

166. Über Bestandteile der Nebennierenrinde.

(21. Mitteilung)¹⁾

Die Konstitution der Substanzen R und S

von T. Reichstein.

(28. IX. 38.)

In der 20. Mitteilung dieser Reihe¹⁾ wurde unter anderem die Isolierung einer neuen Substanz R beschrieben. Ferner wurde dort auch die Abtrennung eines Acetates einer weiteren Substanz erwähnt, deren Eigenschaften so weitgehend mit denjenigen der früher beschriebenen Substanz F. a.²⁾ übereinstimmten, dass zunächst noch nicht mit Sicherheit entschieden werden konnte, ob wirklich das Acetat von Substanz F. a. oder ein neuer Stoff vorlag. Wie anlässlich der Korrektur bereits vermerkt³⁾ hat es sich inzwischen herausgestellt, dass tatsächlich eine neue Verbindung vorliegt, die nunmehr als Substanz S bezeichnet wird.

Substanz S (VI) und Substanz F. a. (VIII) sind ausserordentlich ähnlich. Nicht nur die freien Oxyketone schmelzen fast gleich und geben bei der Mischprobe keine brauchbare Schmelzpunkts-Erniedrigung, sondern dasselbe ist auch bei den schön krystallisierenden Monoacetaten der Fall. Eine rasche Unterscheidung erlaubt hingegen die Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure, die mit einem kleinen Krystallsplitter auf dem Objektträger ausgeführt werden kann⁴⁾. F. a. gibt, auf weisser Unterlage betrachtet, eine orange Färbung, die auf schwarzer Unterlage leuchtend grün fluoresziert⁴⁾. Substanz S dagegen gibt eine karminrote Färbung, die am besten auf weisser Unterlage sichtbar ist. Verschieden sind schliesslich auch die Bruttoformeln. F. a. hat die Formel $C_{21}H_{28}O_5$, während Substanz S die Zusammensetzung $C_{21}H_{30}O_4$ besitzt.

Die Konstitution der Substanzen R und S konnte inzwischen, trotz der recht geringen Mengen, die rein vorlagen, im wesentlichen aufgeklärt werden, da die Oxydation zu bekannten Produkten führte.

Substanz R besitzt Formel (III). Das freie Trioxyketon liess sich aus dem Diacetat (I) durch Verseifung mit Kaliumbicarbonat in Methylalkohol⁵⁾ gewinnen. Es krystallisierte aus absolutem Al-

¹⁾ 20. Mitteilung T. Reichstein, *J. v. Euw*, *Helv.* **21**, 1197 (1938).

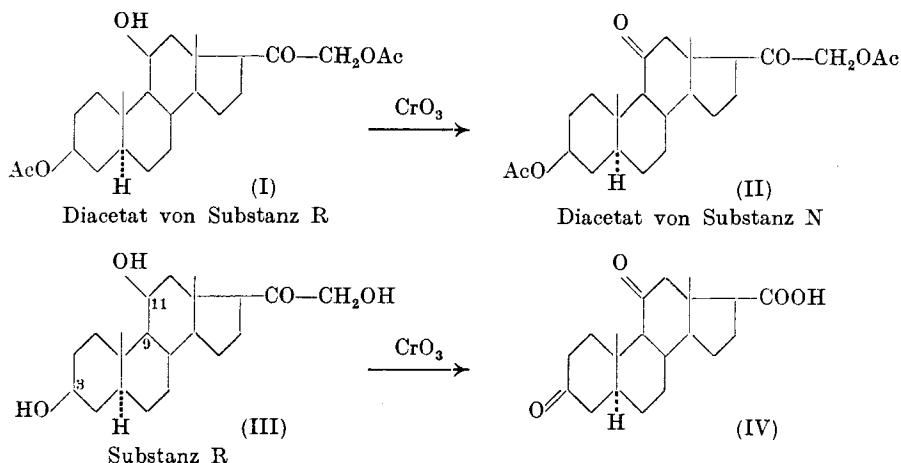
²⁾ T. Reichstein, *Helv.* **19**, 1107 (1936); **20**, 978 (1937). F. a. ist identisch mit Compound F von O. Wintersteiner und Pfiffner, *J. Biol. Chem.* **111**, 599 (1935); **116**, 291 (1936), sowie Compound E von Kendall und Mitarb., *J. Biol. Chem.* **114**, 613 (1936); **116**, 267 (1936).

