

### 135. Über Bestandteile der Nebennierenrinde

(20. Mitteilung)<sup>1)</sup>.

#### Isolierung der Substanzen Q (Desoxy-corticosteron) und R sowie weiterer Stoffe

von T. Reichstein und J. v. Euw.

(23. VIII. 38.)

Aus Nebennieren wurden bisher, besonders von drei verschiedenen Arbeitsgruppen, etwa 20 verschiedene nahe verwandte Sterinderivate isoliert<sup>2)</sup>. Für die Abtrennung dieser Stoffe wurden dabei meist sehr ähnliche, relativ milde Methoden benützt, die zur Hauptsache auf der Verteilung zwischen verschiedenen Lösungsmitteln beruhen. Letzten Endes wurde aber immer darauf abgestellt, dass sich der zu isolierende Stoff aus den relativ unreinen Konzentraten spontan durch Krystallisation abscheidet. Es ist klar, dass dieser letztere Vorgang weitgehend von der zufälligen Krystallisationstendenz der einzelnen Verbindungen abhängig ist. In einzelnen Fällen<sup>3)</sup> wurden allerdings wirksamere Trennungsmethoden angewendet, wie beispielsweise die chromatographische Trennung nach vorgängiger Acetylierung. Diese wurde allerdings bisher nur mit solchen Fraktionen versucht, die weitgehend frei von Anteilen waren, welche die empfindliche Ketol-Seitenkette enthalten, die sich durch starkes Reduktionsvermögen gegen alkalische Silberdiamminlösung bemerkbar macht. Für die biologisch wichtigen Vertreter ist es aber gerade charakteristisch, dass sie eine solche empfindliche Gruppierung enthalten.

Vor kurzem wurde nun eine Methode beschrieben<sup>4)</sup>, die es gestattet, aus den Acetaten und anderen aliphatischen Estern des Corticosterons und ähnlicher cortinwirksamer Stoffe in einfacher Weise wieder zu den freien Oxy-ketonen zu gelangen. Dies ermöglichte die Benützung verschärfter Trennungsmethoden auch für die biologisch wirksamen Fraktionen. Sie wurden zunächst auf die Ketonfraktionen „Ä-Rest A II und A III“<sup>5)</sup> angewendet. Das sind die Fraktionen, die zur Hauptsache Stoffe der C<sub>21</sub>-O<sub>4</sub>- und C<sub>21</sub>-O<sub>3</sub>-Gruppe enthalten, die leicht mit Ketonreagenzien reagieren. Die experimen-

<sup>1)</sup> 19. Mitteilung: T. Reichstein, K. Gützi, Helv. 21, 1185 (1938).

<sup>2)</sup> Vgl. die Zusammenstellung „Chemie des Cortins und seiner Begleitstoffe“ in „Ergebnisse der Hormon- und Vitaminforschung“, herausgegeben von L. Ruzicka und W. Stepp, Leipzig 1938.

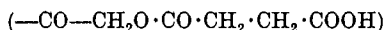
<sup>3)</sup> Vgl. die Isolierung von J, K, O und P, M. Steiger, T. Reichstein, Helv. 21, 546 (1938).

<sup>4)</sup> 18. Mitteilung: T. Reichstein, J. v. Euw, Helv. 21, 1181 (1938).

<sup>5)</sup> T. Reichstein, Helv. 19, 1107 (1936).

tell etwas schwer zu verarbeitenden Fraktionen mit höherem Sauerstoffgehalt, insbesondere der C<sub>21</sub>-O<sub>5</sub>-Gruppe sollen später einer analogen Trennungsmethode unterzogen werden.

Es wurde wie folgt verfahren: Die genannten Fraktionen wurden zunächst durch direkte Krystallisation aus passenden Lösungsmitteln von Corticosteron und andern Stoffen weitmöglichst befreit. Die Mutterlaugen, aus denen keine weiteren Krystalle mehr direkt erhalten werden konnten, wurden nun zur Verseifung eventuell vorhandener Ester mit Kaliumbicarbonat und Methanol behandelt. Der nach Aufarbeitung erhaltene neutrale Teil wurde mit Pyridin und Bernsteinsäure-anhydrid 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Primäre Hydroxylgruppen von Ketol-Seitenketten ( $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ ) werden unter diesen Bedingungen fast quantitativ verestert, während Allo-pregnan-derivate, die in 3-Stellung eine trans-(=  $\beta$ )ständige Hydroxylgruppe besitzen, dort teilweise succinyliert werden. Wird der ganze Ansatz hierauf mit wässriger Soda getrennt, so gehen die wichtigen Ketole fast vollständig in die soda-lösliche Bernsteinsäure-halbesters-fraktion



über, während hydroxylfreie Ketone (wie Adrenosteron) vollständig und gewöhnliche Oxy-ketone vom Typus des Allo-pregnanolons teilweise in den Neutralteilen verbleiben.

