

experimentally to be proportional to $c^{1,24}$ in the case of a shielded electrode and $c^{1,20}$ in the case of a not shielded electrode (c = concentration). This agrees well with the theoretical relationship between limiting current density and concentration under conditions of natural convection. The current density of powder formation was also compared with the absolute value of the limiting current density as calculated from the viscosity, the concentration, the proportionality factor between concentration and density, the diffusion coefficient and the transference number. Both values agreed reasonably well.

The influence of the height was studied with a composite electrode. When the current density was successively increased to the value at which the deposit becomes powdery, the Cu powder was always formed first in the upper parts of the electrode. This may be explained by a hydrodynamic effect, the concentration at the interface being smaller in the upper parts of the electrode because of the upward convective flow.

On the whole the boundary layer theory of natural convection was found to fit the experimental data well within the concentration range from 0,01 M to 1 M. The height of the electrodes used was 0,4 cm and 3 cm.

The possibility of application to technical problems is briefly discussed. The powder formation in the case of other metals than Cu is also considered.

Laboratorium für physikalische Chemie und Elektrochemie
der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

138. Aldosteron. Isolierung und Eigenschaften. Über Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandte Stoffe.

91. Mitteilung¹⁾²⁾

von S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw,
O. Schindler und T. Reichstein.

(26. IV. 54.)

Über die Isolierung^{a)} und Konstitutionsermittlung^{b)} eines neuen krist. Corticoids mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel ist in zwei vorläufigen Mitteilungen kurz berichtet worden (frühere Literatur siehe daselbst). Das Hormon wurde zuerst provisorisch als Elektrocortin bezeichnet^{c)}, nach Aufklärung der

¹⁾ 88. Mitteilung: A. Lardon & T. Reichstein, *Helv.* **37**, 443 (1954), die zwei folgenden entspr. ^{a)} und ^{b)}.

²⁾ Die mit Buchstaben bezeichneten Fussnoten siehe bei den Formeln.

Konstitution ist als definitiver Name die Bezeichnung Aldosteron vorgeschlagen worden, die den international gebräuchlichen Nomenklaturregeln besser entspricht. Derselbe Stoff ist inzwischen auch von *Mattox* und Mitarbeitern^{c)} in Kristallen erhalten worden. Hier werden die Einzelheiten über die Bestimmung, die Isolierung und die wichtigsten Eigenschaften des Aldosterons bekanntgegeben. Die Belege für den Konstitutionsbeweis entspr. Formel (I) finden sich in der nächsten Mitteilung.

Bestimmung des Aldosterons: Die Bestimmung des Aldosterons in Nebennierenextrakten sowie im Blut geschah auf halbquantitativem Wege durch Papierchromatographie wie folgt: Die Nebennieren resp. die Blutproben wurden wie im exp. Teil beschrieben extrahiert und die Extrakte durch Verteilung zwischen wässrigem Alkohol und Petroläther etc. gereinigt. Falls nötig erfolgte eine weitere Anreicherung durch grobe Adsorptionschromatographie an Silicagel. Das so gereinigte Material wurde auf 1–2 Bogen Filterpapier zunächst im C-System von *Bush*¹⁾ (Toluol-Essigester-Methanol-Wasser) chromatographiert, wobei Aldosteron fast dieselbe Laufstrecke zeigt wie 17-Oxycorticosteron (XIII) und einige andere in geringer Menge vorhandene Corticoide, z. B. 3 β ,17,21-Trioxy-allopregnandion-(11,20) („Subst. D“)²⁾, während Cortison (XII) merklich schneller wandert und sich sauber abtrennen lässt. Zur genauen Lokalisierung der Banden wurden die UV.-absorbierenden Zonen durch direkte Photokopie³⁾ ermittelt. Zu diesem Zweck wurde das vorsichtig getrocknete Filterpapier im Dunkeln auf ein lichtempfindliches Papier gelegt. Um die Hauptmenge der Substanz vor der zerstörenden Wirkung des UV.-Lichtes zu schützen, wurde eine Schablone mit 3 schmalen Schlitzten (in Laufrichtung des Chromatogrammes) aufgelegt und kurz mit kurzwelligem UV.-Licht (vorwiegend 254-m μ -Region) belichtet. Die entwickelte Photokopie zeigte dann an den im UV. absorbierenden Stellen weisse Flecke auf schwarzem Grund (vgl. Fig. 1). Die dem 17-Oxycorticosteron (XIII) entsprechende Bande (gestrichelt in Fig. 1) wurde auf dem Filterpapier hierauf sauber ausgeschnitten und mit 20-proz. Methanol eluiert. Dieses Material wurde nun auf Filterpapierstreifen im System Propylenglykol-Toluol⁴⁾⁵⁾ erneut 24 Std.⁶⁾ chromatographiert, wobei man zum Vergleich Cortison (XII) in ver-

¹⁾ *I. E. Bush*, *Biochem. J.* **50**, 370 (1952).

²⁾ Ausser „Subst. D“ kann diese Bande bei hohem 17-Oxycorticosterongehalt auch noch die folgenden Stoffe enthalten: 3 β ,11 β ,17,21-Tetraoxy-allopregnan-on-(20) („Subst. V“), 3 β ,17,20 β ,21-Tetraoxy-allopregnan („Subst. K“) und 17,20 β ,21-Trioxy-pregnen-(4)-dion-(3,20) („Subst. U“). Von diesen zeigen die drei erstgenannten keine UV.-Absorption, „Subst. K“ und „Subst. U“ kein Reduktionsvermögen.

³⁾ Zur Methodik vgl. *W. J. Haines & N. A. Drake*, *Fed. Proc.* **9**, 180 (1950).

⁴⁾ *A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann*, *Science* **111**, 6 (1950).

⁵⁾ *R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann*, *J. Biol. Chem.* **188**, 763 (1951).

⁶⁾ *R. Neher & A. Wettstein*, *Helv.* **34**, 2278 (1951).

schiedenen Mengen parallel chromatographierte. In diesem System wandert Aldosteron fast gleich (ein wenig schneller) als Cortison, wird aber gut von 17-Oxycorticosteron und den Substanzen U, V, K und D getrennt, die alle merklich langsamer wandern. – Zum Nachweis diente: a) Die UV.-Absorption (Photokopie ohne Schablone),

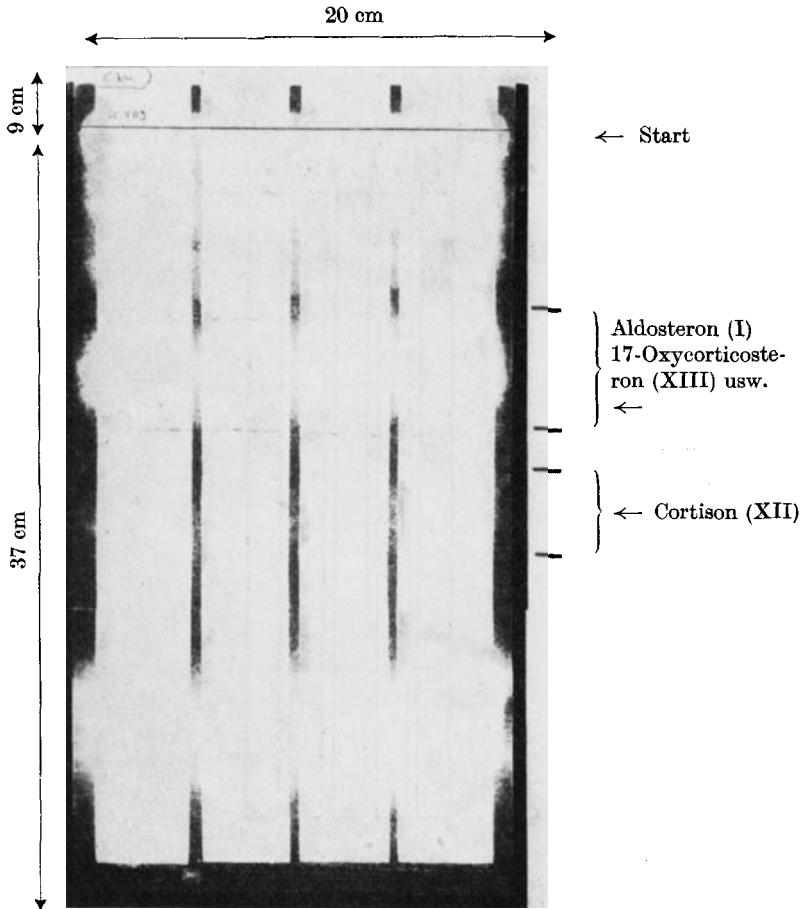


Fig. 1.

Erstes Chromatogramm (Blatt), UV.-Photokopie durch Schablone mit 3 Schlitzen. Aufgetragen 20 mg gereinigter Extrakt aus 165 g Schweine-Nebennieren. System C von *Bush*, 2½ Std., 22°. Eluat der Bande mit I + XIII: 2,4 mg.

b) Die Bestimmung des Reduktionsvermögens mit „Blautetrazolium“⁽¹⁾²⁾ (vgl. Fig. 2), sowie c) Die gelbe Fluoreszenz³⁾ nach Er-

¹⁾ *R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann*, J. Biol. Chem. **188**, 763 (1951).

