

83. Über Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandte Stoffe 36. Mitteilung¹⁾

Nachweis der Lage der Doppelbindung im Corticosteron

von T. Reichstein und H. G. Fuchs²⁾.

(10. V. 40.)

Für Corticosteron ist heute die Formel (I) allgemein anerkannt. Bewiesen ist darin das Kohlenstoffskelett, und zwar durch Überführung in Allo-pregnan (II)³⁾, ferner die Anordnung und Funktion der zwei Sauerstoffatome in der Seitenkette⁴⁾. Nicht bewiesen ist bisher die Lage der beiden anderen Sauerstoffatome, sowie diejenige der Doppelbindung. Die Formulierung (I) stützt sich in dieser Beziehung hauptsächlich auf Analogieschlüsse⁵⁾. In dieser Arbeit wird ein erster chemischer Beweis dafür erbracht, dass die zweite Keto-Gruppe sich wirklich in 3-Stellung und die benachbarte Doppelbindung in 4-Stellung befindet.

Zu diesem Zwecke wurde (I) durch Oxydation mit Chromsäure und anschließende Veresterung mit Diazomethan in den bekannten⁶⁾ Methylester (III) der Diketo-ätio-cholensäure übergeführt. Die letztere ist auch leicht aus Dehydro-corticosteron mit Chromsäure oder besser mit Perjodsäure zu gewinnen⁷⁾. Der Ester (III) wurde nun mit Ozon abgebaut, wobei neben wenig Neutralstoffen der Monomethylester einer Dicarbonsäure erhalten wurde, dessen Analysenwerte mit der erbrachten Formel (IV) übereinstimmen. Dieser Methylester wurde einer *Clemmensen*-Reduktion unterworfen, wobei ein Gemisch von Säuren entstand. Um daraus die gesuchte Dicarbonsäure (V) zu isolieren, wurde das Säuregemisch über das Chlorid ins Anilid übergeführt und dieses chromatographisch gereinigt. Es liess sich auf diese Weise in geringer Menge das reine Anilid (VI) isolieren. Dasselbe Anilid wurde nämlich erhalten, als 3-Keto-ätio-cholen-(4)-säure-methylester (VII)⁸⁾, dessen Konstitution feststeht, einem

¹⁾ 35. Mitteilung, T. Reichstein, W. Schindler, Helv. **23**, 669 (1940).

²⁾ Auszug aus der Diss. H. G. Fuchs, die demnächst erscheint.

³⁾ M. Steiger, T. Reichstein, Helv. **21**, 161 (1938).

⁴⁾ H. L. Mason, W. M. Hoehn, B. F. McKenzie, E. C. Kendall, J. Biol. Chem. **120**, 719 (1937) u. a. T. Reichstein, Helv. **20**, 953 (1937).