Die Verseifung der Bernsteinsäure-halbesters mit Kaliumbicarbonat und Methanol ergab die stark angereicherte Oxyketon-fraktion, aus der sich nochmals eine erhebliche Menge Corticosteron durch direkte Krystallisation abscheiden liess. Die amorph verbliebenen Anteile wurden acetyliert und die Acetate über Aluminiumoxyd nach der Durchlaufmethode<sup>1)</sup> chromatographisch getrennt. Die Wirksamkeit der Trennung ergibt sich daraus, dass die Acetate der folgenden 8 Substanzen in krystallisierter Form erhalten werden konnten: Dehydro-corticosteron (III), Corticosteron, Q, L, R, N, das Monoacetat des 11-Oxy-trans-androsterons (I) sowie ein Acetat vom Smp. 240° korr., das möglicherweise mit dem Acetat von Substanz F. a. identisch ist. Von diesen waren 5 Substanzen bereits bekannt. So ist die Substanz (I) früher<sup>2)</sup> durch Abbau von Substanz A erhalten, aber bisher noch nie direkt isoliert worden. Auch das Dehydro-corticosteron (III) ist in diesem Laboratorium hiermit zum ersten Male direkt aus Drüsenmaterial erhalten worden, früher wurde es aus Corticosteron durch Oxydation des Acetates bereitet<sup>3)</sup>. Hingegen haben Kendall und Mitarbeiter<sup>4)</sup> diesen Stoff schon vor längerer Zeit

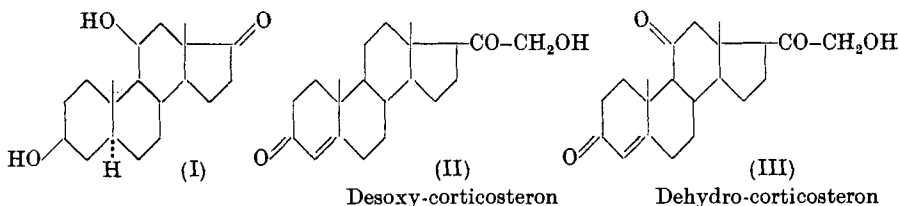
<sup>1)</sup> Die von O. Neracher, T. Reichstein, Helv. **19**, 1382 (1936) beschriebene Ausführungsform wurde angewendet.

<sup>2)</sup> Helv. **19**, 29, 402 (1936); **20**, 817 (1937).

<sup>3)</sup> T. Reichstein, Helv. **20**, 953 (1937).

<sup>4)</sup> H. L. Mason, C. S. Myers, E. C. Kendall, J. Biol. Chem. **114**, 613 (1936); H. L. Mason, W. M. Hoehn, B. F. McKenzie, E. C. Kendall, J. Biol. Chem. **120**, 719 (1937).

aus Nebennierenextrakten isoliert, und zwar in relativ grosser Menge. Unser Material muss im Gegensatz zu dem der amerikanischen Autoren relativ wenig davon enthalten haben. Die anderen der genannten Substanzen, ausser Q und R, sind hier bereits früher aus Drüsenextrakten erhalten worden, und ihre Konstitution ist bis auf diejenige von Substanz L bekannt<sup>1)</sup>. Die Substanzen Q und R dagegen wurden bisher noch nie isoliert. Die Konstitution von R konnte noch nicht aufgeklärt werden, da die bisher erhaltene Menge zu klein war. Es wurde lediglich festgestellt, dass sie alkalische Silber-diamminlösung reduziert, also voraussichtlich eine Ketolgruppierung besitzt und dass im U. V. Absorptionsspektrum die für  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Ketone charakteristische Bande bei ca. 240 m $\mu$  ( $\log \epsilon = \text{ca. } 4$ ) abwesend ist. Sie gibt auch die grüne Fluoreszenzreaktion<sup>2)</sup> mit konz. Schwefelsäure nicht.



Das grösste Interesse beansprucht Substanz Q. Es ergab sich nämlich, dass sie mit Desoxy-corticosteron (II) identisch ist, das früher durch Partialsynthese bereitet worden war<sup>3)</sup>. Hiermit erweist sich dieser Stoff, der das Corticosteron an biologischer Wirksamkeit um ein Mehrfaches übertrifft<sup>4)</sup>, nicht nur als synthetisches Modell, sondern auch als Bestandteil des natürlichen Hormonkomplexes. Leider ist es kaum möglich, die wirklich vorhandene Menge an (II) zu schätzen. Es kann nur gesagt werden, dass in unseren Extrakten sicherlich bedeutend weniger Desoxy-corticosteron als Corticosteron enthalten ist. Der Gehalt an ersterem (II) kann also nur für einen relativ geringen Bruchteil der Wirksamkeit eines Rohextraktes verantwortlich gemacht werden.

<sup>1)</sup> Nur kleinere Einzelheiten in den Formeln sind noch nicht streng bewiesen.

<sup>2)</sup> Diese wurde zuerst von O. Wintersteiner, J. J. Pfiffner, J. Biol. Chem. **116**, 291 (1936) bei ihrer Compound F beobachtet. Die Reaktion hat sich zur Erkennung gewisser Nebennierenbestandteile als sehr nützlich erwiesen, auch wenn sie nicht spezifisch ist.

<sup>3)</sup> M. Steiger, T. Reichstein, Helv. **20**, 1164 (1937).

<sup>4)</sup> Versuche im Laboratorium der N. V. Organon, Oss, ergaben, dass beim Everse-de-Fremery-Test an ausgewachsenen epinephrektomierten Ratten etwa 0,04 mg Desoxy-corticosteron-acetat in 1 cm<sup>3</sup> Arachidöl täglich (in 2 Tagesdosen unterteilt subcutan injiziert) genügen, um bei 50% der Tiere ein positives Resultat zu geben. Von Corticosteron waren etwa 10mal mehr für ein analoges Resultat nötig. Herr Dr. Kendall hatte die Freundlichkeit, freies Desoxy-corticosteron an Hunden zu prüfen. Das vorläufige Resultat an 2 Tieren ergab, dass bei Injection in wässriger Lösung freies Desoxy-corticosteron etwa 5—7mal stärker wirksam ist als Corticosteron.