²⁾ 3,3-Dianisol-bis-4,4'-(3,5-diphenyl)-tetrazolium-chlorid, *W. J. Mader & R. R. Buck*, Anal. Chem. **24**, 666 (1952); *A. Zaffaroni*, Recent Progress in Hormone Research **8**, 77 (Academic Press Inc., New York 1953).

³⁾ *I. E. Bush*, Biochem. J. **50**, 370 (1952).

hitzen der mit Alkali behandelten Streifen. Die Intensität der Flecken wurde mit derjenigen der Cortisonflecken von bekanntem Gehalt verglichen und erlaubte eine gute Schätzung, mit einer Fehlergrenze von $\pm 20\%$ (bei mehr als 5γ) und ca. $\pm 40\%$ bei $1-5 \gamma$ Aldosteron.

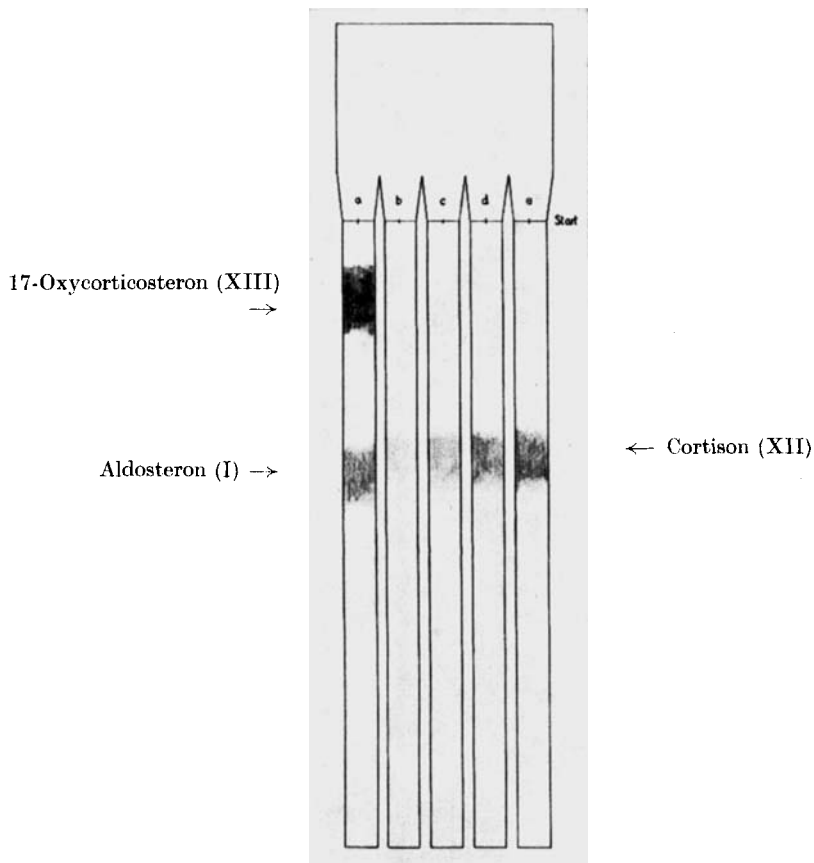


Fig. 2.

Zweites Chromatogramm, schematisiert. System: Propylenglykol/Toluol, 24 Std., 22° . Indikator: Blautetrazolium. a = 0,5 mg Eluat der Bande mit I + XIII aus erstem Chromatogramm (Fig. 1); b = 5γ Cortison; c = 10γ Cortison; d = 15γ Cortison; e = 20γ Cortison.

Elution des chromatographierten Materials und spektrographische Bestimmung gab bei Mengen von $2-15 \gamma$ pro Fleck keine grössere Genauigkeit. Falls genügend Material vorhanden ist, kann zur Identifizierung auch noch zusätzlich das Absorptionsspektrum in konz. H_2SO_4 herangezogen werden¹⁾. Fig. 3 zeigt das Absorptionsspektrum von Aldosteron (50γ pro 4 cm^3) in konz. H_2SO_4 nach 2 Std. (war nach

¹⁾ Methodik vgl. A. Zaffaroni, Am. Soc. **72**, 3828 (1950); S. Bernstein & R. H. Lenhard, J. Organ. Chem. **18**, 1146 (1953).

3 Std. gleich) und Fig. 4 dieselbe Lösung nach zusätzlichem einstündigen Erhitzen auf 90°. Mit dieser Methode ergaben sich u. a. die in Tab. 1 wiedergegebenen Resultate:

Tabelle 1.
Gehalt an Aldosteron in Nebennieren¹⁾ und Rinderblut.

Material	Aldosteron in γ pro kg Nummern der Proben			
	a	b	c	d
Rinder-Nebennieren, frische	84	22	38	
Schweine-Nebennieren, 3–4 Tage bei 0° aufbewahrt	50	480	765	590
Rinderblut	ca. 5	ca. 2		

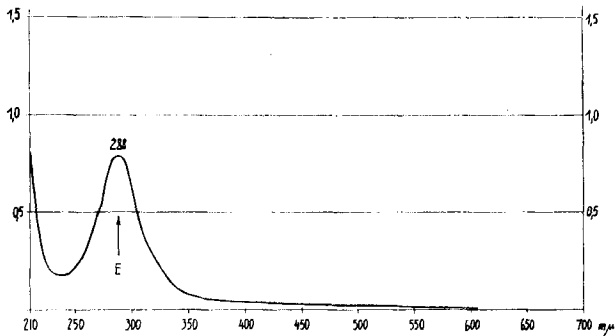


Fig. 3.

Absorptionsspektrum von 50 γ Aldosteron in 4 cm³ konz. H₂SO₄, nach 2 Std. bei 20°.

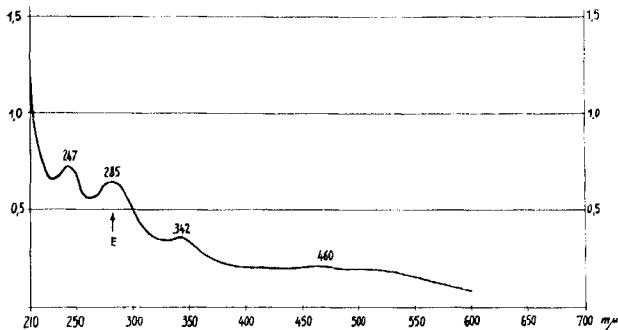


Fig. 4.

Absorptionsspektrum von 50 γ Aldosteron in 4 cm³ konz. H₂SO₄, nach zusätzlich 1 Std. bei 90°.

¹⁾ Es wurden drei verschiedene Proben schlachtfrischer Rinder-Nebennieren sowie vier verschiedene Proben von Schweine-Nebennieren analysiert, die sofort nach der Schlachtung entnommen und anschliessend in *Dewar*-Gefässen mit Eis verpackt 3–4 Tage aufbewahrt wurden. Vgl. *A. Wettstein, F. W. Kahnt & R. Neher, Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology* 8 (1954) im Druck.

Präparative Isolierung: Obwohl der Gehalt in frischen Schweine-Nebennieren erheblich höher ist¹⁾ mussten für die präparative Isolierung aus technischen Gründen²⁾ in erster Linie gefrorene Rinder-Nebennieren verwendet werden. Sie wurden nach dem Verfahren von *Carl land & Kuizenga*³⁾ extrahiert⁴⁾, wobei die Originalvorschrift aber nur bis zum Ausschütteln mit 1,2-Dichloräthan verfolgt wurde. Für zwei Hauptversuche wurden zwei solche Extrakte aus je 500 kg Drüsen verwendet, die uns eigens für diesen Zweck von der *N. V. Organon* hergestellt wurden⁵⁾. Der erste dieser Rohextrakte (NN III) wog 167 g, der zweite (NN V) sogar 1592 g, das ist erheblich mehr, als die Originalvorschrift von *Carl land & Kuizenga* erwarten lässt⁶⁾. Durch die im exp. Teil beschriebene weitere Reinigung, die sich eng an eine frühere Vorschrift⁷⁾ anlehnt, liess sich aber leicht eine weitgehende Anreicherung erzielen. Zum Schluss konnte noch eine merkliche Menge relativ flüchtiger Verunreinigungen⁸⁾ durch Destillation im Vakuum bei 0,01 Torr und 50° entfernt werden. Aus den zwei Extrakten wurden so 27 g bzw. 26,5 g Konzentrat erhalten.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass zur Anreicherung von Aldosteron das Reagens T von *Girard & Sandulesco*⁹⁾ verwendet werden kann¹⁰⁾, doch wurde auf diese Reinigungsmöglichkeit in den zwei Hauptversuchen verzichtet. Die oben genannten Konzentrate wurden daher direkt einer Verteilungschromatographie in der kürzlich beschriebenen Ausführungsform¹¹⁾ unterworfen. Dabei diente Wasser auf gereinigtem Kieselgur als ruhende und Petroläther-Benzol, dann Benzol, als bewegliche Phase. Dieses System lieferte bei sauberen Lösungsmitteln prak-

1) Vgl. auch ähnliche Befunde bei biologischer Prüfung von Rohextrakten im Überlebensstest an Ratten durch *G. F. Carl land & M. H. Kuizenga*, *Am. J. Physiol.* **117**, 678 (1936), sowie ³⁾.

