald pulvrig. Sie wird abgenutscht, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Aus Aceton-Äther oder aus Äther allein durch Einengen werden schöne Nadelbüschel erhalten, die bei 194—195° schmelzen.

4,137 mg Subst. gaben 10,216 mg CO ₂ und 2,71 mg H ₂ O		
C ₂₆ H ₃₄ O ₇ (446,28)	Ber. C 67,23	H 7,68%
	Gef. „ 67,31	„ 7,33%

Cortico-steron-palmitat. Der Ester wurde wie oben aus 20 mg Cortico-steron, 80 mg Pyridin und 25 mg Palmitinsäurechlorid in 0,5 cm³ absolutem Äther bereitet und nach der Auf-

arbeitung durch Ausreiben mit Pentan gereinigt. Aus wenig Äther wird nach Pentanzusatz und langsamem Einengen ein farbloses Produkt erhalten, das Nadelchen darstellt, die bei 87—93° schmelzen. Es ist leicht löslich in Aceton und Äther und scheidet sich aus Methanol gallertig ab.

Analog wurde das Oleat hergestellt und als gallertige Masse vom Smp. 79—81° erhalten.

Dehydro-cortico-steron-acetat (VIII).

40 mg Cortico-steron-acetat (VII) wurden in 1 cm³ reinstem Eisessig gelöst und mit 1,5 cm³ 2-proz. Chromtrioxyd-Eisessiglösung (= 30 mg CrO₃) versetzt über Nacht stehen gelassen. Es wurde im Vakuum bei 25° Badtemperatur eingengt, mit Wasser versetzt, mit viel Äther ausgeschüttelt, der Auszug mit Wasser, dann mit Sodalösung gewaschen, getrocknet und stark eingengt. Es begann sehr rasch die Abscheidung ziemlich dicker Nadeln. Durch Zusatz von Pentan wird die Krystallisation vervollständigt. Erhalten wurden 20 mg farbloser Nadeln vom Smp. 178—180,5° korr. Die Mischprobe mit Cortico-steron-acetat schmolz schon bei 136—142°. Die Substanz reduziert in wenig Methanol gelöst alkalische Silber-salzlösung in der Kälte stark.

2,799 mg Subst. gaben 7,35 mg CO ₂ und 1,93 mg H ₂ O		
C ₂₃ H ₃₀ O ₅ (386,24)	Ber. C 71,46	H 7,84%
	Gef. „ 71,60	„ 7,72%

Die verwendete Probe war im Schiffchen zuerst im Hochvakuum eine Stunde bei 110° getrocknet, dann noch kurz bis zum Schmelzen erhitzt worden.

Dehydro-cortico-steron (IX).

15 mg obigen Acetates wurden mit 1 cm³ Alkohol, 1 cm³ Wasser und 0,1 cm³ konz. Salzsäure 40 Minuten unter Rückfluss gekocht. Hierauf wurde ohne Vakuum langsam bis zur Trübung eingedampft und erkalten gelassen. Die Krystallisation setzte bald ein und gab ziemlich dicke Nadeln, die roh bei ca. 177—180° korr. schmolzen, nach vorherigem Sintern bei 170°. Zur Reinigung wurde aus wenig Aceton unter Zusatz von Äther umkrystallisiert, wobei dicke Platten oder Körner resultierten, die in der äusseren Form dem Cortico-steron etwas ähnlich, jedoch mehr rechteckig begrenzt waren. Der Schmelzpunkt war unverändert, jedoch etwas von der Art des vorherigen Verreibens abhängig, eine stark verriebene Probe schmolz immer unscharf bei 170—180° korr. Die Krystalle des compound A von *Kendall*, sowie die Mischprobe verhielten sich genau gleich. Auch der Krystallhabitus war unter dem Mikroskop nicht zu unterscheiden. Beide Substanzen reduzieren alkalische Silber-salzlösung sofort bei Zimmertemperatur, geben aber die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure nicht. Die Mischprobe mit dem

Dehydro-cortico-steron-acetat (VIII) gibt starke Depression, ebenso die Mischprobe mit dem sehr ähnlich schmelzenden Cortico-steron selbst.

Abbau des Cortico-sterons mit Chromsäure zur Säure (IV).

20 mg Cortico-steron wurden in Eisessig gelöst und mit der Lösung von 20 mg Chromtrioxyd in wenig Eisessig über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der zuerst ausfallende braune Niederschlag hatte sich dann ganz gelöst. Es wurde im Vakuum bei 25° Badtemperatur stark eingeengt, mit Wasser versetzt und mit viel Äther ausgeschüttelt. Der Ätherlösung wurden die sauren Anteile mit Sodalösung entzogen und daraus wieder mit Salzsäure abgeschieden und in viel Äther aufgenommen. Nach dem Trocknen wurde stark eingeengt und krystallisieren gelassen. Aus der Mutterlauge wurde noch eine weitere Menge durch vollständiges Eindampfen, Entfernen von Essigsäureresten im Vakuum und Umkrystallisieren aus Äther durch Einengen erhalten. Zur völligen Reinigung wurde die Säure im Hochvakuum bei 0,1 mm und 220° Badtemperatur sublimiert, wobei sie völlig ohne Zersetzung übergeht. Der Schmelzpunkt lag dann bei ca. 266—272° korr. fast ohne Zersetzung.