Bei der Beurteilung der Resultate, die mit der genannten Isolierungsmethode gewonnen wurden, ist zu berücksichtigen, dass gewisse Möglichkeiten für Umlagerungen nicht ausgeschlossen sind. Besonders gilt dies für die Behandlung mit schwachen Alkalien. Es könnten dadurch beispielsweise Oxy-aldehyd-gruppen ( $-\text{CHOH}-\text{CHO}$ ) in Ketolgruppen ( $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ ) umgelagert werden. Bisher sind jedoch keine Anhaltspunkte dafür aufgefunden worden, dass sich solche Oxy-aldehyde in Nebennierenextrakten vorfinden. Wir sehen es als höchst wahrscheinlich an, dass die isolierten Stoffe tatsächlich in den ursprünglichen Extrakten enthalten waren und nicht erst durch sekundäre Umlagerung entstanden sind.

### Experimenteller Teil.

1,7 g der als „Ä-Rest A II“ bezeichneten Fraktion, deren Gewinnung in der 6. Mitteilung<sup>1)</sup> genau beschrieben ist, wurden nach gutem Trocknen im Vakuum mit der halben Gewichtsmenge Aceton verflüssigt, dann mit absolutem Äther bis fast zur Trübung versetzt und gut verschlossen stehen gelassen. Nach eintägigem Stehen hatten sich zunächst kleine kugelige Drusen zusammen mit feinem Krystallpulver abgeschieden. Das Gemisch wurde abgenutscht und mit Äther gewaschen. Es wog 0,3 g und schmolz bei 210—250°. Es enthielt zur Hauptsache Substanz L, Adrenosteron, das Dioxy-keton (I) und noch andere Stoffe, deren Trennung in einer späteren Mitteilung beschrieben wird. Die Mutterlauge wurde eingeeengt und unter denselben Bedingungen nochmals krystallisieren gelassen. Neben wenig des obigen Gemisches schieden sich grosse einzelne Krystalle von Corticosteron aus. Der Eintritt der Krystallisation konnte durch Impfen beschleunigt werden. Nach Entfernung der flüssigen Teile mit absolutem Äther, der eine Spur Aceton enthielt, wurde mechanisch getrennt. Das Pulver wurde mit obigem vereinigt, daneben wurden 0,2 g Corticosteron erhalten. Die Mutterlaugen gaben bei völligem Eindampfen im Vakuum 1,16 g amorphes Material, aus dem direkt keine Krystalle mehr erhalten werden konnten.

Eine weitere Menge „Ä-Rest A II“, der einige Wochen gestanden und sich dabei braun gefärbt hatte, wurde wie folgt vorgereinigt: Er wurde in 2 Teilen Aceton gelöst und mit viel frisch destilliertem Äther versetzt. Dabei fiel ein braunes Pulver aus, das abfiltriert und für sich nochmals analog umgefällt und dann verworfen wurde. Die vereinigten hellgelben, acetonhaltigen Ätherlösungen wurden auf ein kleines Volumen eingeeengt und gaben insgesamt 0,25 g Corticosteron, 0,25 g hochschmelzendes Krystallgemisch und 2,5 g amorphes Material aus Mutterlaugen.

<sup>1)</sup> T. Reichstein, Helv. 19, 1107 (1936).

Ganz analog wurden die als „Ä-Rest A III“ bezeichneten Fraktionen behandelt. Es wurden durchschnittlich 20 % der Gesamtmenge in Krystallen abgetrennt. Die restlichen 80 % blieben amorph. Bei einer Probe wurde die Krystallisation statt aus Aceton-Äther aus einem Volumteil absolutem Alkohol durchgeführt. Das Ergebnis war ähnlich.

Es wurde zunächst versucht, die nicht mehr krystallisierenden Anteile von „Ä-Rest A III“ durch direkte Chromatographierung über Calciumcarbonat zu trennen. Der Erfolg war jedoch sehr bescheiden.

Nachher wurde wie folgt verfahren:

Vorverseifung. 2,2 g nicht mehr krystallisierende Anteile der Fraktion „Ä-Rest A III“ wurden in 160 cm<sup>3</sup> Methanol gelöst, mit der Lösung von 2,2 g Kaliumbicarbonat in 40 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und 40 Minuten unter Rückfluss gekocht. Das Methanol wurde im Vakuum vollständig entfernt und der Rückstand dreimal mit reichlichen Mengen frisch destilliertem Äther längere Zeit ausgeschüttelt bis alle harzigen Partikel in Lösung gegangen waren. Die Ätherlösungen wurden mehrmals mit Sodalösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es verblieben 1,6 g gereinigtes Material.

Bernsteinsäure-Trennung. Die 1,6 g wurden in 8 cm<sup>3</sup> absolutem Pyridin gelöst, mit 2 g Bernsteinsäure-anhydrid versetzt und dieses durch Umschwenken und leichtes Wärmen in Lösung gebracht. Die Mischung wurde 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum zur Trockne gedampft und möglichst von Pyridinresten befreit. Der Rückstand wurde in viel Äther gelöst, zweimal mit verdünnter Salzsäure und mit wenig Wasser gewaschen und hierauf fünfmal mit gekühlter Sodalösung, dann noch zweimal mit Wasser ausgeschüttelt. Die letzte Sodalösung gab beim Ansäuern keine Trübung mehr. Die neutrale Ätherlösung wurde getrocknet und eingedampft. Sie hinterliess 770 mg „hydroxylfreie Ketone“ aus „Ä-Rest A III“ (diese krystallisieren teilweise, die Trennung wird später beschrieben).

Die Sodalösungen und die letzten Waschwässer wurden in Gegenwart von Eis sofort mit Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt und dreimal mit viel frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen wurden zweimal mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es verblieb ein Rückstand von 1,8 g (dieser enthält die sauren Bernsteinsäure-ester und etwas freie Bernsteinsäure).

Der Rückstand wurde mit etwas Wasser gedeckt und unter energischem Schütteln und öfterem leichtem Wärmen, tropfenweise mit so viel starker Pottaschelösung versetzt, dass eben neutrale Reaktion auf Lakmus eintrat und alle festen Partikel in Lösung gingen.