2) In Europa sind grössere Mengen frischer Schweine-Nebennieren kaum erhältlich.

3) *G. F. Carl land & M. H. Kuizenga*, *J. Biol. Chem.* **116**, 57 (1936).

4) Das Verfahren von *W. W. Swingle & J. J. Piffner*, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **28**, 510 (1931); *Am. J. Physiol.* **98**, 144 (1931); *Medicine* **11**, 371 (1932); *Proc. exper. Biol. Med.* **29**, 998, 1267 (1932), scheint für die Gewinnung von Aldosteron weniger günstig zu sein, obwohl eine genaue quantitative Kontrolle nicht angestellt wurde. Die in einem Versuch erhaltene viel schlechtere Ausbeute kann aber daran liegen, dass Aldosteron gegen sauren Alkohol besonders empfindlich ist.

5) Wir möchten auch hier der Direktion der *N. V. Organon*, Oss, Holland, für dieses Material unseren besten Dank aussprechen.

6) Die Gewichte der Rohextrakte schwanken sehr stark, je nach Qualität des Drüsenmaterials.

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

8) Bei NN V wurden daraus 23 g reiner Diacetonalkohol (= 4-Methyl-4-oxy-2-pentanon) erhalten, der durch Kondensation des zur Extraktion verwendeten Acetons entstanden sein dürfte.

9) *A. Girard & G. Sandulesco*, *Helv.* **19**, 1095 (1936).

10) Es ist dabei vorteilhaft, unter etwas anderen Bedingungen zu arbeiten, als sie früher (*Helv.* **19**, 1095 (1936)) bei der Isolierung von Corticosteron usw. benützt wurden.

11) *H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein*, *Helv.* **36**, 357 (1953).

tisch keine Blindwerte. Die Trennung jedes Konzentrats benötigte ca. 70 Tage, lieferte aber ausgezeichnete Resultate. Die Kontrolle geschah durch Papierchromatographie. Viele Fraktionen kristallisierten spontan, und eine Reihe der bereits bekannten Corticoide wurden direkt rein in Kristallen erhalten. Auch einige wahrscheinlich neue Stoffe konnten teilweise in Kristallen erhalten, teils durch Papierchromatographie charakterisiert werden¹). Aldosteron wurde in dieser Säule kurz nach Cortison und unmittelbar vor 17-Oxycorticosteron eluiert. Diese Fraktionen gaben spontan höchstens Spuren von Kristallen. Obwohl sich nach Impfen teilweise bereits in dieser Stufe etwas Aldosteron erhalten liess, erwies es sich als zweckmässiger, hier auf eine Kristallisation zu verzichten. Die genannten Fraktionen wurden daher vereinigt und nach Vorreinigung (Fällung von wenig dunklen Verunreinigungen aus wenig Aceton mit viel Äther) einer zweiten Verteilungschromatographie unterzogen. Für das Material aus NN III (324 mg) diente dazu eine kleine Säule aus gereinigter Cellulose und das B2-System von *Bush*²), wobei gegen den Schluss zur Beschleunigung der Eluierung das Verhältnis Toluol-Petroläther von 2:1 auf 3:1 erhöht wurde. Trotz sehr gründlicher Reinigung der Cellulose sowie der verwendeten Lösungsmittel gelang es bei diesem System nicht, die Blindwerte ganz auszuschalten³), unter den nötigen Vorsichtsmassregeln erwies es sich aber als brauchbar. Für NN V (675 mg) wurde daher ein modifiziertes System (Benzol-Petroläther-Methanol-Wasser 1:1:1:1) verwendet, wobei das Mischungsverhältnis nach einiger Zeit auf 1,2:0,8:1:1 und gegen den Schluss auf 2:0:1:1 umgestellt wurde. Dieses System gab eine fast gleich gute Trennung, lieferte aber praktisch gar keinen Blindwert und daher zuverlässigere Resultate.

Beide Chromatogramme gaben zunächst amorphes Material, teilweise auch Kristalle von wahrscheinlich neuen Stoffen, die noch nicht weiter untersucht wurden. Die mittleren Fraktionen gaben am besten aus wenig feuchtem Aceton mit Äther bei 0° entweder spontan, sonst nach Impfen krist. Aldosteron-hydrat, das bereits fast analysenrein war. Aus den letzten Fraktionen konnten wieder andere Stoffe teilweise in Kristallen erhalten werden. Die Ausbeuten an krist. Aldosteron-hydrat betragen 22 mg (aus NN III)⁴) bzw. 35 mg (aus NN V)⁴). In ähnlicher Weise wurden aus 22,8 kg 1–3 Tage bei 0° gelagerten Schweine-Nebennieren 5,8 mg krist. Aldosteron isoliert.

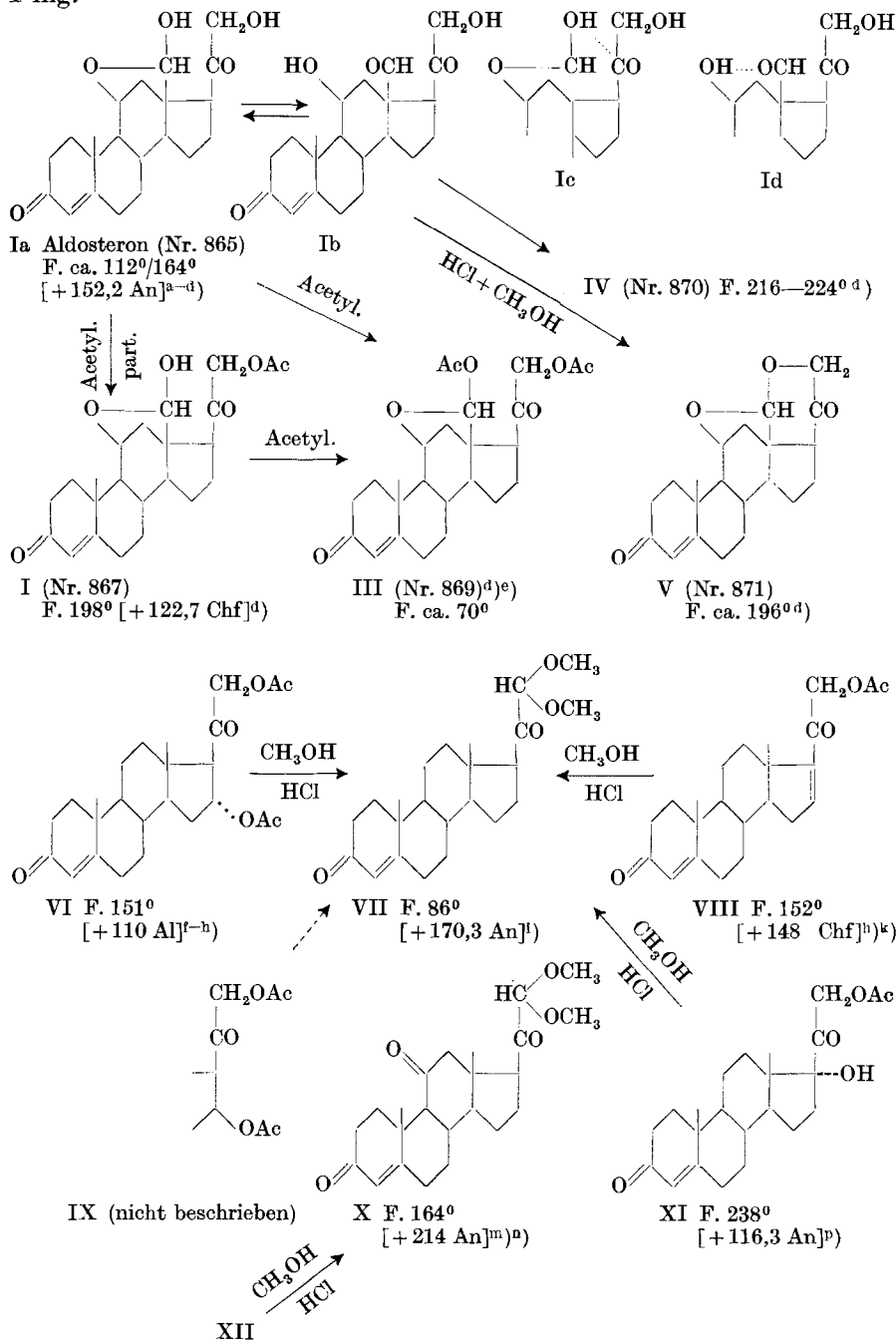
1) Über Versuche zu deren Isolierung wird später berichtet.

