

71. Über Bestandteile der Nebennieren-Rinde¹⁾.

Die Substanzen J, K, N und O

von Marguerite Steiger und T. Reichstein.

(2. IV. 38.)

In dieser Mitteilung wird die Isolierung von drei neuen Substanzen: K, N und O beschrieben, sowie die Konstitution der Substanzen J, K und O.

Reinigung von Substanz J und Isolierung von Substanz K, O und einer weiteren Verbindung. Die Isolierung der Substanz J aus den ketonfreien Anteilen des „Ätherrestes“ ist früher beschrieben worden²⁾. Die Analyse ergab eine Bruttoformel $C_{21}H_{36}O_3$. Diese Substanz ist trotz ausgezeichnetem Krystallisiervermögen erst nach sehr oftmaligem Umkrystallisieren auf einen nahezu konstanten Schmelzpunkt zu bringen. Das Rohkrystallinat, aus dem sie gewonnen worden war, stellt ein Gemisch verschiedener mehrwertiger Alkohole dar, von denen wenigstens die Hauptmenge der Allo-pregnan-Reihe angehört. Es ist bekannt, dass sich solche Stoffe durch direkte Krystallisation nur schwer trennen lassen. Zur scharfen Reinigung von Substanz J und zur Isolierung der Begleitstoffe wurde daher das Rohprodukt mit Essigsäure-anhydrid und Pyridin bei Zimmertemperatur acetyliert und das Gemisch der Acetate chromatographisch nach der Durchlaufmethode getrennt. Es gelang so leicht, vier verschiedene Acetate von scharfen Schmelzpunkten zu erhalten.

In relativ grösster Menge wurde dabei das Diacetat von Substanz J erhalten, das bei 161° korr. schmilzt und bei alkalischer Verseifung sofort reine Substanz J lieferte, die auf diesem Wege am besten rein erhalten wird. Die Konstitution wird weiter unten gegeben.

Ein zweites Acetat vom Smp. 176—177° korr. erwies sich als Triacetat eines neuen Stoffes, der als Substanz K bezeichnet wurde³⁾ und dem die Bruttoformel $C_{31}H_{36}O_4$ zukommt. Die Konstitution wird weiter unten gegeben.

Ein drittes Acetat schmolz bei 252° korr. und erwies sich als Diacetat eines neuen Triols, das daraus durch alkalische Verseifung gewonnen wurde. Das freie Triol schmolz bei 223° korr. und wurde

¹⁾ 16. Mitt. Helv. **21**, 171 (1938).

²⁾ T. Reichstein, Helv. **19**, 1107 (1936).

³⁾ Der früher als Substanz K bezeichnete Stoff (Helv. **19**, 1116 (1936)) hat sich inzwischen als Corticosteron erwiesen (Helv. **20**, 961 (1937)), sodass dieser Buchstabe wieder frei geworden ist.

als Substanz O bezeichnet. Die Analyse stimmt auf die Bruttoformel $C_{21}H_{36}O_3$. Es liegt somit ein Isomeres von Substanz J vor, dessen Konstitution ebenfalls weiter unten gegeben wird.

Schliesslich wurde noch ein viertes Acetat erhalten, das bei 210° korr. schmilzt, und sich durch seine besondere Schwerlöslichkeit auszeichnet. Es unterscheidet sich ferner von den drei obengenannten dadurch, dass es alkalische Silberdiamminlösung reduziert. Es enthält demnach wahrscheinlich eine Oxy-ketongruppierung in der Seitenkette. Dies steht in scheinbarem Widerspruch mit der Tatsache, dass dieser Stoff aus einer „ketonfreien“ Fraktion isoliert wurde. Es ist jedoch schon früher berichtet worden¹⁾, dass beispielsweise die Substanzen C und D, die beide die Ketolgruppierung $-\text{COH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ besitzen, nur sehr schwer mit *Girard*-Reagenz zur Umsetzung zu bringen sind. Das genannte Acetat vom Smp. 210° wurde bisher noch nicht verseift, da Substanzen, die Silberlösung reduzieren, gegen Alkali meist empfindlich sind. Es wurde daher dem Grundkörper auch noch kein Name gegeben, da es noch unsicher ist, ob er nicht mit einer bereits bekannten Substanz identisch ist.

Es ist anzunehmen, dass allen diesen vier Substanzen keine oder nur sehr geringe Cortinwirksamkeit zukommt, da sie aus einer Fraktion isoliert wurden, die bei einer Dosierung von 2 mg pro Tag und Ratte im *Everse-deFremercy*-Test unwirksam war.

Isolierung von Substanz N. Ferner liess sich aus der stark cortinwirksamen Ketofraktion C.17. A.2²⁾ noch eine für unser Laboratorium neue Substanz der $C_{21}O_4$ -Reihe erhalten, und zwar aus den Mutterlaugen des Corticosterons. Sie krystallisiert aus wässrigem Aceton als Hydrat in Blättchen oder viereckigen Sternen, von untenstehender Form, die manchmal fast quadratisch begrenzt

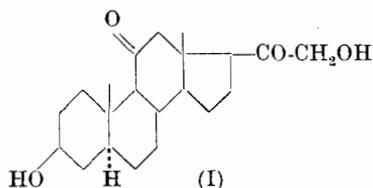


sein können. Sie wurde Substanz N genannt. Beim Erwärmen werden die Krystalle gegen 120° opak und schmelzen bei etwa 190° korr. Für eine völlige Reinigung ist die wasserfreie Form besonders geeignet. Sie wird nach Trocknung des Hydrats aus wenig Aceton oder aus Benzol unter Zusatz von etwas Aceton in glänzenden Spiessen erhalten, die bei $189-191^{\circ}$ korr. schmelzen. Sie zeigen eine spez. Drehung von $(\alpha)_D^{19} = +93,8^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,4$ in abs. Alkohol). Die Analyse stimmt auf eine Bruttoformel $C_{21}H_{32}O_4 \pm H_2$. Der Stoff reduziert alkalische Silberdiamminlösung, zeigt aber keine selektive Absorption im U.V.-Absorptionsspektrum in der Gegend von $240 \text{ m}\mu$. Er enthält also wahrscheinlich eine Ketolgruppierung, jedoch keine α, β -ungesättigte Ketongruppierung. Es dürfte wahrscheinlich keine oder nur geringe Cortinwirksamkeit besitzen. Die biologische Prü-

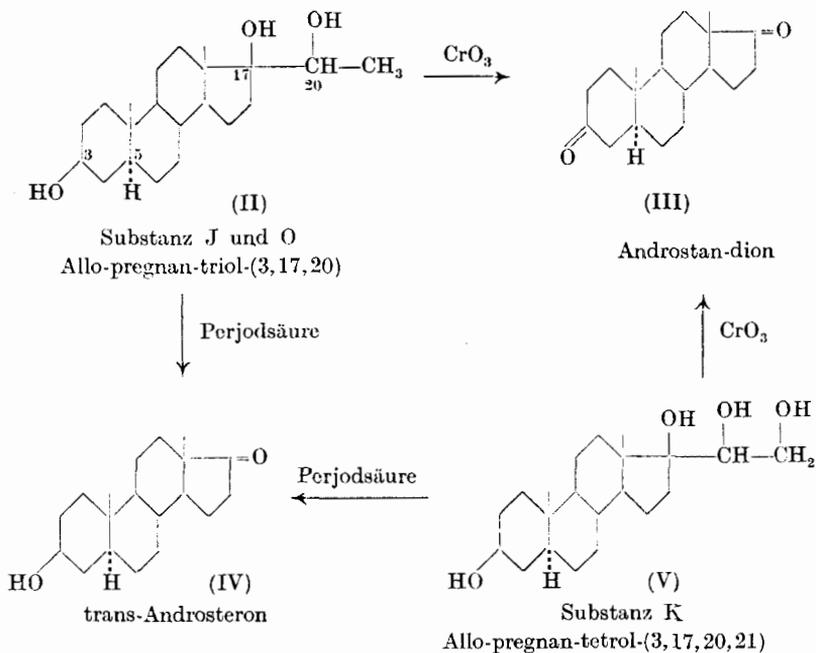
¹⁾ Helv. 19, 38, 1110 (1936).