Dann wurde 1 g Kaliumbicarbonat und so viel Wasser zugegeben, dass das Volumen 20 cm<sup>3</sup> betrug. Nach Zusatz von 80 cm<sup>3</sup> reinem Methanol wurde 1 Stunde unter Rückfluss gekocht. Die Lösung, die jetzt Phenolphthaleinpapier beim Antüpfeln leicht rötete, wurde im Vakuum vollständig von Methanol befreit und dreimal mit frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde dreimal mit stark verdünnter Pottaschelösung, dann zweimal mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es verblieben 800 mg „Oxy-ketone“ aus „Ä-Rest A III“.

Die verbliebenen wässrigen Anteile wurden im Vakuum von Äther befreit und auf 20 cm<sup>3</sup> eingeengt. Dann wurde 0,4 g festes Kaliumbicarbonat darin gelöst, 800 cm<sup>3</sup> Methanol zugegeben und nochmals 1 Stunde unter Rückfluss gekocht. Die wie oben durchgeführte Aufarbeitung gab noch 65 mg „Oxy-ketone aus Nachverseifung“.

Aus den 800 mg Oxy-ketonen hätte hier zweckmässig nochmals die Hauptmenge Corticosteron durch direkte Krystallisation abgetrennt werden können. Dies ist bei diesem Versuch jedoch unterblieben. Das Material wurde direkt wie folgt acetyliert und chromatographiert:

Acetylierung. Die 800 mg Oxy-ketone aus „Ä-Rest A III“ wurden mit 3 cm<sup>3</sup> absolutem Pyridin und 2 cm<sup>3</sup> Essigsäure-anhydrid vermisch 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum völlig eingedampft, der Rückstand in viel Äther aufgenommen, mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es verblieben 850 mg acetyliertes Material. Dies krystallisierte aus einer Spur Benzol auf Zusatz von Äther. Es wurden 220 mg Krystalle erhalten, die zur Hauptsache aus Corticosteron-acetat bestanden, das sich aber schwer ganz reinigen liess. Diese Krystalle wurden daher für sich chromatographiert. Die Mutterlauge wog nach gutem Trocknen im Vakuum 615 mg.

Chromatographierung. Die 615 mg amorphes Acetat wurden in 10 cm<sup>3</sup> Benzol gelöst, mit 10 cm<sup>3</sup> Pentan verdünnt, über eine mit Pentan bereitete Säule von 20 g Aluminiumoxyd (*Merck*, standardisiert nach *Brockmann*) filtriert und nach dem Durchlaufverfahren getrennt. Zur Elution wurde die folgende Reihe von Lösungsmitteln benützt, die sich früher<sup>1)</sup> gut bewährt hatte: Pentan, absolutes Benzol, absoluter Äther, Aceton, resp. Gemische von zwei benachbarten Lösungsmitteln. Es wurde mit je 50 cm<sup>3</sup> Lösungsmittel nachgewaschen und jedes Filtrat einzeln eingedampft und auf Krystallisierfähigkeit geprüft. Zu diesem Zwecke wurden die ersten Fraktionen in wenig Pentan gelöst gut verschlossen stehen gelassen.

<sup>1)</sup> *O. Neracher, T. Reichstein, Helv. 19, 1382 (1936); M. Steiger, T. Reichstein, Helv. 21, 546 (1938).*

Die höheren, die in Pentan allein nicht vollständig löslich waren, erhielten einen Zusatz von etwas Äther. Bei den weiteren wurde absoluter Äther allein und bei den letzten Äther-Acetongemische verwendet. Es wurde überall 24—48 Stunden stehen gelassen und eventuell mit Krystallspuren von Nachbarfraktionen geimpft. Dann wurde durch Dekantieren gewaschen. Diejenigen Fraktionen, die gleiche Krystalle gaben oder aus anderen Gründen als ungefähr gleich angesehen wurden, wurden vereinigt.

Fraktionsnummer	Lösungsmittel	Rückstand
1—5	Pentan-Benzol 1 : 1	Zusammen ca. 50 mg, enthält wenig pentanlösliche Krystalle
6—23	abs. Benzol	Zusammen ca. 300 mg, gibt Q-acetat und N-acetat
24—25	abs. Benzol	gibt Acetat von (I)
26—27	Benzol-Äther 1 : 1	gibt Acetat von (I)
28—31	Benzol-Äther 1 : 1	gibt wenig Krystalle
32—34	abs. Äther	Gemisch
35—36	Äther-Aceton 1 : 1	gibt Corticosteron-acetat.

Die folgenden Fraktionen wurden mit Aceton sowie mit Aceton-Methanol abgelöst und gaben nur braunes Harz.

Die 220 mg Krystalle wurden genau gleich über 7 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Jede Fraktion entspricht dem Eindampfrückstand von 50 cm<sup>3</sup> Filtrat.

Fraktionsnummer	Lösungsmittel	Rückstand
1—2	abs. Benzol	Kryst. Smp. roh 156—158° ist Q-acetat
3—4	abs. Benzol	Kryst. Smp. roh 166—178° ist rohes Dehydro-corticosteron-acetat
5—8	abs. Benzol	Kryst. Smp. roh 120—140° ist rohes Corticosteron-acetat
9—11	90% Benzol, 10% Äther	Kryst. Smp. roh 144—148° ist fast reines Corticosteron-acetat
12—14	80% Benzol, 20% Äther	Kryst. Smp. roh 147—148° ist fast reines Corticosteron-acetat
15—16	70% Benzol, 30% Äther	Kryst. Smp. roh 147—148° ist fast reines Corticosteron-acetat
17—18	50% Benzol, 50% Äther	Kryst. Smp. roh 130—145° ist unreines Corticosteron-acetat
19	30% Benzol, 70% Äther	Kryst. Smp. roh 228—236°, Gemisch, enthält Nadeln und Blättchen
20—21	abs. Äther	hinterlässt keinen Rückstand
22	10% Aceton, 90% Äther	wenig Krystalle Smp. 206—221°

Die folgenden Fraktionen wurden mit steigenden Mengen Aceton, dann mit Methanol-Äther eluiert und gaben nur braunes Harz.