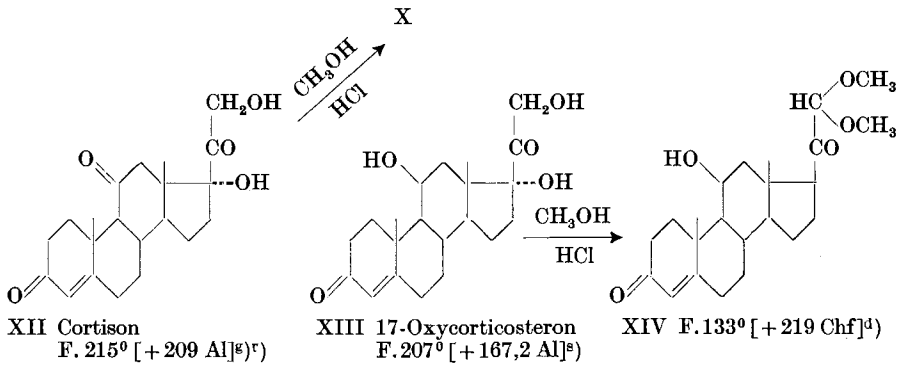
2) *I. E. Bush*, *Biochem. J.* **50**, 370 (1952). 666 cm³ Toluol (frisch gereinigt), 333 cm³ Petroläther (frisch gereinigt), 400 cm³ Wasser und 600 cm³ Methanol geschüttelt und abtrennen lassen. Die schwere Schicht diente als stationäre Phase zum Imprägnieren der Cellulose, die leichte Schicht diente als bewegliche Phase.

3) Autoxydation des Toluols dürfte die Hauptursache sein.

4) Bei NN III wurden diejenigen Fraktionen der ersten Verteilungschromatographie, die nur sehr wenig Aldosteron enthielten, nicht für die zweite Verteilung benützt, während bei NN V auch solche Randfraktionen mitverwendet wurden.

Die Mutterlaugen enthielten nach Papierchromatographie noch ca. 1 mg.





Ac = CH₃CO—. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die spez. Drehung für Na-Licht in folgenden Lösungsmitteln an: An = Aceton, Al = Äthanol, Chf = Chloroform.

Eigenschaften und Absorptionsspektren: Aldosteron kristallisierte aus feuchtem¹⁾ Aceton-Äther als Hydrat. Besonders schöne Kristalle (vgl. Photo^{a)}) wurden aus Aceton-Wasser erhalten. Der Smp. war je nach Kristallgrösse und Erhitzungsart, aber auch von Präparat zu Präparat, etwas verschieden. Meistens zeigten die Kristalle einen Doppel-Smp. Sie schmolzen zunächst bei ca. 108–112°, die Schmelze erstarrte bei langsamem Erhitzen dann langsam wieder vollständig, und das Präparat schmolz definitiv bei ca. 155–160°. Es wurden aber

^{a)} S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw & T. Reichstein, *Exper.* **9**, 333 (1953).

^{b)} S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler & T. Reichstein, *Exper.* **10**, 132 (1954).

^{c)} V. R. Mattox, H. L. Mason & A. Albert, *Proc. Staff Meet. Mayo Clinic* **28**, 569 (1953); V. R. Mattox, H. L. Mason, A. Albert & C. F. Code, *Am. Soc.* **75**, 4869 (1953).

^{d)} *Exper.* Teil dieser Arbeit.

^{e)} S. A. Simpson & J. F. Tait, *Memoirs of the Soc. for Endocrinol.*, Memoir No. 2, 9 (1953).

^{f)} H. Hirschmann, F. B. Hirschmann & G. L. Farrel, *Am. Soc.* **75**, 4862 (1953).

^{g)} E. Vischer, J. Schmidlin & A. Wettstein, *Helv.* **37**, 321 (1954).

^{h)} W. Cole & P. H. Julian, *J. Organ. Chem.* **19**, 131 (1954).

ⁱ⁾ H. Reich & T. Reichstein, *Helv.* **22**, 1124 (1939).

^{k)} G. Ehrhart, H. Ruschig & W. Haede, D.B.P. 897704; Priorität Deutschland vom 27. Juli 1951. Anmeldung bekannt gemacht am 2. April 1953.

^{m)} V. R. Mattox & E. C. Kendall, *J. Biol. Chem.* **188**, 287 (1951).

ⁿ⁾ V. R. Mattox, *Am. Soc.* **74**, 4340 (1952).

^{p)} T. Reichstein & J. v. Euw, *Helv.* **21**, 1197 (1938); **23**, 1258 (1940); T. Reichstein, *Helv.* **21**, 1490 (1938).

^{q)} O. Wintersteiner & J. J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.* **111**, 599 (1935); **114**, lxxx (1936); **116**, 291 (1936).

^{r)} E. C. Kendall, H. L. Mason, C. S. Myers & W. D. Allers, *J. Biol. Chem.* **114**, lvii (1936); H. L. Mason, C. S. Myers & E. C. Kendall, *J. Biol. Chem.* **114**, 613 (1936); **116**, 267 (1936); **119**, lvi (1937).

^{s)} T. Reichstein, *Helv.* **20**, 953 (1937).

¹⁾ Ebenso aus trockenem Aceton-Äther an gewöhnlicher (feuchter) Luft bei 0°.

auch Kristalle erhalten, die zwischen ca. 115–135° nur opak wurden und erst bei 164–170° schmolzen. Im Papierchromatogramm erwiesen sich alle diese Kristalle als völlig einheitlich und identisch, sie waren auch identisch mit den von *Mattox* u. Mitarb.^{c)} inzwischen beschriebenen Kristallen¹⁾. Sie waren frei von Halogen, S und N. Lufttrockenes Aldosteron gab bei der Trocknung (konstant nach 8 Std. bei 0,01 Torr und 50°) einen Gewichtsverlust, der einem Mol Kristallwasser entspricht. Die Analysenwerte des so getrockneten Materials passten auf die Formel $C_{21}H_{30}O_5 \pm H_2$, wobei sich durch Abbau^{b)2)} die Konstitution I und somit die Bruttoformel $C_{21}H_{28}O_5$ ableiten liess. Der Stoff ist demnach isomer mit Cortison. Das UV.-Absorptionsspektrum des Aldosterons in Alkohol ist bereits früher^{a)} publiziert worden. Die Höhe des starken Maximums (bei $240,0 \pm 0,25 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,20$ ber. auf $C_{21}H_{28}O_5, H_2O$) stimmt mit dem für ein Δ^4 -3-Ketosteroid erwarteten Wert ausgezeichnet überein. Nach *Antonucci* u. Mitarb.³⁾ zeigen Δ^4 -3-Ketosteroide mit zusätzlicher Ketogruppe in 11-Stellung ein Maximum bei ca. 238 $\text{m}\mu$ und Δ^4 -3-Keto-11 β -oxy-steroid ein solches bei ca. 242 $\text{m}\mu$ ⁴⁾. Das Maximum des Aldosterons liegt also gerade dazwischen; möglicherweise kommt dies daher, dass Aldosteron in Lösung vorwiegend als Cyclohalb-acetalform Ia vorliegen dürfte, die keine freie 11 β -Oxygruppe besitzt. Andererseits zeigt Aldosteron im UV. auch noch eine deutlich ausgeprägte Vorbande mit einem Maximum bei $308,0 \pm 2 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 1,92$), während Cortexon⁵⁾, Cortison (XII)⁵⁾ und 17-Oxycorticosteron (XIII)^{a)5)} bei ca. 300 $\text{m}\mu$ nur eine starke Inflexion aufweisen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass in Lösung eine gewisse Menge des Aldosterons in der Aldehydform Ib vorliegt und dass dieser Teil zur Ausbildung der genannten Vorbande beiträgt⁶⁾. Weitere Schlussfol-

¹⁾ Wir danken Herrn Dr. *H. L. Mason* auch hier für die Ausführung des direkten Vergleichs. Die Laufstrecken im Papierchromatogramm (Propylenglykol-Toluol- sowie Formamid-Benzol-System) waren gleich. Dasselbe traf zu für die Diacetate und 21-Monoacetate (im Formamid-Benzol-Cyclohexan-(1:1)-System). Auch die biologische Wirksamkeit war innerhalb der Fehlergrenze dieselbe.

²⁾ Vgl. folgende Mitteilung.

³⁾ *R. Antonucci, S. Bernstein, M. Heller, R. H. Lenhard, R. Littell & J. H. Williams*, *J. Org. Chem.* **18**, 70 (1953), sowie *S. Bernstein, R. H. Lenhard & J. H. Williams*, *J. Org. Chem.* **18**, 1166 (1953).

⁴⁾ Wir fanden im *Unicam-Quartz-Spectrophotometer* SP 500 in Alkohol für 17-Oxycorticosteron (XIII) das Maximum bei $242,5 \pm 0,25 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,20^a)$, für Cortison (XII) bei $238,5 \pm 0,25 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,20$ und bei Acetyl-cortexon bei $241,0 \pm 0,25 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,23$.

⁵⁾ Der Kurvenverlauf ist in diesem Gebiet bei allen drei Stoffen fast gleich, bei Cortison liegt die Inflexion nur ganz wenig höher.