3,054 mg Subst. gaben 8,12 mg CO₂ und 2,14 mg H₂O
 C₂₀H₂₆O₄ (330,21) Ber. C 72,68 H 7,94%
 Gef. „ 72,52 „ 7,84%

Der mit Diazomethan erhaltene Methylester schmilzt nach Sublimation im Hochvakuum (Badtemperatur 165° bei 0,01 mm) und einmaligem Umkrystallisieren aus Äther-Pentan bei 174—178° korr. Er stellt dann derbe Körner oder Prismen dar.

Substanz M.

Die rohe Substanz M schmilzt meist bei ca. 210—215° korr. unter leichter Zersetzung. Sie ist nach einmaligem Umkrystallisieren aus absolutem Alkohol (heiss in ziemlich viel lösen, filtrieren und auf kleines Volum einengen) meist schon vollständig rein. Da die Krystalle meist wenig deutlich ausgebildet sind, wurde eine Probe wie folgt umkrystallisiert: aus Alkohol, aus Aceton-Essigester durch Einengen, aus Aceton-Wasser, aus Aceton-Essigester, aus Alkohol. Sowohl die Analysenwerte, wie der Smp. 207—210° korr. unter leichter Zersetzung bei sehr langsamem Erhitzen blieben unverändert. Die Drehung war $[\alpha]_D^{25} = +167,20 \pm 2^{\circ}$ (c = 1,029 in absolutem Alkohol).

3,258 mg Subst. gaben 8,32 mg CO₂ und 2,52 mg H₂O
 3,700 mg Subst. gaben 9,425 mg CO₂ und 2,85 mg H₂O
 C₂₁H₃₀O₅ (362,24) Ber. C 69,57 H 8,35%
 C₂₁H₃₂O₅ (364,26) Ber. „ 69,18 „ 8,87%
 Gef. „ 69,64; 69,47 „ 8,65; 8,62%

Die erste Probe war nur zweimal aus Alkohol, die zweite wie angegeben, oftmals umkrystallisiert. Beide wurden im Hochvakuum 1 Stunde bei 95° getrocknet und waren dann nicht hygroskopisch. Da mit der sehr ähnlichen Substanz F.a keine Schmelzpunkt-Depression beobachtet wird, so wurde besondere Sorgfalt auf die Unterscheidungsmöglichkeit verwendet. Am besten lassen sich die beiden nach Umkrystallisieren aus absolutem Alkohol durch die Krystallform unter dem Mikroskop unterscheiden. F.a bildet dann (ebenso nach Umkrystallisieren aus Aceton) glänzende Rhomboeder, M dagegen die im theoretischen Teil skizzierten Formen, die manchmal fast nadelig, mit zugespitzten Enden erhalten werden; besonders reine Proben geben mehr die plattigen Aggregate von quergestreiften X-Formen. Aus Benzol (in Aceton lösen, mit Benzol versetzen und Aceton wegkochen) geben beide Substanzen Nadelbüschel, die zwar etwas verschieden krystallisieren, aber schlecht zu unterscheiden sind. Aus Aceton gibt M sehr verschiedene Formen, bei nicht zu rascher Abscheidung jedoch meist kugelförmige Aggregate, während F.a die Rhomboeder liefert. M reduziert in wenig Methanol gelöst alkalische Silbersalzlösung bei Zimmertemperatur sehr lebhaft und gibt die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure sehr intensiv, genau wie F.a. Bei der Oxydation mit Chromtrioxyd wird ebenfalls Adreno-steron erhalten.

Adreno-steron aus Substanz M. 10 mg Substanz M wurden in wenig Eisessig gelöst und mit 12 mg Chromtrioxyd in Eisessig 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde im Vakuum bei tiefer Temperatur eingedampft, der Rückstand mit Wasser versetzt, mit Äther ausgeschüttelt und die Ätherlösung mit verdünnter Schwefelsäure und Natronlauge neutralgewaschen. Nach dem Trocknen wurde auf ein kleines Volumen eingengt, worauf bald reichliche Abscheidung von Blättchen eintrat, die durch Zusatz von Pentan vervollständigt wurde. Nach Abnutschen und Waschen mit Äther-Pentan wurden 5 mg farbloser Blättchen vom Smp. 217—222° erhalten, die sich nach Mischprobe mit Adreno-steron als identisch erwiesen.

Die Mikroanalysen wurden von Hrn. Dr. *H. Gysel* im Mikrochem. Laboratorium des Instituts (Leitung Privatdoz. Dr. *M. Furter*) ausgeführt.

Laboratorium für organ. Chemie
Eidg. Techn. Hochschule Zürich.