²⁾ Helv. 19, 1107 (1936).

fung konnte noch nicht durchgeführt werden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass Substanz N mit Compound H von *Kendall* und Mitarb.¹⁾ identisch ist, für welche diese Autoren die Formel (I) bewiesen haben. Sie geben allerdings für compound H einen Schmelzpunkt von 172—176° an.



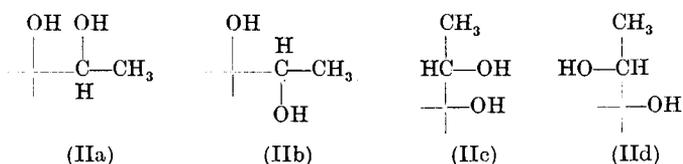
Konstitution von Substanz J, K und O. Substanz J besitzt Formel (II), in der lediglich die sterische Anordnung an den Kohlenstoffatomen No. 17 und 20 unbestimmt ist. Diese Formel ergibt sich eindeutig daraus, dass mit Chromsäure Androstan-dion-(3,17) (III), mit Perjodsäure dagegen *trans*-Androsteron (IV) erhalten wird. Die Oxydation mit Chromsäure wurde schon früher durchgeführt²⁾; die Identifizierung des entstandenen Ketons aber bisher zurückgestellt.



¹⁾ *H. L. Mason, W. M. Hoehn, B. F. McKenzie, E. C. Kendall, J. biol. Chem.* **120**, 719 (1937).

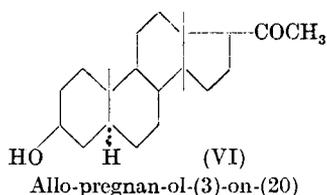
²⁾ *Helv.* **19**, 1126 (1936).

Dieselbe Formel (II) besitzt nun auch Substanz O, da sie sowohl mit Chromsäure als mit Perjodsäure dieselben Produkte liefert wie Substanz J. Bei der Oxydation mit Perjodsäure wurde hier übrigens auch der entstehende Acetaldehyd eindeutig nachgewiesen. Die beiden Substanzen J und O können sich somit nur durch die räumliche Anordnung an den zwei Kohlenstoffatomen 17 und 20 voneinander unterscheiden. Es sind insgesamt vier Isomere der Formel (II) möglich, die an den Kohlenstoffatomen 17 und 20 verschiedene Konfigurationen besitzen, nämlich die folgenden (IIa)—(IId):



Eine dieser Formeln muss Substanz J, eine andere der Substanz O zukommen.

Für Substanz J wurde ausserdem festgestellt, dass sie sich beim Erwärmen mit Mineralsäuren teilweise in Allo-pregnanol-(3)-on-(20) (VI) umlagern lässt. Substanz K besitzt Formel (V); dies folgt aus dem analogen Verlauf der Oxydationen, wobei dieselben Produkte (III) und (IV) erhalten werden. Bei der Oxydation mit Perjodsäure wird hier jedoch nicht Acetaldehyd, sondern Formaldehyd erhalten.



Substanz J, K und O sind die ersten aus Nebennieren isolierten Sterinderivate (ausser Cholesterin selbst, das reichlich darin vorkommt), die in 11-Stellung nicht mit Sauerstoff substituiert sind.

Ein Stereoisomeres von Substanz J und O, das sich vom Epikoprostanol-Typus ableitet und somit mindestens an den Kohlenstoffatomen 3 und 5 andere Konfiguration besitzt wie J und O, die sich vom Cholestanoltypus ableiten, ist von *Butler* und *Marrion*¹⁾ aus dem Harn von weiblichen Patienten mit „adreno-genitalem Syndrom“ isoliert worden. Im Harn normaler Menschen konnte es nicht aufgefunden werden. Ein Isomeres von unbekannter Konstitution ist ferner schon früher von *Haslewood*, *Marrion* und *Smith*²⁾ aus dem Harn trächtiger Stuten isoliert worden. Vor kurzem berichteten

¹⁾ G. C. Butler, G. F. Marrion, J. biol. Chem. **119**, 565 (1937).

²⁾ G. A. D. Haslewood, G. F. Marrion, E. R. Smith, Biochem. J. **28**, 1316 (1934).

Marker, Kamm und Mitarbeiter¹⁾ über die Isolierung desselben Stoffes aus analogem Material; daneben wurde ein weiteres Isomeres derselben Bruttoformel $C_{21}H_{36}O_3$ aufgefunden. Beide geben mit Digitonin keine Fällung und unterscheiden sich auch in den Schmelzpunkten so stark von J und O, dass eine Identität ausgeschlossen ist.

Ein Stoff, dem die Struktur (V) zukommt und der daher möglicherweise mit Substanz K identisch ist, da er sich wenigstens wie diese auch vom Cholestanoltypus ableitet, ist kürzlich von *Kathol, Logemann* und *Serini*²⁾ durch Teilsynthese bereitet worden. Da keine Angaben über Schmelzpunkt usw. vorliegen, so ist es nicht möglich zu entscheiden, ob das genannte 3,17,20,21-Tetraoxy-allo-pregnan mit unserer Substanz K identisch ist oder nicht³⁾.

Wir danken der *Gesellschaft für Chemische Industrie*, Basel; der *Haco-Gesellschaft*, Gümligen; und der *N. V. Organon*, Oss, für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil.

Isolierung der Substanzen J, K und O, sowie einer reduzierenden Substanz.

Die Abscheidung des Rohkrystallisates aus dem „phenol- und ketonfreien Ä.-Rest“ geschah wie früher beschrieben⁴⁾. Das Produkt schmolz bei 180—200°. Durch mehrwöchiges Stehenlassen der Mutterlaugen in einem Gemisch von Aceton-Toluol und etwas Wasser wurden noch erhebliche weitere Mengen erhalten. Dabei schied sich ein Teil in einheitlichen, kugeligen Drusen aus, die für sich mechanisch möglichst ausgesucht wurden. Es wurden etwa 60 mg davon erhalten. Sie schmolzen bei 225—250° korr. und gaben beim Umkrystallisieren aus abs. Alkohol feine Nadeln, die bei 253—260° korr. unter Zersetzung schmolzen. In wenig Methanol gelöst reduzierten sie alkalisch Silberdiammin-lösung bei Zimmertemperatur rasch. Die Mischprobe mit Substanz C⁵⁾ gab keine Depression. Es ist also offenbar etwas Substanz C bis in diese Fraktion gelangt.

Die von den genannten Drusen durch Aussuchen möglichst befreiten Rohkrystalle wogen 1,36 g. Sie wurden zunächst aus Alkohol-Äther, dann aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Erhalten wurden so 880 mg flache Nadeln (Teil B), sowie durch völliges Eindampfen der Mutterlaugen im Vakuum, Anreiben mit Wasser, Abnutschen und Waschen mit etwas Wasser 480 mg (Teil C) als leicht bräunliches, undeutlich krystallines Pulver. Eine Portion von Teil B wurde

¹⁾ *R. E. Marker, O. Kamm, H. M. Crooks, T. S. Oakwood, E. L. Wittle, E. J. Lawson*, Am. Soc. **60**, 210 (1938).