³⁾ T. Reichstein, *J. v. Euw*, *Helv.* **21**, Anm. 2, S. 1209 (1938).

⁴⁾ O. Wintersteiner, J. J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.* **116**, 291 (1936).

⁵⁾ T. Reichstein, *J. v. Euw*, *Helv.* **21**, 1181 (1938).

kohol in farblosen Nadeln vom Smp. 202—204° korr. Dieser Schmelzpunkt entspricht möglicherweise noch nicht der höchsten Reinheit, da wegen der geringen Menge nur ein einmaliges Umkrystallisieren möglich war.



Wie früher erwähnt, zeigt (I) im U. V.-Absorptionsspektrum nicht die Bande der α, β -ungesättigten Ketone. Es gibt auch nicht die grüne Fluoreszenzreaktion mit konz. Schwefelsäure¹⁾, reduziert aber alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur stark. Die beiden Reaktionen konnten auch mit dem freien Oxyketon (III) nachgeprüft werden und fallen damit genau gleich aus. Sie stehen mit den Formeln in bestem Einklang.

Die Oxydation der freien Substanz R (III) mit Chromsäure in Eisessig bei Zimmertemperatur gab keine Neutralstoffe, sondern lediglich eine Säure, die sich identisch mit der Säure (IV) erwies, die durch Abbau von Corticosteron oder Dehydro-corticosteron mit anschließender Hydrierung oder aus Substanz N (identisch mit *Kendall's Compound H*) direkt mit Chromsäure erhältlich ist²⁾. Aus diesem Ergebnis kann die Formel (III) bereits abgeleitet werden, denn da R bei Zimmertemperatur ein Diacetat liefert, muss das Sauerstoffatom in 3-Stellung als Hydroxylgruppe vorhanden sein. Aber auch in 11-Stellung muss eine Hydroxylgruppe vorliegen, da der entsprechende Stoff, der dort eine Ketogruppe trägt (Substanz N)

¹⁾ Diese Farbreaktion wurde zuerst von *O. Wintersteiner* und *J. J. Piffner* bei ihrer Compound F beobachtet, *J. Biol. Chem.* **116**, 291 (1936). Sie wird ausser von dieser Substanz (identisch mit Substanz F. a. nach unserer Nomenklatur) noch von Corticosteron, Substanz M und Substanz E (nach unserer Bezeichnung) gegeben. Sie ist also nicht sehr spezifisch, aber trotzdem für die rasche Unterscheidung oft sehr nützlich.

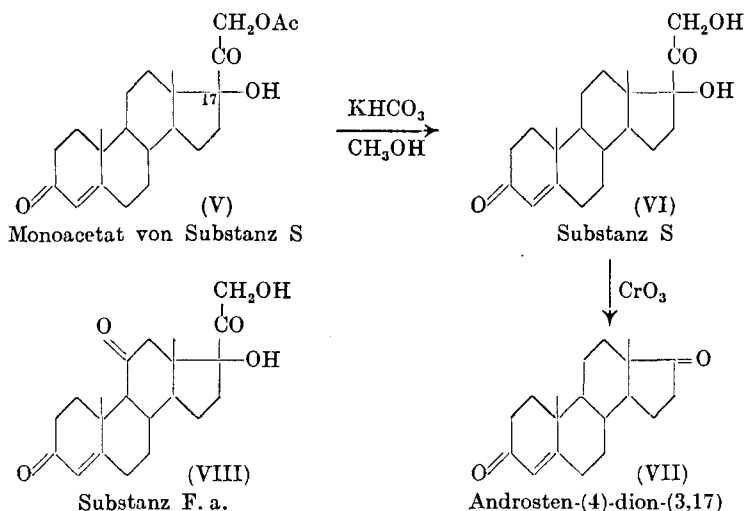
²⁾ *H. L. Mason*, *W. M. Hoehn*, *B. F. McKenzie*, *E. C. Kendall*, *J. Biol. Chem.* **120**, 719 (1937), von diesen Autoren als „Acid 1 A“ bezeichnet. *M. Steiger*, *T. Reichstein*, *Helv.* **21**, 161 (1938).

bereits bekannt und von Substanz R verschieden ist. Eine erwünschte Bestätigung konnte durch direkte Oxydation des Diacetates (I) mit Chromsäure erbracht werden. Es entstand dabei ein Neutralstoff vom Smp. 148° korr., der sich mit dem Acetat von Substanz N (II) als identisch erwies.