Die Isolierung der reinen Substanzen aus den erhaltenen Fraktionen wird weiter unten beschrieben.

Ganz analog wurden 5 g vereinigte amorphe Teile von „Ä-Rest A II“ und „Ä-Rest A III“ behandelt. Die Vorverseifung gab 3,3 g gereinigtes Material. Dieses lieferte bei der Bernsteinsäure-Trennung: 1,23 g „hydroxylfreie Ketone“ sowie 1,67 g Oxyketone und 210 mg Oxyketone aus Nachverseifung. Die 1,67 g Oxyketone (Hauptmenge) wurden in 0,9 cm<sup>3</sup> Aceton gelöst, mit 5 cm<sup>3</sup> absolutem Äther versetzt und mit Corticosteron geimpft. Über Nacht waren 450 mg Corticosteron auskristallisiert. Es verblieben 1,2 g amorphe Oxyketone, die bei der Acetylierung 1,39 g acetyliertes Material gaben. Dieses wurde wie oben über 40 g Aluminiumoxyd chromatographisch getrennt.

Fraktionsnummer	Volum d. Filtrats	Lösungsmittel	Rückstand
1—4	je 100 cm <sup>3</sup>	Benzol-Pentan 1 : 1	wenig, halbkristallin, l. lösl. Pentan
5	100 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	wenig, halbkristallin, l. lösl. Pentan
6—10	je 100 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	Kryst. gibt rohes Q-acetat
11—15	je 200 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	Kryst. gibt rohes R-acetat
16	200 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	amorph
17	200 cm <sup>3</sup>	90% Benzol, 10% Äther	Kryst. gibt rohes Dehydro-corticosteron-acetat
18	200 cm <sup>3</sup>	80% Benzol, 20% Äther	Kryst. gibt rohes Dehydro-corticosteron-acetat
19	200 cm <sup>3</sup>	80% Benzol, 20% Äther	Gallerte, dann Krystalle, gibt: Corticosteron-acetat
20	200 cm <sup>3</sup>	70% Benzol, 30% Äther	Gallerte, dann Krystalle, gibt: Corticosteron-acetat
21	200 cm <sup>3</sup>	50% Benzol, 50% Äther	Gallerte, dann Krystalle, gibt: Corticosteron-acetat
22	200 cm <sup>3</sup>	50% Benzol, 50% Äther	Kryst. gibt Fa-acetat (?)
23	200 cm <sup>3</sup>	abs. Äther	Kryst. gibt Fa-acetat (?)
24	200 cm <sup>3</sup>	Äther-Aceton 1 : 1	Kryst. gibt Fa-acetat (?)

Die folgenden Fraktionen gaben keine Krystalle mehr.

Eine dritte Portion von 3,5 g der vereinigten amorphen Anteile aus „Ä-Rest A II und III“ gab analog bei der Vorverseifung 2,2 g gereinigtes Material. Daraus 827 mg „hydroxylfreie Ketone“, 1,04 g Oxyketone (Hauptmenge) sowie 120 mg Oxyketone aus Nachverseifung. Die Hauptmenge der Oxyketone (1,04 g) lieferte 220 mg Corticosteron, es verblieben also 820 mg amorphe Oxyketone, und diese gaben 900 mg acetyliertes Material, das wie oben über 27 g Aluminiumoxyd chromatographiert wurde.



Fraktionsnummer	Volum d. Filtrats	Lösungsmittel	Rückstand
1—4	je 100 cm <sup>3</sup>	Benzol-Pentan 1 : 1	Wenig halbkryst. lösl. in Pentan
5	100 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	Wenig halbkryst. lösl. in Pentan
6—8	je 100 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	Kryst. gibt rohes Q-acetat
9	150 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	Kryst. gibt rohes Q-acetat
10	150 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	Kryst. Smp. roh 150—170°
11	150 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	Kryst. Smp. roh 85—155°
12—13	je 200 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	Kryst. gibt L-acetat und Acetat von (I)
14	200 cm <sup>3</sup>	abs. Benzol	Kryst. gibt Acetat von (I)
15	100 cm <sup>3</sup>	90% Benzol, 10% Äther	Kryst. gibt Acetat von (I)
16	100 cm <sup>3</sup>	80% Benzol, 20% Äther	Kryst. gibt Acetat von (I)
17	100 cm <sup>3</sup>	70% Benzol, 30% Äther	Amorph
18—21	je 100 cm <sup>3</sup>	50% Benzol, 50% Äther	Gallerte, dann Kryst. von Corticosteron-acetat
22	100 cm <sup>3</sup>	50% Benzol, 50% Äther	Krystall. gibt Fa.-acetat (?)
23—24	je 100 cm <sup>3</sup>	abs. Äther	Krystall. gibt Fa.-acetat (?)
25	100 cm <sup>3</sup>	Aceton-Äther 1 : 1	Krystall. gibt Fa.-acetat (?)
26—30	je 100 cm <sup>3</sup>	Aceton, sowie Methanol-Äther 1 : 1	Gibt braunes Harz