²⁾ *J. Kathol, W. Logemann, A. Serini*, Naturwiss. **25**, 682 (1937).

³⁾ Herr Dr. *A. Serini*, Berlin hatte die Freundlichkeit, uns eine Probe des synthetischen Tetrols zuzusenden. Es schmolz bei 233—235° korr. und ist somit nicht mit Substanz K identisch.

⁴⁾ *Helv.* **19**, 1107 (1936).

⁵⁾ *Helv.* **19**, 29, 1107 (1936).

nochmals aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert und gab 50 mg farb-
loser Nadeln (Teil A). Die Mutterlauge wurde eingedampft und mit
Teil B vereinigt. Teil A wurde unter dem Mikroskop gegen 120° opak,
schmolz teilweise unter Umwandlung bei $197\text{--}202^{\circ}$, wobei die ver-
festigten Anteile definitiv bei $208\text{--}210^{\circ}$ korr. schmolzen. Die Misch-
probe mit Substanz J gab keine Depression. Nach dem Trocknen
im Hochvakuum wurde eine spez. Drehung von $(\alpha)_{\text{D}}^{20} = -5,5^{\circ} \pm 1^{\circ}$
($c = 1,818$ in abs. Alkohol) beobachtet (18,6 mg Subst. zu $1,0122 \text{ cm}^3$;
 $l = 1 \text{ dm}$; $\alpha_{\text{D}}^{20} = -0,10^{\circ}$). Die Probe war aber nach dem Resultat der
Chromatographie noch nicht ganz rein.

Acetylierung von Teil A. 50 mg der oben als Teil A be-
zeichneten, weitgehend gereinigten Substanz J wurden in 1 cm^3
trockenem Pyridin gelöst und mit $0,8 \text{ cm}^3$ Essigsäure-anhydrid ver-
mischt 30 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann
wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther gelöst
und mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen,
getrocknet und eingedampft. Der Rückstand krystallisierte und
schmolz roh bei $154\text{--}160^{\circ}$. Er wurde bei $0,002 \text{ mm}$ und 170° Bad-
temperatur im Molekularkolben sublimiert. Das Sublimat wurde in
wenig Benzol gelöst, mit 10 Teilen Pentan verdünnt über eine mit
Pentan hergestellte Säule von 1 g Aluminiumoxyd (*Merck*, standardi-
siert nach *Brockmann*) filtriert. Es wurde zunächst mit Pentan
nachgewaschen. Dies nahm nur Spuren von Verunreinigungen auf.
Dann wurde zunächst erschöpfend mit einer Mischung von 20%
Benzol und 80% Pentan, anschliessend mit einer Mischung gleicher
Teile Benzol und Pentan, dann mit reinem abs. Benzol, dann mit
abs. Äther und schliesslich mit Aceton nachgewaschen.

Weitaus die Hauptmenge des Materials wurde mit den Benzol-
Pentangemischen und mit abs. Benzol abgelöst. Diese Anteile
schmolzen nach dem Eindampfen des Lösungsmittels alle bei 160° .
Sie wurden vereinigt und aus Pentan durch Einengen umkrystallisiert.
Es resultierten 32 mg zugespitzter Stäbchen vom Smp. $161\text{--}162^{\circ}$ korr.,
die das Diacetat von Substanz J darstellen. Aus den Äther- und
Acetonfraktionen wurden 5 mg des bei 177° schmelzenden Triacetates
von Substanz K erhalten. Die verbliebenen Reste stellten Gemische
dar, die mit den analogen Fraktionen der grösseren Trennung ver-
einigt wurden.

Acetylierung und Trennung von Teil B. Die 350 mg des
als Teil B bezeichneten Gemisches wurden wie oben mit 6 cm^3 Pyridin
und 5 cm^3 Acetanhydrid 30 Stunden bei Zimmertemperatur stehen
gelassen und ganz analog aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde im
Hochvakuum bei $0,001 \text{ mm}$ und 155° Badtemperatur im Molekular-
kolben sublimiert. Es verblieb praktisch kein Rückstand. Das Subli-
mat wurde in wenig Benzol gelöst, mit 10 Teilen Pentan verdünnt,

auf eine mit Pentan hergestellte Säule von 12 g Aluminiumoxyd gebracht und wie oben nach der Durchlaufmethode getrennt. Es wurden die folgenden Fraktionen aufgefangen:

Fraktion	Lösungsmittel	Eigenschaften des Rückstandes (nach Zusatz von Äther-Pentan)
1	40 cm ³ Pentan	Spuren Öl
2	20 „ 20% Benzol-80% Pentan	„ Krystalle
3	20 „ 20% „ 80% „	„ „
4	20 „ 50% „ 50% „	Krystalle Smp. 160°
5	20 „ 50% „ 50% „	„ „ 161°
6	20 „ 50% „ 50% „	„ „ 161°
7	20 „ 50% „ 50% „	„ „ 161°
8	20 „ 50% „ 50% „	„ „ 161°
9	20 „ Benzol (abs.)	„ „ 161°
10	40 „ „	„ „ 161°
11	60 „ „	Spuren v. „ 161°
12	40 „ Äther (abs.)	Krystalle „ 175°
13	40 „ „	„ „ 174°
14	60 „ „	Spuren v. „ 172°
15	40 „ Aceton	Krystalle „ 154—175°
16	40 „ „	Spuren
17	20 „ „	—

Die Fraktionen 2—11 gaben beim Umkrystallisieren aus Äther-Pentan 205 mg reines J-diacetat vom Smp. 161—162° korr., sowie aus den Mutterlaugen noch 35 mg Körner, die bei 154—224° schmolzen. Aus letzteren liessen sich noch 25 mg reines J-diacetat gewinnen. Der Rest (ca. 10 mg) bestand zur Hauptsache aus dem hoch schmelzenden Diacetat von Substanz O und wurde mit der analogen Fraktion aus Teil C vereinigt. Die Fraktionen 12—14 gaben zusammen aus Äther-Pentan sofort 57 mg reines Triacetat von Substanz K vom Smp. 177° in Form länglicher Blättchen. Die Fraktionen 15—17 gaben dieselbe Substanz.

Eine weitere Menge von 480 mg des Teils B wurde analog getrennt und gab 300 mg reines J-diacetat vom Smp. 161°, 128 mg reines K-triacetat vom Smp. 177° sowie sehr geringe Mengen unreines O-diacetat, die wie die Zwischenfraktionen und Mutterlaugen mit den analogen Fraktionen der nachfolgenden Chromatographie verfolgt und nochmals chromatographiert wurden.

Trennung von Teil C. Die 480 mg des als Teil C bezeichneten Gemisches wurden wie oben mit 5 cm³ Essigsäure-anhydrid und 6 Teilen Pyridin 30 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther

gelöst, mit Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt. Nach Zusatz von Pentan krystallisierte bald ein Teil aus. Die Krystalle wurden nochmals aus Äther durch Einengen und Zusatz von Pentan umkrystallisiert. Sowohl die Krystalle als die vereinigten und eingedampften Mutterlaugen wurden im Hochvakuum im Molekularkolben bei 0,001 mm und 185—190° Badtemperatur sublimiert. Bei der Sublimation der Mutterlaugen verblieb ein geringer aber merkbarer Rückstand, die Krystalle hinterliessen praktisch keinen solchen. Die sublimierten Krystalle wurden aus Benzol umkrystallisiert und mit Benzol-Pentan gewaschen. Es wurden aneinandergereihte Blättchen erhalten, die äusserlich wie Nadeln aussehen. Sie schmolzen bei 208—210°. Eine weitere Krystallisation aus Benzol brachte den Schmelzpunkt noch auf 210° korr., der sich nicht mehr merklich steigern liess. Dieses Acetat reduziert alkalische Silberdiamminlösung. Es wurden 97 mg davon erhalten.