Die Formel der Substanz R (III) ist somit mit denjenigen der drei anderen Vertreter der $C_{21}O_4$ -Gruppe verknüpft und die Funktion der verschiedenen Sauerstoffatome gesichert¹⁾.

Eine Prüfung, ob der Substanz R Cortinwirksamkeit zukommt, konnte wegen zu geringer Menge nicht durchgeführt werden. Nach der chemischen Konstitution ist jedoch anzunehmen, dass sie unwirksam ist.

Bedeutend grösseres Interesse beansprucht Substanz S. Sie besitzt die Zusammensetzung $C_{21}H_{30}O_4$, ist also isomer mit Corticosteron. Es kommt ihr Formel (VI) zu, in der lediglich die Konfiguration am Kohlenstoffatom Nr. 17 noch unsicher ist.



Aus dem bei 240° korr. schmelzenden Monoacetat (V), dessen Gewinnung in der 20. Mitteilung beschrieben wurde, lässt sich das freie Oxyketon (VI) durch vorsichtige Verseifung mit Kaliumbicarbonat in wässrigem Methylalkohol am besten bei Zimmertemperatur²⁾ gewinnen. Es krystallisiert aus Aceton in farblosen Blättchen, die bei ca. 210° korr. unter leichter Zersetzung schmelzen.

¹⁾ Ein strenger Beweis fehlt bei allen diesen Verbindungen noch dafür, dass die in 3- und 11-Stellung angenommenen Sauerstoffatome sich wirklich dort befinden. Ferner ist auch die Konfiguration am Kohlenstoff Nr. 9 unsicher für den Fall, dass ein Sauerstoffatom sich wirklich in 11-Stellung befindet.

²⁾ Für die Dioxy-aceton-Derivate ist die heisse Verseifung mit Bicarbonat ungeeignet. Vgl. *T. Reichstein, J. v. Euw, Helv. 21, 1181 (1938).*

Der Schmelzpunkt ist merklich von der Erhitzungsgeschwindigkeit und vom Grad des vorhergehenden Verreibens abhängig. Die freie Substanz S gibt genau wie das Monoacetat mit konz. Schwefelsäure eine karminrote Färbung. Sie reduziert alkalische Silberdiamminlösung bei Zimmertemperatur stark und zeigt im U. V.-Absorptionsspektrum die typische Bande der α, β -ungesättigten Ketone (vgl. untenstehende Kurve¹⁾, Figur 1).

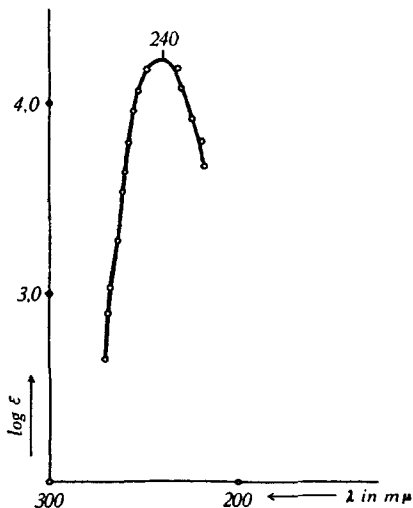


Fig. 1.

U. V. Absorptionsspektrum der Substanz S.

$c = 0,000161$ mol. in Alkohol. ϵ = molarer Extinktionskoeffizient.

Die Oxydation der Substanz S mit Chromsäure in Eisessig bei Zimmertemperatur gab kaum Spuren von Säuren, dagegen einen bei 170° korr. schmelzenden Neutralstoff, der sich als Androsten-(4)-dion-(3,17) (VII) erwies. Aus diesem Befund ergibt sich in Kombination mit den reduzierenden Eigenschaften zwangsläufig die Konstitutionsformel (VI), wenn man die wenig wahrscheinliche isomere Dioxy-aldehyd-Gruppierung ($-\underset{|}{\text{COH}}-\text{CHOH}-\text{CHO}$) nicht berücksichtigt. Das Vorliegen der Dioxy-aceton-Gruppierung soll noch besonders nachgewiesen werden, sobald sich mehr Material gewinnen lässt. Unsicher ist die Konfiguration am Kohlenstoffatom Nr. 17. Aus Analogiegründen mit der ähnlich gebauten Substanz P²⁾ ist es naheliegend zu vermuten, dass sie der 17(β)-Reihe³⁾ angehört. Für die Abklärung muss die Beschaffung von neuem Material oder das