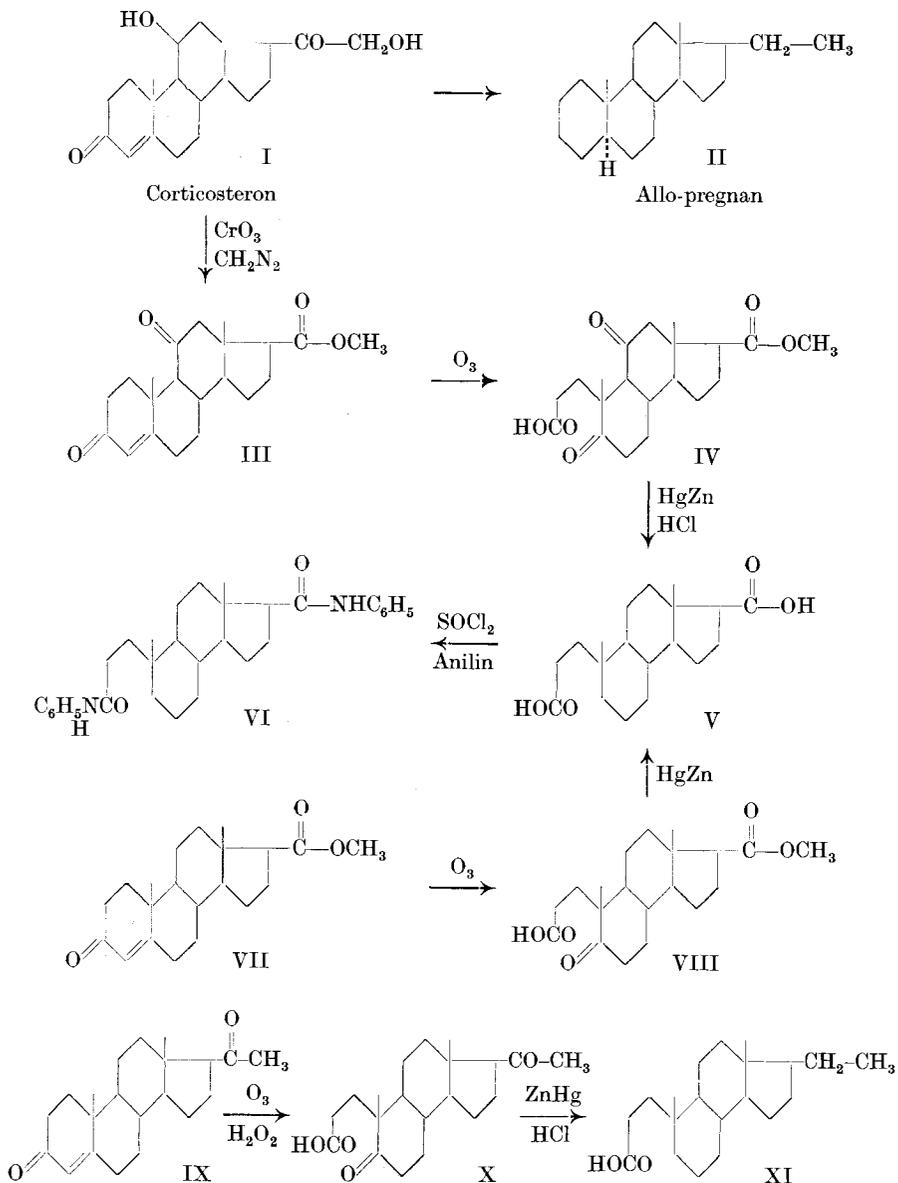
⁵⁾ Vgl. die Zusammenstellungen: H. L. Mason, Endocrinology **25**, 405 (1939); T. Reichstein, Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden (herausgegeben von E. Abderhalden) Abt. V. Teil 3 B. 1367 (1938).

⁶⁾ T. Reichstein, Helv. **20**, 953 (1937).

⁷⁾ H. L. Mason, W. M. Hoehn, B. F. McKenzie, E. C. Kendall, J. Biol. Chem. **120**, 719 (1937) u. a.

⁸⁾ M. Steiger, T. Reichstein, Helv. **20**, 1040 (1937).

analogen Abbau unterworfen wurde. Die Spaltung mit Ozon lieferte auch hier zunächst einen sauren Methylester (VIII), der durch Reduktion nach *Clemmensen* die Dicarbonsäure (V) ergab. In diesem Fall wurde die Dicarbonsäure (V) leicht in reiner Form und in brauchbarer Ausbeute erhalten. Ihr Dianilid war mit dem aus Corticosteron erhaltenen nach Schmelzpunkt und Mischprobe identisch.



Der hier beschriebene Konstitutionsbeweis ist mit einer gewissen Unsicherheit behaftet wegen der sehr schlechten Ausbeute bei der Überführung von (IV) in (VI). Dies ist zwar verständlich, da durch die Nachbarschaft der 11-ständigen Keto-Gruppe zu dem Asymmetriezentrum an C₉ die Bildung von zwei stereoisomeren Säuren möglich ist. Auch in früheren Fällen¹⁾ wurde beobachtet, dass bei der *Clemmensen*-Reduktion von Säuren mit einer Keto-Gruppe in 11-Stellung sehr schlechte Ausbeuten resultieren. Der Einwand, dass die am Schluss isolierte kleine Menge von (VI) gar nicht dem eingesetzten (I) entstammt, sondern einer schwer abtrennbaren Verunreinigung desselben, ist daher nicht mit völliger Sicherheit auszuschliessen. Wir haben versucht, diese Möglichkeit auf ein Minimum zu reduzieren durch Verwendung von hochgereinigtem Ausgangsmaterial. Ferner wurde die 3-Stellung des einen Sauerstoffatoms inzwischen noch auf einem anderen, unabhängigen Wege eindeutig bewiesen²⁾. Wir glauben daher, dass die hier beschriebenen Resultate als starke Stütze dafür anzusehen sind, dass sich die Doppelbindung des Corticosterons wirklich in 4,5-Stellung befindet.