Die Mutterlaugen des reduzierenden Acetates wurden mit den sublimierten Mutterlaugen der ersten Krystallisation (Hauptmenge) vereinigt, da die letzteren aus Benzol nicht krystallisierten. Es wurde in wenig Benzol gelöst, mit viel Pentan verdünnt und auf eine mit Pentan bereitete Säule von 10 g Aluminiumoxyd gegossen und wie bei Teil B chromatographiert. Erhalten wurden die folgenden Fraktionen:

Fraktion	Lösungsmittel	Eigenschaften des Rückstandes (nach Zusatz von Äther-Pentan)
1	20 cm ³ 20% Benzol-80% Pentan	Krystalle Smp. 226—242
2	20 „ 20% „ 80% „	„ „ 228—243 s. 155
3	20 „ 20% „ 80% „	„ „ 228—244 s. 205
4	25 „ 20% „ 80% „	„ „ 234—243 s. 190
5	25 „ 20% „ 80% „	„ „ 233—246 s. 180
6	40 „ 20% „ 80% „	„ Spuren
7	20 „ 50% „ 50% „	„ Smp. 237—245 s. 180
8	30 „ 50% „ 50% „	„ „ 238—245 s. 225
9	30 „ 50% „ 50% „	„ Spuren
10	20 „ Benzol (abs.)	„ Smp. 240—246
11	20 „ „	„ „ 238—245
12	30 „ „	„ „ 226—243 s. 165
13	40 „ „	„ „ 223—240 s. 160
14	40 „ „	„ Spuren
15	20 „ Äther	„ Smp. 167—199
16	20 „ „	„ „ 190—208
17	30 „ „	„ Spuren
18	30 „ Aceton	„ Smp. 168—176
19	30 „ „	„ Spuren
20	20 „ „	„ Spuren

s == sintern

Die Fraktionen 1—6 gaben zusammen aus Äther 125 mg Krystalle vom Smp. 250° korr. Aus den Mutterlaugen wurde noch eine weitere kleine Menge davon erhalten, dann Körner, die sich zur Hauptsache bei 155—160° verflüssigten, aber noch etwas Nadeln enthielten, die erst gegen 205—210° schmolzen. Die Fraktionen 7—14 gaben ebenfalls noch hauptsächlich dieselben Krystalle vom Smp. 250°, die das Diacetat von Substanz O darstellen. Aus den Fraktionen 16 und 17 wurde durch Umkrystallisieren aus wenig Benzol und Nachwaschen mit Benzol-Pentan noch etwas des reduzierenden Acetates vom Smp. 210° erhalten. Die Fraktionen 18—20 gaben eine kleine Menge K-triacetat. Die Zwischenfraktionen und Mutterlaugen der Umkrystallisationen gaben nach Vereinigung mit analogen Fraktionen der obigen Trennungen von Teil A und Teil B und nochmaliger Chromatographierung noch kleine Mengen der reinen vier Acetate. Der verbleibende Rest an Gemischen war sehr gering.

Substanz J.

Das Diacetat vom Smp. 161—162° korr. krystallisiert aus viel Pentan oder Äther-Pentan durch Einengen in zugespitzten, dicken Nadeln, aus Methanol in groben Körnern. Seine Lösung in wenig Methanol reduziert alkalische Silberdiamminlösung nicht. Die spez. Drehung beträgt: $[\alpha]_D^{19} = +24,6^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,114$ in Aceton) (21,4 mg Subst. zu 1,0122 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{19} = +0,52^\circ$).

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 0,001 mm und 160—165° Blocktemperatur sublimiert.

3,881 mg Subst. gaben 10,10 mg CO₂ und 3,32 mg H₂O
 C₂₅H₄₀O₅ (420,57) Ber. C 71,39 H 9,59%
 Gef. „ 70,97 „ 9,57%

Eine Probe von 10 mg des Diacetates wurde in 0,25 cm³ Eisessig mit 5 mg Chromtrioxyd 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum eingengt, mit Wasser versetzt, mit Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösung mit verdünnter Schwefelsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand bestand aus unverändertem Ausgangsmaterial. Es ist somit die tertiäre Hydroxylgruppe in 17-Stellung frei, die beiden sekundären sind acetyliert.

Reine Substanz J aus Diacetat. 256 mg Diacetat vom Smp. 161° wurden mit 4,1 cm³ 5-proz. Kaliumhydroxydlösung in Methanol (= 205 mg KOH) 15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Dann wurde mit 3 cm³ Wasser versetzt, mit Kohlendioxyd bis zur Neutralisation des freien Alkalis (Prüfung mit Resorcingelb) behandelt und im Vakuum stark eingengt. Die ausfallenden Nadeln wurden abgenutscht und mit Wasser gewaschen. Unter dem Mikroskop zerfielen sie gegen 170° in Körnchen, die bei 217—218° korr. schmolzen. Durch Umkrystallisieren aus wässrigem Alkohol wurden flache Nadeln erhalten

die bei 130° opak wurden und bei etwa 206—212° korr. unter Umwandlung schmolzen¹⁾. Die spez. Drehung betrug nach Trocknung im Hochvakuum bei 80°: $[\alpha]_D^{19} = -7,9^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,767$ in absol. Alkohol) (17,9 mg Substanz zu 1,0122 cm; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{19} = -0,14^\circ$).

Allo-pregnan-ol-(3)-on-(20) (VI) aus Substanz J. 50 mg Substanz J wurden in 5 cm³ Methanol gelöst, mit 2 cm³ 4-n. wässriger Schwefelsäure versetzt und 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Hierauf wurde mit etwas Wasser verdünnt, das Methanol im Vakuum völlig entfernt und der Rückstand mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit Soda gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand krystallisierte aus verdünntem Alkohol sehr langsam und unvollständig.

Zur Vorreinigung wurde er daher zunächst wieder getrocknet, in 3 cm³ Methanol gelöst, mit 100 mg *Girard*-Reagens T²⁾, sowie 100 mg Eisessig versetzt eine halbe Stunde unter Rückfluss gekocht. Dann wurde auf -10° abgekühlt und mit 95% der zur Neutralisation des Eisessigs erforderlichen Menge Natronlauge, die mit Wasser auf 20 cm³ verdünnt und ebenfalls auf -5° gekühlt war, versetzt. Es wurde zweimal mit Äther ausgeschüttelt und die Ätherlösung zweimal mit 10% Methanol ausgewaschen. Die erste wässrige Phase, sowie die methanolischen Washwässer wurden vereinigt, mit Salzsäure bis zur rein blauen Reaktion auf Kongo versetzt, im Vakuum eingeengt und mit Äther ausgeschüttelt. Die so gewonnene Ätherlösung enthielt die Ketofraktion; sie wurde mit wässriger Lauge, dann mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt, wobei bald Krystallisation eintrat. Die mit etwas Äther gewaschenen Krystalle wurden im Hochvakuum sublimiert, schmolzen dann aber immer noch unscharf bei 180—190°. Sie wurden daher in wenig Benzol gelöst, die Lösung mit Pentan verdünnt und über eine mit Pentan hergestellte Säule von 0,5 g Aluminiumoxyd (*Merck*) filtriert. Es wurde zunächst mit Benzol-Pentan nachgewaschen, das nur Spuren Öl ablöste. Dann wurde mit abs. Äther eluiert, wobei sofort beim Einengen etwa 5 mg Blättchen vom Smp. 194—197° erhalten wurden. Die Mischprobe mit reinem Allo-pregnanol-(3)-on-(20)³⁾ vom Smp. 197° korr. zeigte keine Depression.