¹⁾ Wir verdanken die Kurve Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Möhler, Zürich. Die Aufnahmetechnik und Auswertung entspricht den in der 10. Mitteilung, Helv. **20**, 957 (1937) gemachten Angaben.

²⁾ T. Reichstein, K. Gätzi, Helv. **21**, 1185 (1938).

³⁾ Zur Nomenklatur vgl. die vorstehend zitierte Arbeit.

Ergebnis von synthetischen Versuchen abgewartet werden. Letztere sind in Gemeinschaft mit *L. Ruzicka* in Angriff genommen. Es ist zu erwarten, dass Substanz S starke Cortinwirksamkeit besitzt. Die Durchführung der biologischen Prüfung war aber bisher noch nicht möglich.

Ich danke der *Gesellschaft für Chemische Industrie*, Basel, der *Haco-Gesellschaft*, Gümligen, und der *N. V. Organon*, Oss, für Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil.

Analyse des Diacetates von Substanz R.

Das Acetat wurde aus Methanol rasch umkrystallisiert und in farblosen Stäbchen erhalten, die mit einer Mischung von 1 Teil Äther mit 3 Teilen Pentan gewaschen wurden. Sie schmolzen bei 172—173° korr.

Zur Analyse wurde 1 Stunde bei 100° und 0,001 mm getrocknet.

4,009 mg Subst. gaben 10,16 mg CO₂ und 3,12 mg H₂O

C ₂₅ H ₃₈ O ₈ (434,55)	Ber. C 69,09	H 8,82%
	Gef. „ 69,11	„ 8,71%

Abbau von Substanz R zu Diketo-allo-ätio-cholansäure (IV).

2 mg Substanz R (es musste eine nicht ganz reine Probe verwendet werden, die bei 195—204° korr. schmolz, während das reinste Material einen Smp. von 202—204° korr. zeigte), wurden in 0,2 cm³ reinstem Eisessig gelöst, mit 0,125 cm³ einer 2-proz. Lösung von Chromtrioxyd in Eisessig (= 2,5 mg CrO₃) versetzt und 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es fiel zunächst sofort ein brauner Niederschlag aus, der nach der angegebenen Zeit völlig gelöst war. Es wurde im Vakuum bei 20° Badtemperatur zur Trockne gedampft, der Rückstand mit Wasser versetzt und mit frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit Wasser gewaschen, mit wenig Natronlauge ausgezogen und hierauf wieder mit Wasser gewaschen. Sie hinterliess nach dem Trocknen mit Sulfat beim Eindampfen keinen merkbaren Rückstand. Aus dem alkalischen Auszug fiel auf Zusatz von einigen Tropfen starker Salzsäure eine krystalline Säure aus. Sie wurde mit Äther ausgeschüttelt und krystallisierte sofort beim Einengen. Nach Waschen mit etwas ätherhaltigem Pentan schmolzen die Krystalle bei 280—285° korr. unter leichter Zersetzung, wobei sich teilweise Nadeln bildeten, die erst bei 292° korr. fertig schmolzen. Eine Probe der 3,11-Diketo-allo-ätio-cholansäure (IV), die aus Corticosteron bereitet worden war¹⁾, schmolz bei 286—290° korr. Die Mischprobe gab keine Erniedrigung des Schmelzpunktes. Die aus Substanz R gewonnene Säure wurde zur Umwandlung in den Methylester 10 Minuten mit

¹⁾ *M. Steiger, T. Reichstein, Helv. 21, 161 (1938).*

überschüssiger ätherischer Diazomethan-Lösung stehen gelassen. Dann wurde mit Salzsäure, Natronlauge und Wasser gewaschen, getrocknet, stark eingengt und mit Pentan versetzt. Der rasch krystallisierende Methylester wurde nochmals aus wenig Äther-Pentan umkrystallisiert. Er schmolz bei 207—210° korr. Die aus Corticosteron gewonnene Diketo-säure gab einen Methylester vom gleichen Schmelzpunkt, und die Mischprobe gab keine Erniedrigung. *Kendall* und Mitarbeiter¹⁾ fanden für ihre „Acid 1A“ einen Smp. von 272—273° unkor. und für deren Methylester einen solchen von 200—201° unkor.