Für Vergleichszwecke wurde schliesslich Progesteron (IX) einem ähnlichen Abbau zu (X) und (XI) unterzogen. Die Säure (XI) sollte ursprünglich als Bezugssubstanz für einen anderen Abbau des Corticosterons dienen. Sie ist jedoch relativ leicht löslich und für diesen Zweck nicht besonders geeignet.

Experimenteller Teil.

1,2-Cyclopentano-2,5-dimethyl-3,6-diketo-decalinpropionsäure-(5)-carbonsäure-methylester-(3') (IV).

Um sicher reines Ausgangsmaterial zu haben, wurde Dehydrocorticosteron-acetat³⁾ chromatographisch gereinigt und zunächst aus Äther durch Einengen, dann aus verdünntem Methanol umkrystallisiert. Die rein weissen Nadeln schmolzen bei 181—181,5⁰ korr. 360 mg dieses reinsten Acetats wurden zur Verseifung⁴⁾ in 36 cm³ Methanol gelöst und mit der Lösung von 390 mg Kaliumbicarbonat in 10 cm³ Wasser 40 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde mit etwas mehr Wasser versetzt und im Vakuum das Methanol langsam vollständig entfernt, wobei das Oxyketon krystallisiert ausfiel. Es wurde abgenutscht und mit Wasser gewaschen. Erhalten wurden 280 mg rein weisses Dehydro-corticosteron, das wie immer unscharf bei 170—180⁰ korr. schmolz. Zur Oxydation wurde es in 20 cm³ Methanol gelöst, mit der Lösung von 420 mg Perjodsäure

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

2) *C. W. Shoppee, Helv. 23, 740 (1940).*

3) *T. Reichstein, Helv. 20, 953 (1937)*

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

in 10 cm³ Wasser versetzt und 16 Stunden stehen gelassen. Nach Zusatz von etwas mehr Wasser wurde im Vakuum stark eingeeengt und anschliessend mit reichlichen Mengen Äther mehrmals ausgeschüttelt. Die anschliessende Trennung mit Sodalösung lieferte etwas Neutralprodukt (Smp. 174—180°), zur Hauptsache aber die 3,11-Diketo-ätio-cholen-(4)-säure, die beim Ansäuern der Sodauszüge sofort sehr rein ausfiel und mit Diazomethan methyliert wurde. Es wurden 185 mg reiner umkrystallisierter Methylester (III) erhalten.

185 mg 3,11-Diketo-ätio-cholen-(4)-säure-methylester (III) wurden in 10 cm³ Chloroform gelöst und bei 0° während 4 Minuten Ozon eingeleitet. Die Prüfung ergab, dass nach dieser Zeit freies Ozon in der Lösung nachweisbar war. Hierauf wurde das Chloroform im Vakuum abgedampft, der Rückstand mit 2,5 cm³ Eisessig und 0,5 cm³ Wasser versetzt und 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Mischung färbte Kaliumjodid-Stärke-Papier immer noch blau. Nach Zugabe von 100 mg Zinkstaub wurde kurze Zeit leicht erwärmt, bis die genannte Reaktion auf Peroxyd negativ ausfiel. Dann wurde filtriert, mit Äther und Wasser nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Trockne gedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser und verdünnter Salzsäure versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit verdünnter Salzsäure gewaschen und hierauf so oft mit kleinen Portionen 2-n. Sodalösung ausgezogen, bis diese beim Ansäuern keine Ausscheidung mehr gaben. Die im Äther verbliebenen geringen Mengen neutraler Bestandteile wurden vernachlässigt.

Die aus der Sodalösung ausgefallenen sauren Anteile wurden in Äther aufgenommen. Die Ätherlösung wurde mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und auf ein kleines Volumen eingeeengt. Die Krystallisation setzte bald ein und wurde durch Pentan vervollständigt. Es wurden 65 mg farbloser Körner erhalten, die bei 165—170° korr. schmolzen. Eine Probe wurde zur Analyse ohne weitere Reinigung 1 Stunde im Hochvakuum bei 90° getrocknet.

3,215 mg Subst. gaben 7,76 mg CO₂ und 2,21 mg H₂O

C ₂₀ H ₂₈ O ₈ (364,42)	Ber. C 65,91	H 7,74%
	Gef. „ 65,87	„ 7,69%

1,2-Cyclopentano-2,5-dimethyl-decalin-propionsäure-(5)-carbonsäure-(3') (V) aus Diketo-estersäure (IV).