Nochmalige Trennung der leicht eluierbaren Fraktionen. Alle bei den verschiedenen Chromatographierungen erhaltenen Anteile von Q-acetat wurden vereinigt, ebenso die flüssig gebliebenen Mutterlaugen der Fraktionen, aus denen diese Krystalle gewonnen worden waren. Das rohe krystallisierte Q-acetat wurde durch Umkrystallisieren aus Äther durch Einengen gereinigt, bis ein Smp. von 156—158° korr. erreicht war. Die Mutterlaugen der Krystalle wurden eingedampft und gaben aus wenig Methanol bei 0° noch etwas Krystalle derselben Reinheit. Die verbleibenden tieferschmelzenden Anteile wurden mit den ersten Mutterlaugen vereinigt. Das gut getrocknete Material wog 300 mg. Es wurde in Benzol-Pentan gelöst und über eine mit Pentan bereitete Säule von 10 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Jede Fraktion entspricht dem Eindampfrückstand von 50 cm<sup>3</sup> Filtrat.

Fraktionsnummer	Lösungsmittel	Rückstand
1	70% Benzol, 30% Pentan	wenig amorphes Material
3—3	90% Benzol, 10% Pentan	Kryst. gibt Q-acetat
4—6	abs. Benzol	Kryst. gibt Q-acetat
7—9	abs. Benzol	Kryst. gibt Gemische
10	abs. Benzol	Kryst. gibt N-acetat
11—15	90% Benzol, 10% Äther	Kryst. gibt N-acetat

Die folgenden Fraktionen gaben noch wenig Gemische.

### Identifizierung von Substanz Q als Desoxy-corticosteron (II).

Alle durch Krystallisation aus Äther-Pentan direkt oder durch weiteres Umkrystallisieren aus Äther oder wenig Methanol erhaltenen Anteile von Q-acetat, die über 155° korr. schmolzen, wurden vereinigt, in absolutem Äther gelöst, filtriert, eingeengt, mit etwas Methanol versetzt, rasch auf ein kleines Volumen eingedampft und bei 0° krystallisieren gelassen. Nach etwa einer Viertelstunde wurden die abgeschiedenen Nadeln abgenutscht, mit Äther-Pentan gewaschen und getrocknet. Es wurden etwa 100 mg farbloser Nadeln erhalten, die bei 156—158,5° korr. schmolzen. Sie reduzierten, in wenig Methanol gelöst, alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur stark, gaben aber die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure nicht. (Corticosteron gibt diese Reaktion stark, zum Unterschied von Desoxy-corticosteron und Dehydro-corticosteron, welche sie nicht geben.) Synthetisches Desoxy-corticosteron-acetat vom Smp. 157—159°<sup>1)</sup> gab bei der Mischprobe keine Depression. Zur Sicherheit wurde eine Probe des aus der Chromatographie erhaltenen Materials noch analysiert und hierzu 1 Stunde bei 120° und 0,001 mm getrocknet.

4,108 mg Subst. gaben 11,16 mg CO<sub>2</sub> und 3,15 mg H<sub>2</sub>O  
C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> (372,48) Ber. C 74,16 H 8,66%  
Gef. „ 74,08 „ 8,58%

Schliesslich wurde noch eine Probe davon zu freiem Desoxy-corticosteron verseift.

70 mg des aus Nebennieren isolierten Q-acetats wurden in 5,5 cm<sup>3</sup> Methanol gelöst, mit der Lösung von 80 mg Kaliumbicarbonat in 1,5 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Dann wurde im Vakuum vollständig von Methanol befreit und mehrmals mit reichlichen Mengen frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Die mit etwas Sodalösung und Wasser gewaschene und mit Natriumsulfat getrocknete Ätherlösung wurde eingedampft und der Rückstand im Molekularkolben bei 0,02 mm und 190° Badtemperatur destilliert. Das Destillat wurde in einer Spur Aceton gelöst und mit der fünffachen Menge absolutem Äther versetzt. Nach mehrstündigem Stehen wurden 10 mg farblose, glänzende Krystalle erhalten, die bei 137 bis 141° schmolzen. Die Mischprobe mit synthetischem Material, vom Smp. 140—142° gab keine Depression.

### Identifizierung von N-acetat.

Das rohe, aus Äther-Pentan erhaltene N-acetat wurde aus wenig Methanol umkrystallisiert und gab farblose Nadeln vom Smp. 147 bis 149,5°. Die Mischprobe mit authentischem N-acetat<sup>2)</sup> gab keine

<sup>1)</sup> M. Steiger, T. Reichstein, Helv. 20, 1164 (1937).

<sup>2)</sup> T. Reichstein, K. Gützi, Helv. 21, 1185 (1938).

Depression. Das Material reduzierte alkalische Silberdiamminlösung stark und gab die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure nicht.

#### Identifizierung von L-acetat.

Die bezeichneten Fraktionen wurden zuerst aus Äther-Pentan, dann aus wenig Methanol unter starker Kühlung umkrystallisiert. Es wurden farblose Blättchen erhalten, die bei 188—190° korr. schmolzen. Sie gaben die grüne Fluoreszenzreaktion nicht und reduzierten auch alkalische Silberdiamminlösung nicht. Die Mischprobe mit dem ebenso schmelzenden Acetat der Substanz L (vgl. spätere Mitteilung) gab keine Depression.

#### Identifizierung des Acetats von (I).

Das vorgereinigte Produkt wurde im Molekularkolben bei 0,01 mm und 160° Badtemperatur sublimiert und das Sublimat aus Äther-Pentan, dann nochmals aus wenig Methanol umkrystallisiert. Es wurden farblose Nadeln erhalten, die bei 225—229° korr. schmolzen. Sie reduzierten alkalische Silberdiamminlösung nicht und gaben auch die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure nicht. Zur Analyse wurde im Hochvakuum frisch sublimiert.