⁶⁾ Die Aldehydgruppe im Cymarin zeigt ein Maximum bei 308 $\text{m}\mu$, $\log \epsilon = \text{ca. } 1,45$, *W. D. Paist, E. R. Blout, F. C. Uhle & R. C. Elderfield*, *J. Org. Chem.* **6**, 280 (1941); *J. Fried, R. G. Linville & R. C. Elderfield*, *J. Org. Chem.* **7**, 365 (1942). Im Corotoxigenin und seinen Derivaten wurde ein Maximum bei $310 \pm 2 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = \text{ca. } 1,5$ gefunden, *O. Schindler & T. Reichstein*, *Helv.* **35**, 730 (1952); *A. Hunger & T. Reichstein*, *Helv.* **35**, 1073 (1952).

gerungen über die in Lösung bevorzugte Form lassen sich aus den IR.-Spektren¹⁾ (vgl. Fig. 5 sowie e)) ziehen. Das in Chloroform aufgenommene Absorptionsspektrum zeigt nach Angaben von Herrn Dr. E. Ganz folgende wichtige Befunde:

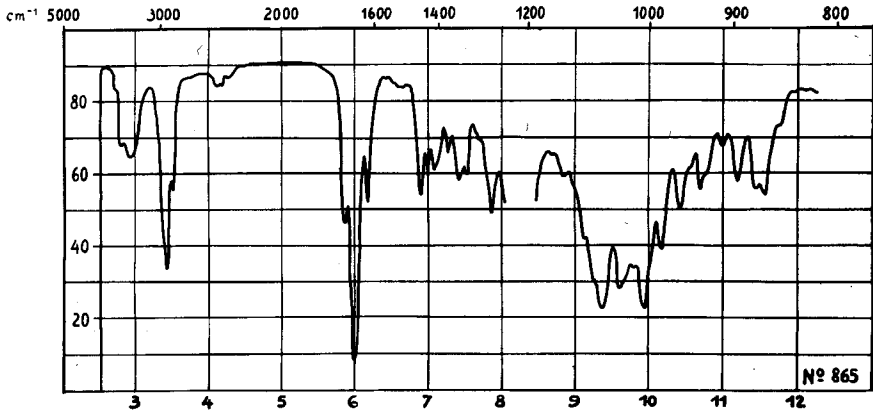
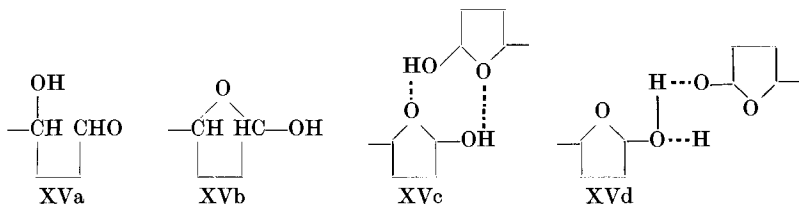


Fig. 5.

IR.-Spektrum von Aldosteron (Nr. 865) in Chloroform, kompensiert mit reinem Lösungsmittel, 0,10-molar. Schichtdicke 0,216 mm²⁾.

1. Eine relativ scharfe Bande bei 2,77 μ (entspr. einer freien HO-Gruppe). Cortexon, Corticosteron und 17-Oxycorticosteron zeigen eine solche bei 2,85 μ .

2. Eine breite Bande bei 2,85–3,05 μ , die auf HO-Gruppen mit H-Bindung³⁾ deutet. Eine solche Bande fehlt bei Cortexon, Corticosteron und 17-Oxycorticosteron, ist aber beim γ -Oxyvaleraldehyd (XV) in konzentrierter CHCl_3 -Lösung (vgl. Fig. 6c) sehr ausgeprägt.



¹⁾ Wir danken den Herren Dr. E. Ganz (Basel) und Dr. A. E. Kellie (London) auch hier bestens für die Ausführung und Interpretationen der IR.-Spektren, sowie Fr. R. Schenker für technische Hilfe.

²⁾ Die Spektren von Fig. 5–9 wurden aufgenommen mit einem Perkin-Elmer-Spectrophotometer, Modell 21, mit NaCl-Prisma; Auflösungsgrad (resolution) 4, Ansprechgeschwindigkeit (response) 1/1, Registriergeschwindigkeit (speed) 2 min/ μ , Dämpfung (suppression) 1.

³⁾ K. Dobriner, E. R. Katzenellenbogen & R. N. Jones, Infrared Absorption Spectra of Steroids, p. XV, New York 1953.

Bei höherer Verdünnung (Fig. 6d) wird sie schwächer, bei noch stärkerer Verdünnung verschwindet sie ganz und es bleibt nur die Bande des freien Hydroxyls bei $2,76 \mu$ übrig. Im IR.-Spektrum des γ -Oxy-valeraldehyds ist im Bereich von $5,78-5,80 \mu$ keine Bande erheblicher Intensität zu beobachten. Bei diesem Stoff dürfte daher in sehr verdünnter Lösung die monomolekulare Cyclohalbacetalform XVb vorherrschen, während bei zunehmender Konzentration in steigendem Masse Assoziation durch H-Brücken (z. B. wie in XVc oder XVd) eintritt. Auch beim Aldosteron ist die Intensität der Bande bei $2,85-3,05 \mu$ von der Konzentration abhängig (vgl. Fig. 6a und 6b), aber weniger stark als bei XV. Dies spricht dafür, dass im Aldosteron ausser intermolekularen auch intramolekulare H-Brücken vorliegen, beispielsweise wie in den Teilformeln Ie und Id.

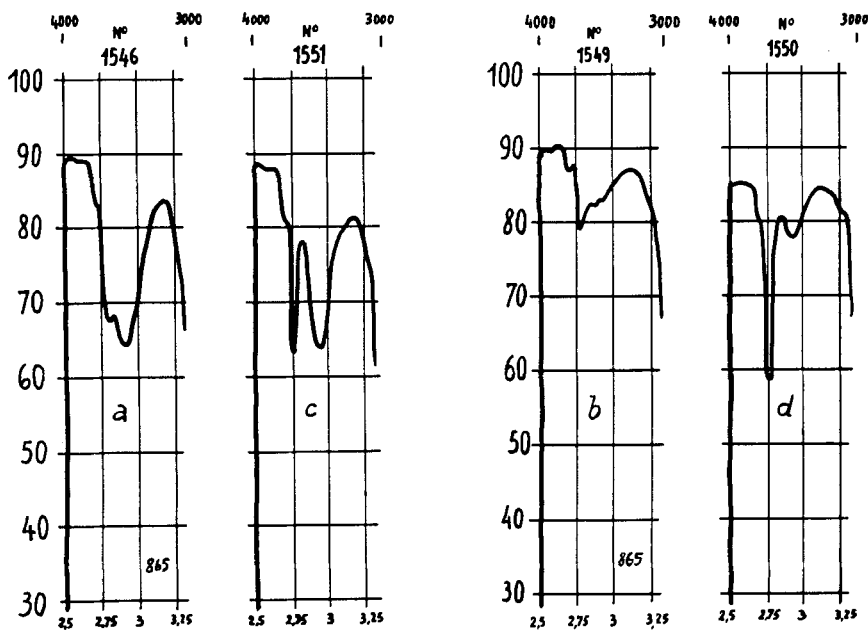


Fig. 6.

IR.-Spektrum in Chloroform, kompensiert mit reinem Lösungsmittel. a = Aldosteron (Nr. 865), 0,10-molar, Schichtdicke 0,216 mm; b = Aldosteron (Nr. 865), 0,047-molar, Schichtdicke 0,216 mm; c = γ -Oxy-valeraldehyd (XV), 0,23-molar, Schichtdicke 0,216 mm; d = γ -Oxy-valeraldehyd (XV), 0,046-molar, Schichtdicke 1,0 mm.

3. Die der Δ^4 -3-Ketogruppe entsprechende starke Bande bei $5,98 \mu$ zeigt Andeutungen einer Doppelstruktur. Diejenige bei $5,86 \mu$ (entspr. unkonjugierter Carbonylgruppe) ist auffallenderweise relativ schwach. Berechnet man das Verhältnis der maximalen Intensitäten dieser zwei Banden, so ergeben sich für Aldosteron und vier weitere Corticoide die in Tab. 2 wiedergegebenen Zahlen.

Tabelle 2.

Relative Intensitäten der Δ^4 -3-Keto- zur 20-Keto-Bande im IR.-Spektrum.

Substanz	$\frac{\log J_0/J (\Delta^4\text{-3-Keto})}{\log J_0/J (20\text{-Keto})}$
Cortexon	1,9
Corticosteron	1,9
17-Oxycortexon („Substanz S“)	2,2
17-Oxycorticosteron (XIII)	2,3
Aldosteron (I)	3,1

Bei Aldosteron ist dieses Verhältnis also merklich höher als bei den 4 anderen Stoffen.

Die Bestimmung der integrierten Intensitäten¹⁾ (Fig. 7) dieser beiden CO-Banden ergab beim Aldosteron (in CHCl_3) einen Wert von $A^* 2) = 1,97 \cdot 10^4$ 1/g Mol. cm^2 . Die Δ^4 -3-Ketogruppe besitzt nach Literatur¹⁾ in CS_2 einen Wert von $1,6 \cdot 10^4$ und die ungestörte 20-Ketogruppe einen solchen von $0,8 \cdot 10^4$. Da der gemessene Wert beim Aldo-

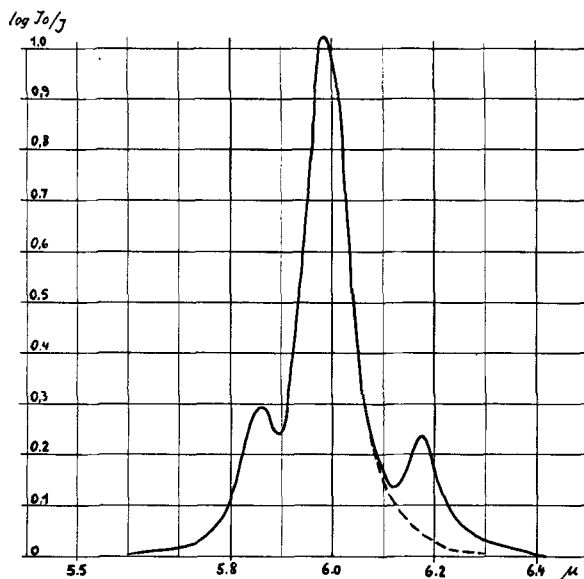


Fig. 7.