6 g Zinkwolle wurden mit 120 cm³ 5-proz. wässrig-alkoholischer Sublimatlösung übergossen und unter öfterem Umschwenken 15 Minuten stehen gelassen. Dann wurde abgegossen und mehrmals mit Wasser gewaschen; hierauf wurden 60 mg Diketo-estersäure (IV), 6 cm³ Eisessig und 8,5 cm³ konz. Salzsäure zugegeben und nach Aufsetzen des aufgeschliffenen Rückflusskühlers auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Durch ein durch den Kühler nicht ganz bis an die Flüssigkeitsoberfläche reichendes Rohr wurde während des Wärmens

ein langsamer Strom von Salzsäuregas geleitet. Nach 2 Stunden war die Zinkwolle fast aufgebraucht. Es wurden noch 5 g amalgamierte gröbere Zinkspäne zugegeben und noch weitere 3 Stunden unter denselben Bedingungen erhitzt. Dann wurde ohne zu filtrieren im Vakuum stark eingengt, der Rückstand mehrmals gründlich mit Wasser und Äther durchgeschüttelt und die Flüssigkeit in einen Scheidetrichter abgegossen. Die Ätherlösung wurde abgetrennt, mehrmals mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es wurden 62 mg hellbraunes Rohprodukt erhalten, das mit etwas Äther versetzt mehrere Tage bei 0° stehen blieb. Danach hatten sich wenig Krystalle abgeschieden, die nach dem Waschen mit Äther farblos waren und bei 210—240° korr. schmolzen. Da eine Reinigung nicht gelang, wurde die ganze Mutterlauge ins Dianilid übergeführt.

Dianilid (VI) aus (V). Die im Vakuum gut getrocknete Mutterlauge (ca. 61,5 mg) wurde mit 0,3 g reinstem Thionylchlorid versetzt und unter Feuchtigkeitsausschluss 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 2 cm³ absolutem Äther gelöst und in die Lösung von 140 mg reinem Anilin in 5 cm³ absolutem Äther eingetragen. Es schied sich sofort etwas Anilinhydrochlorid ab.

Die ganze Mischung wurde hierauf mehrmals mit verdünnter Salzsäure, Natronlauge, Salzsäure und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wog 50 mg. Er wurde in Benzol-Pentan (1:4) gelöst und über eine mit Pentan bereitete Säule von 1,5 g Aluminiumoxyd (*Merck*, standardisiert nach *Brockmann*) filtriert. Durch Nachwaschen mit Benzol-Pentan wurden zunächst ölige Anteile eluiert. Mit absolutem Benzol und mit Benzol-Äther (9:1) wurden Eluate erhalten, die nach dem Eindampfen und Zusatz von wenig Methanol allmählich krystallisierten. Zur Reinigung wurde bei 0° zunächst auf Ton abgepresst, mit Methanol gewaschen und anschliessend dreimal aus Methanol umkrystallisiert. Es wurde knapp 1 mg farbloser Nadeln erhalten, die bei 176—178° korr. schmolzen. Zur Analyse reichte die Menge nicht aus, doch schmolz das aus (VII) über (VIII) bereitete Vergleichspräparat (siehe weiter unten) genau gleich, und die Mischprobe gab keine Schmelzpunktserniedrigung.

1,2-Cyclopentano-2,5-dimethyl-decalon-(6)-propionsäure-(5)-carbonsäure-methylester (3') (VIII).

700 mg 3-Keto-ätio-cholen-(4)-säure-methylester (VII)¹⁾ wurden in 45 cm³ reinem Chloroform bei 0° 15 Minuten ozonisiert. Anschliessend wurde wie bei (IV) verfahren. Es wurden ca. 500 mg sodalösliche Anteile erhalten, die teilweise krystallisierten. Die mit wenig Äther gewaschenen Krystalle wurden aus Benzol-Äther umkrystallisiert

¹⁾ *M. Steiger, T. Reichstein, Helv. 20, 1040 (1937).*

und lieferten 194 mg farblose Blättchen vom Smp. 159—161° korr. Die spezifische Drehung betrug $[\alpha]_D^{17} = +77,0^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 1,936$ in Aceton).

19,6 mg \pm 0,2 mg Subst. zu 1,0125 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{17} = +1,49^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 70° getrocknet.

5,355 mg Subst. gaben 13,45 mg CO₂ und 3,98 mg H₂O

C₂₀H₃₀O₅ (350,44) Ber. C 68,54 H 8,63%

Gef. „ 68,50 „ 8,32%

Die reichlichen gelbgefärbten Mutterlaugen der kristallisierten Säure enthalten offenbar noch α -Ketosäure, so dass evtl. auch hier eine Nachoxydation mit Wasserstoffperoxyd in Betracht käme, wie dies weiter unten beim Abbau des Progesterons beschrieben ist. Aus Zeitmangel musste von diesem Versuch abgesehen werden.