Androstan-dion-(3,17) (III) aus Substanz J. 30 mg Substanz J wurden mit 50 mg Chromtrioxyd in 2,5 cm³ Eisessig 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum stark eingeengt, mit Wasser verdünnt, mit Äther ausgeschüttelt und die Ätherlösung mit verdünnter Schwefelsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand

¹⁾ Manchmal wird nach Umwandlung gegen 210° noch ein weiterer Smp. bei 223° korr. beobachtet.

²⁾ A. *Girard*, *C. Sandulesco*, *Helv.* **19**, 1095 (1936).

³⁾ A. *Butenandt*, *L. Mamoli*, *B.* **67**, 1897 (1934).

schmolz roh bei 120—132°, nach Umkrystallisieren aus Äther-Pentan wie früher¹⁾ bei 126°. Er wurde in einer Spur Benzol gelöst, mit viel Pentan verdünnt und über eine mit Pentan hergestellte Säule von 0,8 g Aluminiumoxyd (*Merck*, standardisiert nach *Brockmann*) filtriert und zunächst mit Pentan gewaschen, wobei nur Spuren Öl eluiert wurden. Dann wurde mit Äther eluiert. Das Filtrat wurde auf ein kleines Volumen eingengt und mit viel Pentan versetzt. Es wurden Blättchen erhalten, die bei 132° korr. schmolzen. Nach nochmaligem Umkrystallisieren war der Smp. 132—133° korr. Die Mischprobe mit reinem Androstan-dion-(3,17)²⁾, das genau gleich schmolz, gab keine Depression.

Zur Analyse wurde im Vakuum bei 0,002 mm und 150° Blocktemperatur sublimiert.

3,600 mg Subst. gaben 10,45 mg CO₂ und 3,13 mg H₂O

C₁₉H₂₈O₂ (288,41) Ber. C 79,12 H 9,79%

Gef. „ 79,16 „ 9,73%

Trans-Androsteron (IV) aus Substanz J. 20 mg Substanz J wurden in 4 cm³ Methanol gelöst, mit 18 mg Perjodsäure in 1 cm³ Wasser, sowie mit 0,25 cm³ 2-n. Schwefelsäure versetzt und die Mischung 20 Stunden bei 20° stehen gelassen. Dann wurde mit 0,25 cm³ 2-n. Sodalösung sowie 2 cm³ Wasser versetzt und unter Vorschaltung einer auf -80° gekühlten Vorlage im Vakuum auf 3 cm³ eingengt.

Die im eingengten Rückstand ausgefallenen Krystalle wurden abgenutscht und mit etwas Wasser gewaschen. Sie wurden beim Erwärmen gegen 125° opak und schmolzen bei 164—171°. Zur Reinigung wurden sie aus wässrigem Methanol umkrystallisiert. Es wurden Stäbchen erhalten, die bei 130° opak wurden und bei 176° bis 177° korr. schmolzen. Reines trans-Androsteron³⁾ schmolz bei 178° korr., die Mischprobe bei 176—178°.

¹⁾ Helv. **19**, 1126 (1936).

²⁾ A. Butenandt, K. Tscherning, Z. physiol. Ch. **229**, 185 (1934).

³⁾ L. Ruzicka, M. Goldberg, H. Brüngger, Helv. **17**, 1389 (1934).

Das trans-Androsteron wurde hier wie folgt bereitet: Reines im Vakuum sublimiertes trans-Dehydro-androsteron-acetat (*A. Butenandt, H. Dannenbaum*, Z. physiol. Ch. **229**, 192 (1934); *L. Ruzicka, A. Wettstein*, Helv. **18**, 986 (1935); *A. Butenandt, H. Dannenbaum, G. Hanisch, H. Kudzus*, Z. physiol. Ch. **237**, 57 (1935); *W. Schöllner, A. Serini, M. Gehrke*, Naturwiss. **23**, 337 (1935)) wurde in 30 Teilen Alkohol und Zusatz von 10 Volumprozent Eisessig mit Platin hydriert bis 1½ Mol Wasserstoff aufgenommen waren. Das in üblicher Weise isolierte Hydrierungsprodukt wurde mit der 1 Mol entsprechenden Menge Chromtrioxyd in Eisessig 20 Stunden bei Zimmertemperatur oxydiert. Das bei der üblichen Aufarbeitung durch Neutralwaschen erhaltene trans-Androsteron-acetat krystallisierte aus viel Pentan durch Einengen in Stäbchen, die scharf bei 118° korr. schmolzen (*Ruzicka* und Mitarbeiter, sowie *Butenandt* und Mitarbeiter fanden für ihre Präparate 97°). Die Verseifung durch 10 Minuten langes Kochen mit 4 Mol Kaliumhydroxyd als 5-proz. Methanol-lösung gab sofort reines trans-Androsteron, das aus verdünntem Methanol in Stäbchen, aus Äther-Pentan in dicken Körnern erhalten wurde, die bei 178° korr. schmolzen. Die aus wässrigem Methanol erhaltenen Krystalle sind ein Hydrat, das vor dem Schmelzen opak wird.

Das bei -80° aufgefangene Destillat wurde wie folgt auf Acetaldehyd geprüft: Es wurde mit der filtrierten Lösung von 25 mg p-Nitro-phenylhydrazin-chlorhydrat in wenig Wasser versetzt, 15 Minuten stehen gelassen und im Vakuum auf ein kleines Volum eingeeengt. Dabei schieden sich wenig schmierige Krystalle ab, die abgenutscht, mit etwas Wasser, dann mit einer Mischung von Toluol mit Petroläther gewaschen wurden. Sie wurden in wenig Toluol gelöst, über einer Spur Kohle filtriert, die Lösung eingeeengt und mit Pentan versetzt. Es schieden sich wenig Nadelchen ab, die bei $116-120^{\circ}$ schmolzen. Für eine weitere Reinigung reichte die Menge nicht aus. Reines p-Nitro-phenylhydrazon von Acetaldehyd schmilzt bei 129° , die Mischprobe schmolz bei $119-125^{\circ}$.

Substanz K.

Das bei $177-178^{\circ}$ korr. schmelzende Triacetat krystallisiert aus Äther-Pentan in länglichen Blättchen oder Stäbchen. Aus Methanol wurden grobe Stäbe erhalten, die noch einen Grad höher, bei 178° bis 179° korr. schmolzen. Die Lösung in wenig Methanol reduziert alkalische Silberdiamminlösung nicht. Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{19} = +53,2^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ($c = 1,936$ in Aceton) (19,6 mg Subst. zu $1,0122 \text{ cm}^3$; $l = 1 \text{ dm}$; $\alpha_D^{19} = +1,03^{\circ}$). Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 0,001 mm und $190-195^{\circ}$ Blocktemperatur sublimiert.

3,832 mg Subst. gaben 9,47 mg CO_2 ; 3,05 mg H_2O

$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_2$ (478,61) Ber. C 67,75 H 8,85%

Gef. „ 67,39 „ 8,91%

Eine Probe des Triacetates wurde in Eisessig mit Chromtrioxyd versetzt 20 Stunden stehen gelassen und wie beim analogen Versuch mit J-diacetat aufgearbeitet. Es wurde unverändertes Ausgangsmaterial erhalten. Es ist also lediglich die tertiäre Hydroxylgruppe in 17-Stellung nicht acetyliert.