IR.-Spektrum von Aldosteron (Nr. 865) wie in Fig. 5, aber speed 6 min/ μ . Wiedergabe der integrierten Intensitäten der 3- und 20-Ketobanden.

¹⁾ R. Norman Jones & K. Dobriner, *Vitamins and Hormones* 7, 293 (Academic Press Inc., New York 1949). Weitere Literatur daselbst.

²⁾ $A^* = \frac{1}{C_M \cdot d} \int \log_{10} \left(\frac{J_0}{J} \right) d\nu$.

steron kleiner ist als die Summe der beiden Teilbeträge, muss geschlossen werden, dass das grosse Intensitätsverhältnis von 3,1 auf eine Schwächung der Intensität der 20-Ketobande zurückzuführen ist. Grössere Mengen der Aldehydform (Ib, wahrscheinlich auch Id) sollten die 20-Ketobande verstärken. Die Schwächung dieser Bande wäre aber mit der Cyclohalbacetalform (Ia) gut verträglich, wenn man annimmt, dass in dieser noch eine intramolekulare H-Brücke (wie in Formel Ic) vorliegt.

Zusammenfassend ergibt sich somit, dass die IR.-Spektren am besten mit der Annahme übereinstimmen, dass Aldosteron in verdünnter Chloroformlösung vorwiegend als Cyclohalbacetalform mit H-Brücke (Ic) enthalten ist, während bei höheren Konzentrationen eine zusätzliche Assoziation durch intermolekulare H-Brücken eintritt. Für die Cyclohalbacetalform (Ia oder Ic) sprechen auch einige rein chemische Reaktionen¹⁾.

Acetylierung: Aldosteron gab bei der Acetylierung mit überschüssigem Acetanhydrid in Pyridin ein Diacetat (III)^{c)}^{b)}, das sich durch Papierchromatographie reinigen und charakterisieren liess. Es wurde bisher nur in kleinen Mengen bereitet und nicht umkristallisiert, konnte aber als kristalline Masse vom Smp. ca. 70° erhalten werden^{d)}. Der genaueste Beweis, dass tatsächlich ein Diacetat vorliegt, liess sich im Mikromaßstab erbringen, indem Proben von Aldosteron und Cortison mit ¹⁴C-Carboxyl-Acetanhydrid von bekannter Radioaktivität acetyliert und das Verhältnis der Aktivitäten der zwei chromatographisch gereinigten Acetyl-derivate bestimmt wurde^{e)}^{d)}. Eine colorimetrische Bestimmung der Acetylgruppen nach *Zaffaroni*²⁾ gab ebenfalls Werte, die am besten auf ein Diacetat passten, doch ist die Methode weniger genau. Das IR.-Spektrum des Diacetats (Nr. 869, vgl. Fig. 8) zeigte keine HO-Bande, was in Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen Formel III steht. Die Bildung dieses Diacetats ist allerdings kein Beweis dafür, dass Aldosteron selbst vorwiegend die Cycloform Ia besitzt. Da die 11 β -Oxygruppe unter den angewandten Bedingungen nicht acetylierbar ist, könnte III auch quantitativ entstehen, wenn in Lösung neben viel Ib auch nur sehr wenig Ia vorhanden ist. Durch partielle Acetylierung von Aldosteron gelang es leicht, ein gut krist. Monoacetat zu bereiten (Nr. 867, IR.-Spektrum vgl. Fig. 9), das Formel II besitzt, da es mit Na-Wismutat³⁾ keinen Formaldehyd gab³⁾, während aus freiem Aldosteron unter gleichen Bedingungen ein Mol Formaldehyd gebildet wurde⁴⁾. So-

¹⁾ Vgl. folgende Mitteilung.

²⁾ *A. Zaffaroni*, Recent Progress in Hormone Research **8**, 78 (Academic Press Inc., New York 1953).

³⁾ *R. W. H. Edwards & A. E. Kellie*, Biochem. J. **56**, 207 (1954).

⁴⁾ Diese Bestimmung wurde von Herrn *R. W. H. Edwards* im Mikromaßstab ausgeführt, wofür auch hier bestens gedankt sei.

wohl aus Diacetyl-aldosteron (III) wie aus 21-Monoacetyl-aldosteron (II) gelang es, gegen alle Erwartung, durch Verseifung mit KHCO_3 in wässrigem Methanol¹⁾ relativ glatt freies Aldosteron wieder zu regenerieren. Diese Reaktion ist bisher in guter Ausbeute nur auf enzymatischem Wege^{2) e) c)} durchgeführt worden.

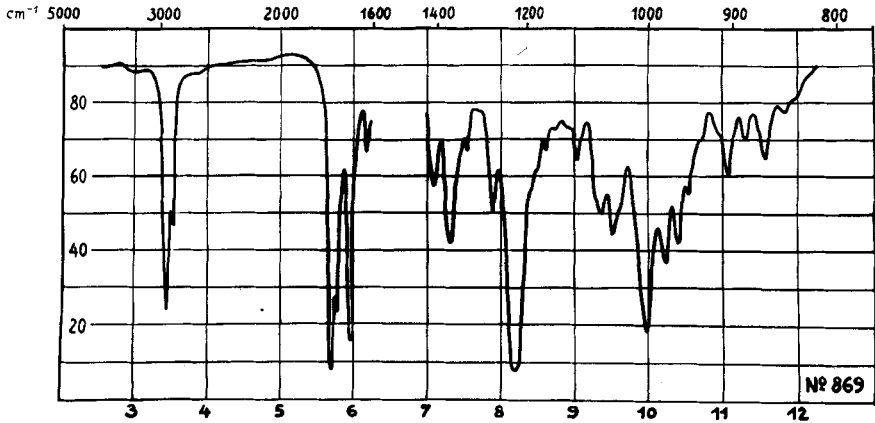


Fig. 8.

I.R.-Spektrum von Aldosteron-diacetat (III, Nr. 869), ca. 500 γ in 2 Tropfen CS_2 , kompensiert mit reinem Lösungsmittel, Mikrozelle, Schichtdicke 0,2 mm.

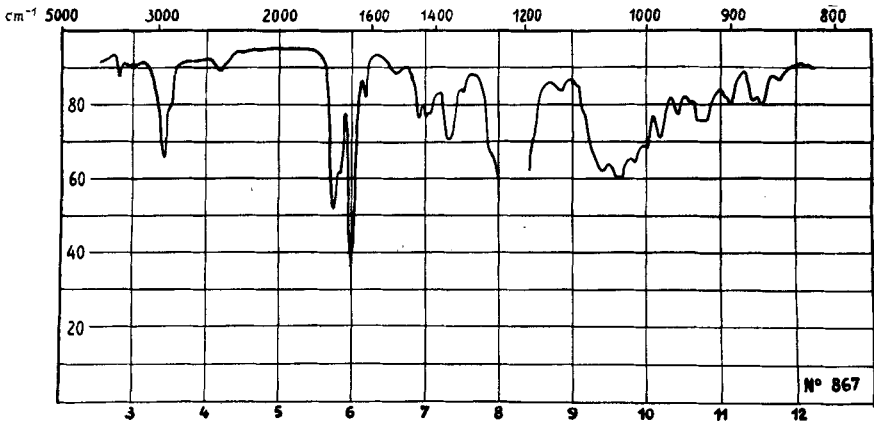


Fig. 9.

I.R.-Spektrum von Aldosteron-monoacetat (II, Nr. 867), ca. 200 γ in 2 Tropfen CHCl_3 , kompensiert mit reinem Lösungsmittel, Mikrozelle, Schichtdicke 0,2 mm.

¹⁾ T. Reichstein & J. v. Euw, *Helv.* **21**, 1181 (1938).

²⁾ H. M. Grundy, S. A. Simpson, J. F. Tait & W. Woodford, *Acta endocrinol.* **11**, 199 (1952).

Einwirkung von Säure: Aldosteron ist gegen Säuren relativ empfindlich¹⁾, und zwar wird es dabei in alkoholischer Lösung offenbar rascher zerstört als in wässriger. Eine orientierende Prüfung gab die in Tab. 3 zusammengestellten Werte. Für jeden Versuch wurden 0,02 mg Aldosteron verwendet.

Tabelle 3.
Einwirkung von Säuren auf Aldosteron.