Diacetat der Substanz N (II) aus dem Diacetat von Substanz R (I).

1,8 mg reinstes Acetat (I) wurden in 0,2 cm³ reinstem Eisessig gelöst und mit der Lösung von 0,5 mg Chromtrioxyd in 0,025 cm³ Eisessig versetzt. Die Lösung blieb klar und wurde 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum bei 20° Badtemperatur eingedampft, mit etwas Wasser versetzt und mit frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit stark verdünnter Schwefelsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen. Aus dem Sodauszug wurden keine sauren Bestandteile erhalten. Die neutrale Ätherlösung wurde getrocknet und eingedampft. Der Rückstand krystallisierte sofort und schmolz roh bei 147—149°. Durch Umkrystallisieren aus Äther-Pentan wurden farblose Nadelbüschel erhalten, die bei 148—149° korr. schmolzen. Nach sehr starkem Verreiben war der Smp. 144—148,5° korr. Das Acetat der Substanz N (II)²⁾ sowie die Mischprobe schmolzen genau gleich.

Substanz S (VI).

20 mg Acetat von Substanz S (V) vom Smp. 239—241° korr., dessen Gewinnung und Eigenschaften in der 20. Mitteilung beschrieben sind, wurden in 2 cm³ Methanol gelöst, mit der Lösung von 20 mg Kaliumbicarbonat in 0,4 cm³ Wasser versetzt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Mischung war auch nach dieser Zeit praktisch farblos. Dann wurde das Methanol im Vakuum völlig entfernt und der Rückstand mehrmals mit frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen wurden einmal mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet und auf ein kleines Volumen eingengt. Es trat bald Krystallisation ein. Die Krystalle wurden durch Dekantieren mit etwas Äther gewaschen und hierauf aus wenig Aceton umkrystallisiert. Es wurden 8 mg farbloser, durchsichtiger Blättchen erhalten, die nach dem Waschen mit einer Mi-

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

²⁾ *T. Reichstein, K. Gätzi*, Helv. **21**, 1185 (1938).

schung von Äther und Pentan bei 207—209° korr. unter leichter Zersetzung schmolzen. Aus wenig absolutem Alkohol wurden flache Spiesse erhalten, die bei 213—217° korr. ebenfalls unter leichter Zersetzung schmolzen. Nach starkem Verreiben wird der Schmelzpunkt stets einige Grade tiefer gefunden. Die Mischprobe mit Substanz F. a. schmolz bei 198—207° korr. Aus den Mutterlaugen liessen sich durch starkes Einengen und Zusatz von etwas Äther noch 2,8 mg Krystalle vom Smp. 200—206° korr. erhalten. Substanz S ist leicht löslich in Alkohol, Aceton und Methanol, schwer in Äther und Wasser. Die allgemeinen Reaktionen und das Spektrum sind im theoretischen Teil angegeben. Zur Analyse wurde das bei 207—209° korr. schmelzende Präparat eine Stunde bei 100° und 0,002 mm getrocknet.

3,175 mg Subst. gaben 8,49 mg CO₂ und 2,50 mg H₂O

C₂₁H₃₀O₄ (346,45) Ber. C 72,80 H 8,74%
 Gef. „ 72,92 „ 8,81%

Bei einem Versuch, das Acetat von S durch einstündiges Kochen mit Bicarbonat und wässrigem Methanol zu verseifen, wurde eine stark gelbe Lösung erhalten, aus der sich ebenfalls reine Krystalle von S isolieren liessen, doch nur in sehr schlechter Ausbeute. Auch beim Acetat der Substanz F. a. gibt die kalte Verseifung viel bessere Resultate als die heisse. Aus diesem Grunde ist die in der 20. Mitteilung angegebene Methode zur Isolierung von S wahrscheinlich sehr verlustreich. Bei einer Wiederholung sollen daher alle Verseifungsoperationen mit Bicarbonat möglichst bei Zimmertemperatur durchgeführt werden.