1,2-Cyclopentano-2,5-dimethyl-decalin-carbonsäure-(3')-propionsäure-(5) (V) aus (VIII).

100 mg Estersäure (VIII) wurden wie bei (IV) beschrieben, nach *Clemmensen* reduziert. Die erhaltene Dicarbonsäure kristallisierte in diesem Falle aus Aceton-Pentan sehr rasch. Die mit Äther-Pentan gewaschenen Krystalle wurden aus absolutem Benzol und dann aus wenig Eisessig umkrystallisiert und lieferten 20 mg farbloser Krystalle vom Smp. 263—266° korr. Die spezifische Drehung betrug $[\alpha]_D^{17} = +53,7^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 1,323$ in Aceton).

13,4 mg \pm 0,2 mg Subst. zu 1,0125 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{17} = +0,71^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$.

Zur Analyse wurde 1 Stunde bei 90° im Hochvakuum getrocknet.

3,165 mg Subst. gaben 8,21 mg CO₂ und 2,61 mg H₂O

C₁₉H₃₀O₄ (322,43) Ber. C 70,77 H 9,38%

Gef. „ 70,90 „ 9,24%

Dimethylester. Eine Probe der Säure wurde mit Diazomethan in den Dimethylester verwandelt. Er kristallisierte aus wässrigem Methanol in Nadeln vom Smp. 65—68°.

1,2-Cyclopentano-2,5-dimethyl-decalin-propionsäure-(5)-carbonsäure-(3')-dianilid (VI).

24 mg Dicarbonsäure (V) aus (VIII) wurden mit 0,3 cm³ Thionylchlorid 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in absolutem Äther gelöst und in die Lösung von 0,2 g Anilin in absolutem Äther eingetragen. Es fiel sofort etwas Anilin-hydrochlorid aus. Die Suspension wurde im Scheidetrichter mit wässriger Salzsäure, Natronlauge, Salzsäure und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Methanol gelöst und bei -15° kristallisieren gelassen. Nach 24 Stunden hatten sich leicht gelb gefärbte Drusen abgeschieden, die mit Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden. Sie schmolzen bei 173—177° und wogen 20 mg. Die Mutterlauge gab noch 5 mg etwas weniger reine Krystalle.

Sie wurden zusammen durch Chromatographierung über Aluminiumoxyd vorgereinigt. Dabei liessen sie sich mit absolutem Benzol und Benzol-Äther (9:1) von der Säule eluieren. Durch Umkrystallisieren der entsprechenden Fraktionen aus Methanol wurden farblose Nadeln erhalten. Sie wurden beim Erwärmen zuerst opak und schmolzen bei 177—179° korr. Die spezifische Drehung betrug: $[\alpha]_D^{17} = +82,8^{\circ} \pm 4^{\circ}$; $[\alpha]_{5461}^{17} = +110,4^{\circ} \pm 4^{\circ}$; ($c = 0,724$ in Aceton).

7,329 mg Subst. zu 1,0125 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{17} = +0,60^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$; $\alpha_{5461}^{17} = +0,80^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$

Zur Analyse wurde 1 Stunde im Hochvakuum bei 90° getrocknet.

4,861 mg Subst. gaben 14,055 mg CO₂ und 3,760 mg H₂O

C₃₁H₄₀O₂N₂ (472,65) Ber. C 78,72 H 8,53%

Gef. „ 78,90 „ 8,65%

1,2-[3'-Aceto-cyclopentano]-2,5-dimethyl-decalon-(6)-propionsäure-(5) (X).