Lösung (je 5 cm ³)	Einwirkung		Verbleibendes Aldosteron in %
	Zeit in Std.	Temp.	
a) Wasser	20	20°	100
b) Methanol	20	20°	100
c) Wasser + 0,05 cm ³ konz. HCl .	20	20°	80
d) Methanol + 0,05 cm ³ konz. HCl	20	20°	5
e) 40-proz. Essigsäure	20	20°	80
f) 40-proz. Essigsäure	6	20°	90
g) 40-proz. Essigsäure	6	60°	60
h) 40-proz. Essigsäure	6	90°	2

In einem präparativ durchgeführten Versuch wurde Aldosteron mit 1-proz. HCl in Methanol 1 Std. gekocht. Es entstand ein Gemisch, aus dem sich durch Chromatographie an Al₂O₃ geringe Mengen von zwei krist. Stoffen (Nr. 870 und Nr. 871) isolieren liessen. Subst. Nr. 871 könnte vielleicht die Formel V besitzen. Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 10) zeigte sie keine HO-Bande. Nach Papierchromatogramm scheint dieselbe Substanz als Hauptprodukt gebildet zu werden, wenn Aldosteron mit HCl in Wasser bei 20° stehengelassen wird. Über Versuche zur Konstitutionsermittlung wird später berichtet. Der oben genannte Versuch ist unternommen worden, bevor die Bruttoformel und Konstitution des Aldosterons erkannt war. Damals wurde noch mit der Möglichkeit gerechnet, dass es ein 16-Oxycortexon (entspr. VI^g)^h) oder IX) oder ein Derivat eines solchen sein könnte^e). Nach *Mattox*ⁿ) liefert Cortison (XII) mit HCl in Methanol das 11-Keto-21,21-dimethoxy-progesteron (X). Analoge Ketoacetale wurden unter gleichen Bedingungen auch aus anderen Steroiden mit Dioxyacetonseitenkette, deren Acetaten sowie aus Δ^{16} -21-Oxy-20-keto-steroiden (z. B. VIII) erhalten. Wir konnten uns überzeugen, dass sowohl aus VIII wie aus XI unter standardisierten Bedingungen (1 Std. Kochen mit 1-proz. HCl in Methanol) das Acetal VII sehr glatt gebildet wird und auch bei Anwendung kleiner Mengen leicht isolierbar ist. Aus Cortison (XII) entstand das erwähnte X und aus 17-Oxycorticosteron (XIII) wurde ein nicht reduzierender, gut krist. Stoff ge-

¹⁾ H. M. Grundy, S. A. Simpson, J. F. Tait & W Woodford, Acta endocrinol, 11, 199 (1952).

bildet, dessen Analysen auf das Acetal XIV passten; es ist also keine Abspaltung der 11β -Oxygruppe erfolgt.

Es war daher naheliegend, anzunehmen, dass die zwei isomeren 16-Oxycortexone und ihre Acetate (VI und IX) bei dieser Reaktion ebenfalls in guter Ausbeute das Acetal VII liefern würden. Für das 16α -Derivat VI ist dies inzwischen von *Vischer, Schmidlin & Wettstein*⁶⁾ bewiesen worden. Aus Aldosteron konnte jedoch in dieser Weise keines der leicht isolierbaren Acetale VII, X oder XIV erhalten werden, was stark gegen die 16-Oxy-Hypothese sprach.

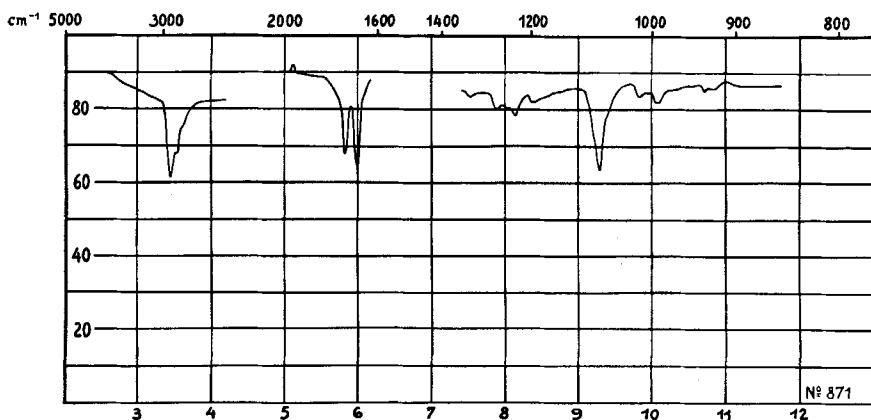


Fig. 10.

IR.-Spektrum von Substanz 871, 50 γ in 0,05 cm³ CS₂, kompensiert mit reinem Lösungsmittel, Mikrozelle, Schichtdicke 3 mm¹⁾. Das Spektrum zeigt keine HO-Bande. Die zwei Carbonylbanden liegen bei 5,81 μ (20-Keto) und bei 5,98 μ (Δ^4 -3-Keto).

Biologische Wirksamkeit: Wie früher erwähnt, war Aldosteron im Test nach *Simpson & Tait*²⁾ etwa 100 mal stärker wirksam als Cortexon. In Na-, K- und H₂O-Ausscheidungsversuchen an nebenierenlosen Ratten³⁾ fanden *Desaulles* u. Mitarb.⁴⁾ im Vergleich zu Cortexon eine 25 mal stärkere Na-Retention und eine 5 mal grössere K-Ausscheidung. Insbesondere verursachte aber Aldosteron keine Änderung der H₂O-Ausscheidung und unterschied sich dadurch auch qualitativ von Cortexon. Im Lebenserhaltungstest am Hund⁵⁾ war

¹⁾ Aufgenommen mit *Perkin-Elmer-Spectrophotometer*, Modell 21, Ser. 235, mit NaCl-Prisma; Auflösungsgrad (resolution) 4, Ansprechgeschwindigkeit (response) 1/1, Registriergeschwindigkeit (speed) 5 und 2 min/ μ , Dämpfung (suppression) 0.

²⁾ *S. A. Simpson & J. F. Tait*, *Endocrinol.* **50**, 150 (1952). Die Zahlenbelege siehe im exper. Teil dieser Arbeit.

³⁾ Unter teilweiser Benützung der Methodik von *C. M. Kagawa, E. S. Shipley & R. K. Meyer*, *Proc. Soc. exp. Biol. u. Med.* **80**, 281 (1952).

⁴⁾ *P. Desaulles, J. Tripod & W. Schuler*, *Schweiz. med. Wschr.* **83**, 1088 (1953).

⁵⁾ *G. A. Harrop, J. J. Pfiffner, A. Weinstein & W. W. Swingle*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **29**, 449 (1932); *J. J. Pfiffner, W. W. Swingle & H. M. Vars*, *J. Biol. Chem.* **104**, 701 (1934); *F. Gross*, *Recent Progress Hormone Res.* **9**, 1953 (im Druck).

es nach *Gross & Gysel*¹⁾ etwa 25–30 mal stärker wirksam als Acetylcortexon. Nach vorläufigen Versuchen²⁾ erwies es sich erwartungsgemäss auch bei der klinischen Prüfung an zwei *Addison*-Patienten als gut wirksam. Die Erhaltungsdosis war ca. 20–30 mal kleiner als bei Acetylcortexon. Darüber hinaus waren aber auch qualitative Unterschiede feststellbar. Aldosteron zeigte ausgesprochene Wirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel, verursachte keine anormale Wasserretention und erhöhte den arteriellen Blutdruck nicht über das physiologische Mass. Als einziger bisher bekannter Stoff zeigte es ausserdem eine deutliche Verminderung der Pigmentierung. Überraschenderweise³⁾ zeigte es aber auch deutliche Wirksamkeit im Leberglykogen-test⁴⁾⁵⁾ (ca. $\frac{1}{3}$ Cortisonwirkung resp. 25fache Cortexonwirkung⁶⁾⁷⁾, im Eosinophilentest⁸⁾ (ca. $\frac{1}{2}$ Cortisonwirkung⁹⁾¹⁰⁾) und im Kältetest¹¹⁾ (ca. $\frac{1}{2}$ Cortisonwirkung¹⁰⁾). Über diese Prüfungen wird von den genannten Forschern gesondert berichtet.

Im Test von *Simpson & Tait* war 21-Monoacetylaldosteron (II) fast gleich (1,25mal schwächer) und Diacetylaldosteron (III) 136 mal schwächer wirksam als freies Aldosteron. Für das Diacetat III fanden *Mason* u. Mitarb.^{c)} den sehr ähnlichen Faktor von ca. 1:100.

Wir danken Sir *Charles Dodds* für sein Interesse an dieser Arbeit und die Förderung des Kontaktes zwischen unseren Arbeitsgruppen in London und in Basel. Die Londoner Vertreter unserer Arbeitsgemeinschaft (*S. A. S.* und *J. F. T.*) danken ihm und Herrn Prof. *J. E. Roberts* noch besonders für ihr Wohlwollen und wertvolle Ratschläge.

Experimenteller Teil.

Alle Smp. sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert. Fehlergrenze in benutzter Ausführungsform bis 200^o etwa $\pm 2^o$, darüber etwa $\pm 3^o$.

1) *F. Gross & H. Gysel*, *Acta endocrinol.* **15**, 199 (1954).