Freie Substanz K. 118 mg Triacetat vom Smp. 177° wurden mit der Lösung von 100 mg Kaliumhydroxyd (= 6 Mol) in 5 cm^3 Methanol 15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Nach Zugabe von 2 cm^3 Wasser wurde mit Kohlendioxyd das freie Alkali neutralisiert und die Lösung im Vakuum von Methanol befreit. Die ausfallenden Krystalle wurden abgenutscht, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 93 mg farbloser Blättchen erhalten, die bei 140° opak wurden und bei $198-200^{\circ}$ korr. schmolzen.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 0,001 mm und $195-200^{\circ}$ Blocktemperatur sublimiert.

3,736 mg Subst. gaben 9,76 mg CO_2 und 3,34 mg H_2O

$\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_4$ (352,49) Ber. C 71,55 H 10,30%

Gef. „ 71,24 „ 10,27%

Die spez. Drehung betrug nach völliger Trocknung im Hochvakuum bei 115° : $[\alpha]_D^{21} = -1,0^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1$ in abs. Alkohol), also praktisch 0° . Substanz K gibt wie J, in wenig Alkohol gelöst, mit Digitonin in 90-proz. Alkohol in der Hitze sofort eine Fällung.

Androstan-dion-(3,17) (III) aus Substanz K. 10 mg Substanz K wurden mit der Lösung von 18 mg Chromtrioxyd in $0,9 \text{ cm}^3$ Eisessig 20 Stunden bei Zimmertemperatur oxydiert und genau wie

beim analogen Versuch mit Substanz J aufgearbeitet. Erhalten wurden nach vollständiger Reinigung durch Chromatographierung 3 mg Androstan-dion vom Smp. 132—133°, die bei der Mischprobe mit einer genau gleich schmelzenden Probe von authentischem Androstan-dion keine Depression ergaben.

trans-Androsteron (IV) und Formaldehyd aus Substanz K. 30 mg Substanz K wurden in 5 cm³ Methanol gelöst, mit der Lösung von 50 mg Perjodsäure in 1 cm³ Wasser, sowie 0,4 cm³ 2-n. Schwefelsäure versetzt 24 Stunden bei 20° stehen gelassen. Dann wurden 0,4 cm³ 2-n. Sodalösung sowie 2 cm³ Wasser zugegeben und im Vakuum unter Vorschaltung einer auf -80° gekühlten Vorlage auf 2 cm³ eingengt.

Die im eingengten Rückstand ausgefallenen Krystalle wurden mit Äther gesammelt und die Lösung mit Salzsäure, Natronlauge und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde im Hochvakuum bei 0,001 mm und 150° Badtemperatur sublimiert und das Sublimat aus 50-proz. Methanol unter Zusatz von wenig Kohle umkrystallisiert. Es wurden 15 mg farbloser, langgestreckter, zugespitzter Blättchen erhalten, die bei 130° opak wurden und bei 174—176° korr. schmolzen. Die Mischprobe mit trans-Androsteron vom Smp. 178° korr. schmolz bei 176—177° korr.

Das bei -80° aufgefangene Kondensat der flüchtigen Anteile wurde mit 30 mg Dimedon (Dimethyl-dihydro-resorcin), 1 cm³ Eisessig sowie 2 cm³ Wasser versetzt und eine Stunde auf dem Wasserbad unter Rückfluss erhitzt. Beim Einengen schieden sich feine Nadeln ab, die abgenutscht und mit Wasser gewaschen wurden. Sie schmolzen bei 194° korr. Ein zum Vergleich aus Formaldehyd mit Dimedon bereitetes Präparat schmolz unter denselben Bedingungen bei 195°, die Mischprobe gab keine Depression.

Substanz O.

Das bei 250° schmelzende Diacetat der Substanz O krystallisiert aus Äther durch Einengen in Astern-förmigen Rosetten länglicher, elliptischer Nadeln. Beim Erwärmen wird gegen 235—240° oft Umwandlung in lange, ganz feine Nadeln beobachtet, die bei 250—251° schmelzen. Es reduziert alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmer-Temperatur nicht. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 0,005 mm und 190° Blocktemperatur sublimiert. Es schmolz dann bei 252° korr.

3,698; 3,673 mg Subst. gaben 9,61; 9,69 mg CO₂ und 3,09; 3,20 mg H₂O

C₂₅H₄₀O₅ (420,57) Ber. C 71,39 H 9,59%

Gef. „ 70,87; 71,94 „ 9,35; 9,75%

(Wegen einer Störung im analytischen Betrieb wurde auf eine erneute Verbrennung verzichtet, da die Konstitution auch ohne diese sichergestellt werden konnte.)

Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{21} = -30,1^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,097$ in Aceton) (11,1 mg Subst. zu 1,0122 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{21} = -0,33^\circ$).

Prüfung des Diacetates mit Chromsäure. 15 mg des reinen Diacetates wurden mit 10 mg Chromtrioxyd in 1 cm³ Eisessig 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es trat keine Verfärbung ein. Nach dem Einengen im Vakuum wurde mit Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung blieb auch nach dem Waschen mit Schwefelsäure und Lauge stark gelb gefärbt, enthielt also offenbar einen beständigen Chromsäure-ester. Sie wurde daher mit etwas Wasser, 3 Tropfen konz. Bisulfitlösung und 0,5 cm³ Eisessig 20 Stunden auf der Maschine geschüttelt, worauf sie entfärbt und die wässrige Schicht leicht grünlich gefärbt war. Die Aufarbeitung durch Neutralwaschen usw. gab sofort reines Ausgangsmaterial vom Smp. 250—251° korr. (Mischprobe). Es ist somit wiederum nur die in 17-Stellung befindliche tertiäre Hydroxylgruppe frei.

Freie Substanz O. 105 mg Diacetat vom Smp. 250° korr. wurden mit 100 mg Kaliumhydroxyd in 4 cm³ Methanol 15 Minuten gekocht. Dann wurde mit 3 cm³ Wasser versetzt, mit Kohlendioxyd behandelt und im Vakuum stark eingeengt. Die ausgeschiedenen Krystalle wurden abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Erhalten wurden 68 mg farbloser Blättchen vom Smp. 221—222° korr. Zur Reinigung wurde aus Methanol unter Zusatz von Wasser unkrystallisiert. Die Blättchen schmolzen nun bei 222—223° korr. nach Opakwerden gegen 130°. Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{20} = -12,55^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,195$ in Methanol). (12,1 mg Subst. zu 1,0122 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{20} = -0,15^\circ$.)

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 0,002 mm und 195—200° Blocktemperatur sublimiert.

3,700 mg Subst. gaben 10,15 mg CO₂ und 3,55 mg H₂O
 $C_{21}H_{36}O_3$ (336,5) Ber. C 74,95 H 10,81%
 Gef. „ 74,80 „ 10,74%

Substanz O gibt, in wenig Alkohol gelöst, mit der heissen Lösung von Digitonin in 90-proz. Alkohol sofort eine Fällung.

Androstan-dion-(3,17) (III) aus Substanz O. 10 mg Substanz O wurden mit 10 mg Chromtrioxyd in 0,5 cm³ Eisessig 20 Stunden bei Zimmertemperatur oxydiert und wie bei den analogen Versuchen mit Substanz J und K aufgearbeitet. Es wurde reines Androstan-dion vom Smp. 132—133° korr. als farblose Blättchen erhalten. Die Mischprobe mit authentischem Material schmolz genau gleich.

trans-Androsteron (IV) und Acetaldehyd aus Substanz O. 15 mg Substanz O wurden in 3 cm³ Methanol gelöst, mit 15 mg Perjodsäure in 0,75 cm³ Wasser, sowie 0,2 cm³ 2-n. Schwefelsäure versetzt. Nach Verschluss mit doppelt durchbohrtem Gummistopfen wurde 5 Stunden lang ein langsamer Strom von Kohlendioxyd durch die Lösung geleitet. Das Gas passierte vorher eine Wasch-

flasche, die eine Mischung von 1 Teil Wasser und 4 Teilen Methanol enthielt, während das aus dem Reaktionsgefäß abziehende Gas in eine frisch bereitete und filtrierte Lösung von 50 mg p-Nitro-phenylhydrazin-chlorhydrat in 3 cm³ Wasser eingeleitet wurde.