Abbau von Substanz S (VI) zu Androsten-dion (VII).

Zur Oxydation wurden die 2,8 mg aus Mutterlaugen gewonnener Krystalle benutzt, die bei 200—206° korr. schmolzen. Sie wurden in 0,2 cm³ reinstem Eisessig gelöst, mit 0,14 cm³ einer 2-proz. Lösung von Chromtrioxyd in Eisessig (= 2,8 mg CrO₃) versetzt und 16 Stunden stehen gelassen. Der zunächst ausfallende braune Niederschlag war dann in Lösung gegangen. Die grünlichbraune Lösung wurde im Vakuum bei 20° Badtemperatur zur Trockne gedampft, der Rückstand mit etwas Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde zuerst mit Wasser gewaschen, dann mit ½ cm³ wässriger Natronlauge ausgeschüttelt. Aus der alkalischen Lösung liessen sich jedoch keine sauren Bestandteile abscheiden. Die neutrale Ätherlösung wurde nochmals mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand krystallisierte und schmolz roh bei 160—170° korr. Das Produkt wurde gleich über eine mit Pentan bereitete Säule von 200 mg Aluminiumoxyd (*Merck*, standardisiert nach *Brockmann*) chromatographiert, wobei es langsam mit einer Mischung von absolutem Benzol und Pentan (1:1), wenig rascher mit absolutem Benzol ins Filtrat gelangte. Es wurde

so oft mit kleinen Benzolmengen nachgewaschen, bis diese keinen Rückstand mehr hinterliessen. Die vereinigten Filtrate wurden eingedampft, der Rückstand im Hochvakuum sublimiert, zunächst aus Äther-Pentan, dann nochmals aus wenig absolutem Äther umkrystallisiert und mit Pentan gewaschen. Es wurden 1 mg farbloser Nadeln erhalten, die bei 170—174° korr. schmolzen. Eine chromatographisch gereinigte Probe von Androsten-(4)-dion-(3,17), die nach *R. Oppenauer*¹⁾ bereitet worden war, schmolz bei 172—174° korr. Die Mischprobe gab keine Erniedrigung.

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

Laboratorium für Organ. Chemie der Eidg. Techn. Hochschule,
Zürich.

167. Über Bestandteile der Nebennierenrinde.

(22. Mitteilung²⁾)

Die Konstitution von Substanz L

von *T. Reichstein* und *K. Gätzi*.

(29. IX. 38.)

In der 6. Mitteilung³⁾ dieser Reihe wurde die Isolierung der Substanz L erwähnt, diese aber nicht weiter beschrieben. Es ist inzwischen vermerkt worden⁴⁾, dass Substanz L nach der analytischen Zusammensetzung und nach ihren Eigenschaften wahrscheinlich identisch ist mit „Compound G“ von *Wintersteiner* und *Pfiffner*⁵⁾. Diese Autoren geben für Compound G einen Smp. von 264° korr., eine spez. Drehung von $[\alpha]_D^{26} = +38^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0,64% in 95-proz. Alkohol) und eine Bruttoformel $C_{21}H_{32-34}O_3$ an. Ihre Verbindung gab ein Mono-semicarbazon und zeigte im U. V.-Absorptionsspektrum bei 240 m μ keine Bande, wie sie einem α, β -ungesättigten Keton entspricht. Obwohl ein direkter Vergleich nicht möglich war, ist es nach diesen Angaben äusserst wahrscheinlich, dass Compound G und Substanz L identisch sind.

Isolierung von Substanz L. Bei der von uns angewandten Vortrennung der Nebennierenextrakte³⁾ durch Verteilung zwischen

¹⁾ *R. V. Oppenauer*, R. **51**, 137 (1937).

²⁾ 21. Mitteilung *T. Reichstein*, Helv. **21**, 1490 (1938).

³⁾ *T. Reichstein*, Helv. **19**, 1107 (1936).

⁴⁾ „Chemie des Cortins und seiner Begleitstoffe.“ „Ergebnisse der Hormon- und Vitaminforschung“, herausgegeben von *L. Ruzicka* und *W. Stepp*, Leipzig 1938, S. 364.

⁵⁾ *O. Wintersteiner*, *J. J. Pfiffner*, J. Biol. Chem. **116**, 291 (1936).