1 g Progesteron (IX) wurde in 60 cm³ Chloroform 20 Minuten bei 0° ozonisiert. Die Aufarbeitung geschah wie oben beschrieben und gab 650 mg sodalösliche Anteile. Durch Umkrystallisieren aus Äther-Pentan wurden daraus 100 mg Krystalle vom Smp. 170—175° erhalten. Die gelben Mutterlaugen wurden im Vakuum eingedampft, der Rückstand (550 mg) in 5 cm³ 2-n. Sodalösung gelöst, mit 2 cm³ 12-proz. Wasserstoffperoxydlösung versetzt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die anfangs gelbe Lösung entfärbte sich schon nach kurzer Zeit. Dann wurde mit verdünnter Schwefelsäure bis zur rein blauen Reaktion auf Kongo versetzt und mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung gab auf Kaliumjodid-Stärke-Papier keine Blaufärbung: Sie wurde daher nur mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, stark eingeengt und die eintretende Krystallisation durch Pentanzusatz möglichst vervollständigt. Es wurden noch 200 mg farblose Krystalle vom Smp. 170—175° erhalten. Sie wurden zusammen mit den direkt erhaltenen 100 mg zuerst aus Aceton-Äther, dann nochmals aus Eisessig mit etwas Wasser umkrystallisiert. Danach schmolzen sie bei 173—175° korr. Die spezifische Drehung betrug $[\alpha]_D^{17} = +108^{\circ} \pm 3^{\circ}$ ($c = 2,518$ in Aceton).

25,5 mg \pm 0,2 mg Subst. zu 1,0125 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{17} = +2,72^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 90° getrocknet.

1,66 mg Subst. gaben 4,37 mg CO₂ und 1,34 mg H₂O

C₂₀H₃₀O₄ (334,44) Ber. C 71,82 H 9,04%

Gef. „ 71,84 „ 9,03%

Der mit Diazomethan bereitete Methylester krystallisierte nicht.

1,2-[3'-Äthyl-cyclopentano]-2,5-dimethyl-decalin-propionsäure-(5) (XI).

250 mg Diketosäure (X) wurden in Chlorwasserstoff-Atmosphäre mit 24 mg amalgamierter Zinkwolle, 20 cm³ Eisessig und 28 cm³ konz. Salzsäure auf dem siedenden Wasserbad unter Rückfluss erwärmt. Nach 3 Stunden wurden noch 20 g amalgamierte gröbere Zinkspäne eingetragen und die Mischung weitere 6 Stunden erhitzt. Die Aufarbeitung wurde wie bei (V) durchgeführt und ergab 165 mg rohes Reduktionsprodukt. Dieses wurde in Pentan gelöst und bei -15° stehen gelassen. Es schieden sich etwas Krystalle ab, die nach dem Waschen mit gekühltem Pentan bei 126—134° schmolzen. Es wurden nur einige Impfkristalle behalten. Die Hauptmenge wurde mit der Mutterlauge vereinigt, in Äther gelöst und mit 3 cm³ 2-n. wässriger Natronlauge kräftig durchgeschüttelt. Dabei schied sich ein schwerlösliches Natriumsalz ab. Die fast klare wässrige Lösung wurde abgelassen, der Äther abdekantiert und das Natriumsalz noch zweimal mit Äther gewaschen. Dann wurde es durch Schütteln mit verdünnter Salzsäure und Äther zerlegt, die Ätherlösung mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wog 107 mg, krystallisierte bald und schmolz roh bei 70—120°. Aus wässrigem Methanol wurden 23 mg Nadelbüschel erhalten, die mit auf -80° vorgekühltem Methanol gewaschen wurden. Sie schmolzen bei 124—130° und wandelten sich dabei in lange Spiesse um, die dann bei 141—145° wieder schmolzen. Die Mutterlauge gab noch 20 mg etwas weniger reiner Krystalle. Beide Krystallisate wurden zusammen aus wenig Aceton bei -80° umkrystallisiert und mit Aceton von derselben Temperatur gewaschen. Es wurden wiederum Nadeln erhalten, die bei 126° zu schmelzen begannen und kurz darauf unter Bildung von Spiessen wieder erstarrten, die bei 141—145° korr. neuerdings schmolzen. Die spezifische Drehung betrug $[\alpha]_D^{15} = +8,6^{\circ} \pm 1,5^{\circ}$ (c = 1,511 in Chloroform).

15,3 mg Subst. zu 1,0125 cm³; l = 1 dm; $\alpha_D^{15} = +0,13^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$.

Zur Analyse wurde 1 Stunde im Hochvakuum bei 60° getrocknet.

2,35 mg Subst. gaben 6,73 mg CO₂ und 2,21 H₂O

C ₂₀ H ₃₄ O ₂ (306,47)	Ber. C 78,38	H 11,18%
	Gef. „ 78,15	„ 10,52%

Die Säure gab bei der Probe mit Tetranitro-methan in wenig Chloroform keine Gelbfärbung. Das Anilid der Säure krystallisierte nicht.

Die Mikroanalysen wurden von Hrn. Dr. A. Schoeller, Berlin, ausgeführt.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.