Nach 5 Stunden wurde die vorgelegte Lösung von Nitro-phenylhydrazin-chlorhydrat im Vakuum vom kondensierten Methanol befreit, wobei sich bald orange Kryställchen abzuscheiden begannen. Als ihre Menge nicht weiter zunahm, wurden sie abgenutscht und mehrmals mit wenig Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde in wenig Methanol gelöst, über eine Spur Kohle filtriert, die Lösung mit Toluol versetzt und auf ein sehr kleines Volumen eingengt. Nach Zusatz von einigen Tropfen Pentan schieden sich reichlich Kryställchen ab, die mit Benzol-Pentan-Mischung gewaschen wurden; sie schmolzen bei 115—124°. Aus der Mutterlauge wurde durch langsames Eindunsten noch eine weitere Menge derselben Reinheit erhalten. Die vereinigten Krystalle wurden im Hochvakuum bei 0,01mm und 95° Blocktemperatur sublimiert. Es wurde ein rein gelbes Sublimat und wenig roter Rückstand erhalten. Das Sublimat wurde zweimal aus Benzol-Pentan umkrystallisiert. Die gelben Nadeln schmolzen bei 126—128°. Das zum Vergleich aus Acetaldehyd bereitete analoge Derivat verhielt sich während der Reinigung genau gleich und liess sich bei derselben Temperatur sublimieren. Es schmolz bei 129° bis 130° korr., die Mischprobe bei 126—130°

Der die nichtflüchtigen Anteile enthaltende Hauptansatz wurde noch weitere 6 Stunden stehen gelassen, dann mit 0,2 cm³ 2-n. Sodälösung und 2 cm³ Wasser versetzt und im Vakuum unter Vorschaltung einer auf -80° gekühlten Vorlage auf 2 cm³ eingengt.

Die dabei ausfallenden Krystalle wurden in Äther aufgenommen, die Lösung mit Schwefelsäure, Natronlauge und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand gab aus Äther-Pentan Stäbchen, die bei 176—177° korr. schmolzen. Die Mischprobe mit trans-Androsteron vom Smp. 178° korr. schmolz bei 176—178° korr.

Das bei -80° erhaltene Kondensat wurde mit 20 mg Dimedon und etwas Eisessig eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Dann wurde stark eingengt. Es konnte kein Formaldehyd-Derivat erhalten werden.

Reduzierendes Acetat vom Smp. 210°.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 0,003 mm und 195—200° Blocktemperatur sublimiert. Der Schmelzpunkt war unverändert 210—211°.

3,849 mg Subst. gaben 9,77 mg CO₂ und 3,08 mg H₂O

C₂₅H₃₈O₆ (434,35) Ber. C 69,10 H 8,82%

Gef. .. 69,22 .. 8,95%

Die Analyse würde also beispielsweise auf das Diacetat eines Trioxyketons C₂₁H₃₄O₄ stimmen. Das Produkt wird wie die vorigen

nach 20-stündigem Stehen mit Chromtrioxyd in Eisessig unverändert zurückerhalten; es enthält also keine freie primäre oder sekundäre Hydroxylgruppe. Die Lösung dieses Acetates in wenig Methanol reduziert alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur nach ca. 10 Minuten; es enthält also wahrscheinlich eine Ketolgruppierung.

Isolierung von Substanz N.

Fraktion C. 17. A. 2¹⁾ wurde zur Vorreinigung in etwas Aceton gelöst und mit viel frisch destilliertem Äther versetzt; das dabei ausfallende Pulver wurde abfiltriert, gut mit Äther gewaschen und nochmals aus wenig Aceton umgefällt, dann verworfen. Die vereinigten Lösungen wurden eingedampft und im Vakuum getrocknet. Sie wogen 3,5 g. Diese vorgereinigte Fraktion C. 17. A. 2 wurde nun einer Verteilung zwischen Benzol und Wasser unterworfen, genau wie sie für die analoge Fraktion C. 17. A. 3 früher beschrieben²⁾ wurde. Erhalten wurden

- 2,5 g Benzollösliches aus C. 17. A. 2.
- 0,2 g Harz II (roh, inkl. dem Acetonauszug des zur Trocknung des Benzollöslichen benützten Natriumsulfates)
- 0,4 g Benzol-extrakt aus C. 17. A. 2.
- 0,15 g Wasserlösliches aus C. 17. A. 2.

Harz I wurde nicht erhalten. Die 0,4 g Benzolextrakt gaben aus Aceton-Äther eine reichliche Menge von Substanz M und nach weiterer Reinigung (siehe später) noch etwas Substanz Fa und andere. Aus den 0,15 g Wasserlöslichem wurde wieder etwas Substanz E erhalten.

Die 2,5 g Benzollösliches wurden in 3 cm³ Aceton gelöst und mit Äther nicht ganz bis zur Trübung versetzt. Nach Impfen mit Corticosteron wurde 8 Tage bei 0° stehen gelassen. Die abgeschiedenen Krystalle wurden abgenutscht, mit einer Mischung von 10% Aceton und 90% Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden so 800 mg rohes Corticosteron vom Smp. 163—177° erhalten. Die Mutterlaugen wurden etwas eingeengt und mit feuchtem Äther bis zur Trübung versetzt etwa 2 Monate gut verschlossen bei -10° stehen gelassen. Die abgeschiedenen Krystalle wurden mit einer Mischung von 10% Aceton und 90% Äther gewaschen und getrocknet. Sie wogen 0,5 g und schmolzen bei 120—140°. (Verarbeitung der 1,2 g aus Mutterlaugen siehe weiter unten.)

Die 0,5 g der rohen Krystalle wurden dreimal aus Aceton-Äther umkrystallisiert, wobei zur Hauptsache Nadeln resultierten, die bei 150—160° schmolzen. Sie wurden nun im Vakuum gut getrocknet und aus ganz wenig reinem Aceton umkrystallisiert. Es schieden sich zunächst etwa 80 mg Corticosteron aus, die mit einer Mischung von Aceton-Äther gewaschen wurden. Beim langsamen Eindampfen der Mutterlaugen (ohne Schutz vor Luftfeuchtigkeit) schieden sich

¹⁾ Helv. 19, 1107 (1936).

²⁾ Helv. 20, 963 (1937).

Nadeln sowie kugelige Drusen aus, die nach dem Waschen mit acetonhaltigem Äther mechanisch unter der Lupe getrennt wurden. Die Nadeln schmolzen gegen 140° , die Drusen zunächst ungefähr bei 120° , die Schmelze erstarrte meist gegen 140° wieder strahlig, um erneut gegen 187° korr. zu schmelzen.

Die ausgesuchten Drusen gaben bei langsamem Krystallisieren aus Aceton unter Zusatz von etwa 2 Teilen Wasser entweder dünne Blättchen oder charakteristische viereckige Sterne, die wie oben schmolzen; lediglich die ganz reinen Anteile schmolzen nicht mehr bei 120° , sondern wurden nur noch opak bei dieser Temperatur. Die von den Drusen durch Aussuchen möglichst befreiten Krystallgemische wurden noch analog langsam aus Aceton-Wasser umkrystallisiert und die auftretenden viereckigen Sterne nach dem Trocknen wieder mechanisch ausgesucht und bei richtigem Schmelzpunkt mit der Hauptmenge vereinigt. Sie stellen die rohe N-Substanz dar.