3,276 mg Subst. gaben 8,702 mg CO<sub>2</sub> und 2,699 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> (346,45) Ber. C 72,38 H 9,25%

Gef. „ 72,46 „ 9,22%

Die Mischprobe mit dem bei 230—231° korr. schmelzenden, durch Abbau von Substanz A früher gewonnenen Acetat von (I)<sup>1)</sup> gab keine Depression.

#### Isolierung von Substanz R.

Das rohe Acetat von Substanz R ist in fast allen Fällen mit etwas Dehydro-corticosteron-acetat vermischt gewesen. Von diesen ist das erstere in Methanol, das zweite in Äther leichter löslich als das andere. Das Rohprodukt wurde daher zuerst aus wenig Methanol umkrystallisiert (dabei ist längeres Erwärmen wegen Verseifungsgefahr zu vermeiden). Es wurden farblose Nadeln vom Smp. 172 bis 173° korr. erhalten, die bei nochmaligem Umkrystallisieren ihren Schmelzpunkt nicht mehr änderten. Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingedampft, gut getrocknet und aus Äther durch Einengen umkrystallisiert. Es wurden Nadeln erhalten, die bei 175—178° korr. schmolzen, mit R-acetat eine Schmelzpunkt-Erniedrigung ergaben und sich als Dehydro-corticosteron-acetat erwiesen. Die eingengten Äther-Mutterlaugen gaben aus wenig Methanol noch etwas R-acetat. Es wurden insgesamt 21 mg R-acetat erhalten. Das Produkt reduziert

<sup>1)</sup> M. Steiger, T. Reichstein, Helv. 20, 824 (1937).

alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur stark, gibt aber die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure nicht. Es gibt im U. V.-Absorptionsspektrum auch nicht die für  $\alpha, \beta$ -unge-sättigte Ketone charakteristische Bande in der Gegend von  $240 \mu\text{m}^1$ ) und einem  $\log \varepsilon = \text{ca. } 4$ . Bei der Mischprobe mit dem etwa gleich-hoch schmelzenden Acetat des Dehydro-corticosterons wird eine starke Depression erhalten.

Freie Substanz R. 14 mg fast reines R-acetat wurden in  $0,5 \text{ cm}^3$  Methanol gelöst und mit der Lösung von 15 mg Kaliumbicar-bonat in  $0,3 \text{ cm}^3$  Wasser eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Hierauf wurde im Vakuum vollständig von Methanol befreit und mehrmals mit frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Die Lösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet und auf  $1 \text{ cm}^3$  eingengt. Es wurde verschlossen stehen gelassen, worauf bald Krystallisation eintrat. Die Krystalle wurden mit Äther gewaschen, sie schmolzen bei  $188\text{—}204^\circ$  korr. Sie wurden aus wenig absolutem Alkohol um-krystallisiert und gaben nach dem Waschen mit Äther 2 mg schöne farblose Nadeln vom Smp.  $202\text{—}204^\circ$  korr. Für die Untersuchung muss mehr Material gesammelt werden<sup>2)</sup>.

#### Identifizierung von Dehydro-corticosteron-acetat.

Die bezeichneten Fraktionen wurden zur Reinigung in einer Spur Aceton gelöst, mit der fünffachen Menge absoluten Äthers ver-setzt, wenn nötig filtriert, eingengt und krystallisieren gelassen. Die farblosen Krystalle schmolzen bei  $178\text{—}180^\circ$  korr. und gaben mit dem früher aus Corticosteron-acetat durch Oxydation erhaltenen Material von demselben Schmelzpunkt<sup>3)</sup> keine Erniedrigung. Es ist dies das erste Mal, dass Dehydro-corticosteron in diesem Labora-torium aus Nebennierenextrakt isoliert wurde. Es ist auffallend, wie wenig von diesem Stoff in unseren Extrakten enthalten ist, in denen das Corticosteron bei weitem überwiegt, während *Kendall* und Mit-arbeiter<sup>4)</sup> aus ihren Extrakten etwa gleich viel von beiden erhalten haben und das Dehydro-corticosteron (Compound A) sogar als erste Substanz durch direkte Krystallisation passender Konzentrate iso-lieren konnten. Bei der hier beschriebenen Trennung wurden insge-samt nur etwa 50 mg Dehydro-corticosteron gewonnen, das ausge-zeichnet krystallisiert, während vom Corticosteron noch bei der Chromatographie über 300 mg erhalten wurden. Die Haupt-

<sup>1)</sup> Wir verdanken die Messung den HH. Priv.-Doz. Dr. *H. Mohler* und Dr. *Hämmerle*, Zürich.

<sup>2)</sup> Die Konstitution der Substanz *R* konnte inzwischen doch ermittelt werden, es liegt Allo-pregnan-triol-(3,11,21)-on-(20) vor, wie demnächst mitgeteilt wird.

<sup>3)</sup> *T. Reichstein*, *Helv.* **20**, 953 (1937).

<sup>4)</sup> *H. L. Mason, W. M. Hoehn, B. F. McKenzie, E. C. Kendall*, *J. Biol. Chem.* **120**, 719 (1937).

menge, etwa 2 g (!), war dabei im Laufe der Vortrennung bereits abgetrennt worden.

#### Isolierung von Corticosteron-acetat.

Die Fraktionen, die diesen Stoff enthalten, erstarren nach Eindampfen der Benzollösung auf Zusatz von etwas Äther meist gallertig. Werden sie jedoch in einer Spur Aceton gelöst und mit etwas absolutem Äther verdünnt stehen gelassen, so scheiden sich schöne, meist zu Büscheln vereinigte langgestreckte Blättchen ab, die meist bei 147—148° korr. schmolzen. Manchmal wurde auch der früher beobachtete<sup>1)</sup> doppelte Schmelzpunkt gefunden. Die Mischprobe mit Corticosteron-acetat gab keine Erniedrigung. Das Material reduzierte alkalische Silberdiamminlösung und gab die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure sehr stark. Bei den verschiedenen Chromatographierungen wurde noch über 300 mg reines Acetat erhalten, obwohl die Hauptmenge des Corticosterons bereits durch die Vortrennung abgeschieden war.