Eine weitere kleine Menge N-Substanz liess sich aus den verbliebenen 1,2 g Mutterlaugen des benzollöslichen Teils von C. 17. A. 2 durch nochmalige Benzol-Wasser-Trennung gewinnen, die in Anlehnung an Angaben von *Kendall* und Mitarbeitern¹⁾ (aber unter weniger oftmaliger Verteilung) wie folgt durchgeführt wurde: 1,63 g Material (die obigen 1,2 g wurden mit einer weiteren kleinen Portion vereinigt) wurden mit insgesamt 100 cm^3 reinstem warmem Benzol in einen Scheidetrichter gespült und 6mal mit je 200 cm^3 reinstem Wasser je 5 Minuten lang ausgeschüttelt. Nach jeder Schüttelung wurde vor Trennung der Schichten eine vollständige Klärung des Wassers abgewartet, was jeweils mindestens 3 Stunden in Anspruch nahm. Die Benzollösung wurde zum Schluss mit 3 cm^3 halbgesättigter Sodalösung, sowie dreimal mit je 4 cm^3 Wasser nachgewaschen, die separat aufgefangen wurden. Sie wurde dann mit Natriumsulfat getrocknet, in reduziertem Vakuum eingedampft und der Rückstand mit wenig Methanol in eine Ampulle filtriert und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 760 mg Benzolrest 1.

Die im Scheidetrichter usw. verbliebenen kleinen Harzmengen, die weder in Wasser noch in Benzol löslich waren, wurden mit Aceton zusammengespült, mit viel frisch destilliertem Äther versetzt und nach Entfernung der geringen Fällung durch Filtration und Eindampfen der Lösung in eine kleine Ampulle gefüllt und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 50 mg Harz.

Die wässerigen Auszüge wurden im Vakuum auf 100 cm^3 eingengt und sechsmal mit je 200 cm^3 reinstem Benzol ausgeschüttelt. Das verbleibende Wasser wurde im Vakuum zur Trockne gedampft, der Rückstand in wenig Aceton gelöst und mit viel Äther versetzt.

¹⁾ *H. L. Mason, W. M. Hoehn, B. F. McKenzie, E. C. Kendall, J. biol. Chem.* **120**, 719 (1937).

Die Lösung wurde von einer geringen Fällung durch Filtration befreit und diese nochmals aus wenig Aceton mit Äther umgefällt und hierauf verworfen. Die vereinigten Lösungen wurden eingedampft, der Rückstand mit wenig Methanol in eine Ampulle filtriert und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 40 mg Wasserrest 1.

Die Benzollösungen wurden auf drei Scheidetrichter verteilt (Auszug 1—3 im ersten, Auszug 4—5 im zweiten und Auszug 6 im dritten Trichter) und hintereinander mit 5 cm³ halbgesättigter Sodaauslösung, dann noch dreimal mit je 5 cm³ Wasser gewaschen. Sie wurden dann getrocknet und im reduzierten Vakuum auf 100 cm³ eingedampft fünfmal mit je 200 cm³ reinstem Wasser ausgeschüttelt. Dann wurden sie getrocknet, im Vakuum eingedampft und mit wenig Methanol in eine Ampulle gespült und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 205 mg Benzolrest 2.

Die wässerigen Auszüge wurden im Vakuum auf 100 cm³ eingengt und viermal mit je 200 cm³ Benzol ausgeschüttelt. Die Benzol-
auszüge wurden im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit wenig Methanol in eine Ampulle filtriert und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 415 mg Benzolrest 3.

Die wässerigen Teile wurden im Vakuum zur Trockne gedampft, mit Aceton-Äther umgefällt, die filtrierte Lösung eingedampft und der Rückstand mit wenig Methanol in eine Ampulle filtriert und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 20 mg Wasserrest 2.

Aus den Sodaauszügen und kleinen Waschwässern wurden nach Ansäuern und Ausschütteln mit Äther unter Zusatz von etwas Essigester 75 mg Säuren erhalten.

Eine zweite Portion von 2,7 g Benzollöslichem aus C. 17. A. 2 gab bei einer analogen Trennung:

1,2 g Benzolrest 1 (hellgelb)
17 mg in Benzol und Wasser unlösliches Harz
39 „ Wasserrest 1
395 „ Benzolrest 2 (fast farblos)
670 „ Benzolrest 3 (fast farblos)
35 „ Wasserrest 2
50 „ Säuren

Substanz N befindet sich bei diesen Trennungen zur Hauptsache in Benzolrest 2, eine kleine Menge auch in Benzolrest 3. So wurden beispielsweise die 395 mg Benzolrest 2 in 170 mg Aceton gelöst, mit 80 mg Wasser und dann ca. 2 cm³ Äther, bis zur eben bleibenden Trübung versetzt. Beim Impfen mit dem Hydrat von N begann sofort die Abscheidung feiner Blättchen, die nach 4 Stunden abgenutscht, mit einer Mischung von 10% Aceton und 90% Wasser, dann mit einer solchen von 10% Aceton und 90% Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden. Erhalten wurden 100 mg fast reine N-Substanz als Hydrat. Benzolrest 3 gab analog noch ca. 30 mg.

Die Reinigung der rohen N-Krystalle gelingt am besten in wasserfreier Form. Die vereinigten N-Krystalle wurden in Aceton gelöst, mit Benzol versetzt und auf ein kleines Volumen eingeeengt, wobei Trübung eintrat. Beim Impfen mit der wasserfreien Form (durch kurzes Trocknen einer Spur des Hydrates bei 140° bis zum Erstarren bereitet) trat bald Krystallisation ein, die langsam fortschritt. Nach 2 Stunden wurde durch Dekantieren mit Benzol und Äther gewaschen. Der Schmelzpunkt war 185—190° korr. Die völlige Reinigung gelingt am besten durch Umkrystallisieren aus wenig reinem Aceton; dies ist wegen der grossen Löslichkeit aber nur mit relativ viel Substanz möglich. Es wurden auf diese Weise glänzende, dicke Platten von nebenstehender Form  erhalten, die bei 189—191° korr. schmolzen. Bei kleinen Mengen wurde die Benzollösung auf ein kleines Volumen eingeeengt, wobei Trübung eintrat; diese wurde durch vorsichtigen Zusatz von Aceton bei Zimmertemperatur eben zum Verschwinden gebracht. Beim Impfen mit der wasserfreien Form begann bald die Abscheidung von glasklaren Körnern, die ähnliche Form wie die obigen Platten besaßen, nur etwas kürzer waren. Die spezifische Drehung betrug: $[\alpha]_D^{19} = +93,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,418$ in abs. Alkohol). (14,360 mg Subst. zu 1,0122 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{19} = +1,33^\circ$.)

Zur Analyse wurde die gut pulverisierte Substanz 1 Stunde im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

3,741 mg Subst. gaben 10,00 mg CO₂ und 3,20 mg H₂O
 $C_{21}H_{32}O_4$ (348,46) Ber. C 72,38 H 9,26%
 Gef. „ 72,89 „ 9,57%

Die Substanz zeigt im U.V.-Absorptionsspektrum in der Gegend von 240 m μ keine selektive Absorption¹⁾, enthält also offenbar keine α, β -ungesättigte Ketongruppierung. Dagegen reduziert sie, in wenig Methanol gelöst, alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur ziemlich rasch, enthält also wahrscheinlich eine Ketolgruppierung.

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (Leitung Priv.-Doz. Dr. M. Furler) ausgeführt.

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

¹⁾ Wir verdanken die Messung wiederum Hrn. Priv.-Doz. Dr. H. Mohler, Zürich.