Isolierung eines Acetats vom Smp. 240° korr., das möglicherweise mit dem Acetat von Substanz F a. identisch ist<sup>2)</sup>.

Die als „Acetat von Substanz F a. (?)“ bezeichneten Krystalle, die aus den entsprechenden Fraktionen mit Aceton-Äther gewonnen waren, wurden zusammen aus wenig Aceton umkrystallisiert. Es wurden insgesamt 50 mg farblose Nadeln erhalten, die beim Erwärmen schon unter 100° opak wurden und bei 238—240° korr. schmolzen. Das früher beschriebene Acetat von Substanz F a.<sup>3)</sup> verhält sich genau gleich, und die Mischprobe gab keine Erniedrigung (nach starkem Verreiben wird der Schmelzpunkt beider Acetate etwas tiefer, bei etwa 230—236° korr. gefunden, was bei der Mischprobe zu berücksichtigen ist). Das aus der Chromatographie isolierte Acetat reduzierte auch alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur stark. Trotzdem ist der Stoff wahrscheinlich mit dem Acetat von Substanz F a. nicht identisch, da das letztere mit konz. Schwefelsäure die von *Wintersteiner* beschriebene grüne Fluoreszenzreaktion<sup>4)</sup> gibt, während das erstere mit Schwefelsäure eine karminrote Färbung liefert, die am besten auf weisser Unterlage sichtbar ist. Die Verseifung dieses Acetats mit Kaliumbicarbonat in Methanol bei Zimmertemperatur gab farblose Krystalle, die nach Umkrystal-

<sup>1)</sup> *T. Reichstein*, *Helv.* **20**, 953 (1937).

<sup>2)</sup> Es hat sich inzwischen gezeigt, dass in der Tat ein neuer Stoff vorliegt, der als Substanz S bezeichnet wird. Die Konstitution konnte ermittelt werden und wird demnächst mitgeteilt.

<sup>3)</sup> *T. Reichstein*, *Helv.* **20**, 988 (1938).

<sup>4)</sup> *O. Wintersteiner*, *J. J. Piffner*, *J. Biol. Chem.* **116**, 291 (1936).

lisieren aus wenig absolutem Alkohol bei 213—217° korr. schmolzen und wiederum mit Substanz F a., die denselben Schmelzpunkt zeigt, keine Depression gaben, sich jedoch auch durch die Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure von ihr unterschieden. Es wird weiter geprüft, ob eine Identität vorliegt<sup>1)</sup>.

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

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

### 136. Die Reduktion der beiden *d*-Zuckersäure-lactone mit Natriumamalgam<sup>2)</sup>

von M. Sutter und T. Reichstein.

(24. VIII. 38.)

*d*-Zuckersäure (I) kann theoretisch zwei verschiedene  $\gamma$ -Lactonsäuren (II) und (III) bilden. Wenn man von den optischen Antipoden absieht, so kann von allen normalen Dicarbonsäuren, die sich von Aldohexosen ableiten, nur noch die Talo-schleimsäure ein ähnliches Paar von isomeren Lactonen geben, die vor etwa zwei Jahren auch wirklich erhalten wurden<sup>3)</sup>. Bei allen anderen Hexosedicarbonsäuren ist wegen der höheren Symmetrie jeweils nur eine  $\gamma$ -Lactonsäure theoretisch möglich.

Bei der *d*-Zuckersäure ist bisher jedoch nur ein krystallisiertes Mono-lacton genauer untersucht worden. Es wurde von *Sohst* und *Tollens*<sup>4)</sup> schon vor 50 Jahren beschrieben und schmilzt bei 135°. Offenbar galt als gesichert, dass diesem Lacton die Formel (II) zukommt, denn sie findet sich in den meisten Lehrbüchern, obgleich ein strenger Beweis nicht vorliegt<sup>5)</sup>. Es war daher einigermassen überraschend, als *Schmidt*, *Zeiser* und *Dippold*<sup>6)</sup> vor kurzem über

<sup>1)</sup> Es hat sich inzwischen gezeigt, dass in der Tat ein neuer Stoff vorliegt, der als Substanz S bezeichnet wird. Die Konstitution konnte ermittelt werden und wird demnächst mitgeteilt.

<sup>2)</sup> Auszug aus der Diss. M. Sutter, die später erscheint.

<sup>3)</sup> M. Steiger, T. Reichstein, *Helv.* **19**, 195 (1935).

<sup>4)</sup> O. Sohst, B. Tollens, *A.* **245**, 1 (1888).

<sup>5)</sup> Diese Annahme leitete sich aus dem Resultat der Reduktion der Zuckerlactonsäure ab, die von E. Fischer und O. Piloty, *B.* **24**, 521 (1891) durchgeführt wurde und kleine Mengen von *d*-Glucuronsäure (IV) und *l*-Gulonsäure (V) lieferte. Fischer und Piloty haben aber nicht das einheitliche krystallisierte Lacton reduziert, sondern syrupöses Material, in dem wahrscheinlich etwas des isomeren Lactons enthalten war. Vgl. weiter die Darlegungen von Schmidt und Günther, *B.* **71**, 493 (1938).

<sup>6)</sup> O. Th. Schmidt, H. Zeiser, H. Dippold, *B.* **70**, 2402 (1937).