2) *R. S. Mach, J. Fabre, A. Duckert, R. Borth & P. Ducommun*, *Schweiz. med. Wschr.* **84**, 407 (1954). Über weitere unter der Leitung von *G. W. Thorn* (Boston) sowie *P. Forsham* (San Francisco) durchgeführte Versuche werden diese und ihre Mitarbeiter später berichten.

3) Bei amorphen Konzentraten aus Nebennierenextrakten mit hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel wurde bisher keine oder nur sehr geringe „Kohlehydratwirkung“ gefunden. Vgl. *E. C. Kendall*, *J. Am. Med. Assoc.* **116**, 239 (1941); *R. E. Knauff, E. D. Nielson & W. J. Haines*, *Am. Soc.* **75**, 4868 (1953).

4) *E. H. Venning, E. Kazmin & J. C. Bell*, *Endocrinol.* **38**, 79 (1946); vgl. auch *M. L. Pabst, R. Sheppard & M. H. Kuizenga*, *Endocrinol.* **41**, 55 (1947).

5) *M. Sprechler*, *Acta Endocrinol.* **6**, 133 (1951).

6) *W. Schuler, P. Desaulles & R. Meier*, *Exper.* **10**, 142 (1954).

7) Nach Versuchen von Herrn Dr. *G. A. Overbeek* (*N. V. Organon*, Privatmitteilung).

8) *R. S. Speirs & R. H. Meyer*, *Endocrinol.* **45**, 403 (1949).

9) *R. S. Speirs, J. F. Tait & S. A. Simpson*, *Endocrinol.* **54**, 1954 (im Druck).

10) *R. Gaunt, A. S. Gordon, A. A. Renzi, J. Padawer, G. J. Fruhman & M. Gilman*, *Endocrinol.* **54**, 1954 (im Druck).

11) *H. Selye & V. Schenker*, *Proc. Soc. Exp. Biol. u. Med.* **39**, 518 (1938).

Bestimmung von Aldosteron (Beispiele).

1. In Rinder-Nebennieren. 250 g Rinder-Nebennieren (schlachtfrisch) wurden nach *Carlton & Kuizenga*¹⁾ extrahiert. Von dem erhaltenen Äthylchlorid-Extrakt (ca. 150 mg)²⁾ wurde ein aliquoter Teil (ca. 40 mg) auf zwei 19–20 cm breiten Filtrierpapierblättern (*Whatman* Nr. 1, gewaschen mit wässrigem Methanol und Chloroform) auf der Startlinie aufgetragen und im C-System nach *Bush*³⁾ (Toluol-Äthylacetat-Methanol-Wasser 45:5:25:25) ca. 2½ Std. bei 20° chromatographiert. Nach vorsichtiger Trocknung wurde mit Schablone (3 je 5 mm breite Schlitz und schmaler Rand bleiben frei) photokopiert. Lichtquelle: *General Electric Germicidal Lamp 8 W*, 95% der Lichtemission in der 253,7-m μ -Region. Belichtungszeit: 4 Sek. bei einem Abstand von 30 cm. Kopierpapier: *Foto-Dokumentenpapier F. 49* der *Kopit A.G.*, Bern.

Auf der entwickelten Photokopie waren immer mehrere UV.-absorbierende Banden sichtbar (vgl. Fig. 1). Die dem 17-Oxycorticosteron (XIII) entsprechende Bande wurde ausgeschnitten, wobei besonders darauf zu achten war, dass die darunter befindliche Bande des Cortisons (XII) sauber abgetrennt wird. Der ausgeschnittene Papierstreifen wurde dreimal mit je ca. 4 cm³ Methanol-Wasser (1:5) eluiert, das Eluat im Vakuum auf ca. 2–3 cm³ eingengt und sechsmal mit demselben Volumen frisch dest. Chloroform-Äther (1:3) ausgeschüttelt. Die über wenig Na₂SO₄ getrockneten Auszüge wurden eingedampft. Vom Rückstand (0,5–4 mg) wurden 0,5–1 mg auf 1,5 cm breitem Filtrierpapierstreifen im Propylenglykol-Toluol-System 24 Std. lang bei ca. 20° chromatographiert, wobei parallel Cortison in bekannten Mengen (5, 10, 15 und 20 γ) auf gleichem Streifen chromatographiert wurde. (Laufstrecke des Cortisons ca. 12 cm.) Nach vorsichtiger Trocknung wurde zuerst eine Photokopie bereit, dann wurden die Streifen durch eine Mischung von 1 Vol. 0,1-proz. Blautetrazolium in Wasser mit 9 Vol. wässriger 2-n. NaOH gezogen. Die α -Ketole gaben dabei sofort starke blaue Flecken, während Δ^4 -3-Ketosteroide ohne reduzierende Gruppierung sich erst nach längerer Zeit schwach blauviolett färbten. Als positive Reduktionsprobe wurde daher nur eine sofortige Blaufärbung bezeichnet. — Die nassen (alkalischen) Streifen wurden hierauf ca. 10–15 Min. auf ca. 80° erwärmt (bis sie eben trocken waren) und dann im UV.-Licht auf gelbe Fluoreszenz geprüft.

Der Nachweis des Aldosterons galt als gesichert, wenn im zweiten Chromatogramm ein Fleck mit einem R_F-Wert wie Cortison oder wenig grösser auftrat, der die folgenden Reaktionen zeigte:

- a) UV.-Absorption: positiv.
- b) Reduktionsprobe (Blautetrazolium): sofortige Blaufärbung.
- c) Gelbe Fluoreszenz nach Erhitzen: positiv.

Als Kontrolle dienten in einem Parallelchromatogramm noch folgende Farbreaktionen: Phosphorsäure⁴⁾, SbCl₃ und Jod-Kaliumjodid⁵⁾. Für Aldosteron müssen diese bis 30 γ völlig negativ ausfallen.

Für die halbquantitative Bestimmung wurden die Intensitäten des Aldosteronflecks in den drei genannten positiven Reaktionen (a–c) mit den Cortisonflecken bekannten Gehalts (5, 10, 15 und 20 γ) visuell verglichen und der Durchschnitt der nach a–c gefundenen Einzelwerte berechnet. Diese Einzelwerte sollten nicht mehr als 20% voneinander abweichen, andernfalls wurden die zu hohen Extremwerte für die Berechnung nicht verwendet. Wenn der Wert nach a) z. B. 10 γ betrug, derjenige nach b) aber nur 5 γ , so war dies ein Hinweis dafür, dass der Aldosteronfleck noch eine UV.-absorbierende Verun-

¹⁾ *G. F. Carlton & M. H. Kuizenga*, *J. Biol. Chem.* **116**, 57 (1936).

²⁾ Übersteigt das Gewicht dieses Extraktes 300 mg, so ist eine Entfettung einzuschalten durch Verteilung zwischen Petroläther (50–70°) und Äthanol von zunehmendem Wassergehalt (bis 50%). Falls nötig, wird dabei etwas gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt, um Emulsionen zu brechen.

³⁾ *I. E. Bush*, *Biochem. J.* **50**, 370 (1952).

⁴⁾ *R. Neher & A. Wettstein*, *Hely.* **34**, 2278 (1951).

⁵⁾ *A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann*, *Science* **111**, 6 (1950).

reinigung enthielt, die für die Aldosteronbestimmung nicht berücksichtigt werden darf. Umgekehrt wäre bei einem kleinen UV.-Wert (a) und einem grossen Reduktionswert (b) letzterer wegzulassen. Dieser Fall ist bisher allerdings nie beobachtet worden.

2. Bestimmung in Schweine-Nebennieren. Es wurden 250 g Schweine-Nebennieren verwendet, die 3—4 Tage bei 0° aufbewahrt waren. Die Bestimmung geschah genau wie im Beispiel 1.

3. Bestimmung von Aldosteron in Rinderblut. 1,8 l frisches Kuhblut wurden unmittelbar nach der Schlachtung mit 200 cm³ 2-proz. Ammoniumoxalat-Lösung von 0° vermischt. Eine Std. später wurde mit 2 l Wasser vermischt und bei ca. 20° dreimal mit je 3 l frisch dest. Äthylacetat¹⁾ ausgeschüttelt. Es liessen sich total 8 l Essigesterlösung abtrennen, die mit 125 cm³ 0,2-n. Sodalösung und zweimal mit je 125 cm³ Wasser gewaschen wurden. Dann wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum bei 35° eingedampft. Der Rückstand (679,4 mg) wurde in 40 cm³ Petroläther und 40 cm³ 95-proz. Äthanol gelöst und dann mit 7,5 cm³ Wasser vermischt. Die sich abtrennende obere Phase wurde verworfen. Die untere Phase wurde zunächst mit 11 cm³ Wasser und 5 cm³ gesättigter NaCl-Lösung versetzt und zweimal mit je 100 cm³ Petroläther ausgeschüttelt (Auszüge verworfen). Die schwere Phase wurde nun nochmals mit 7,5 cm³ Wasser und 5 cm³ gesättigter NaCl-Lösung versetzt und erneut zweimal mit je 100 cm³ Petroläther ausgeschüttelt. Die verbleibende wässrig-alkoholische Phase wurde im Vakuum auf 20 cm³ eingeeengt und fünfmal mit je 20 cm³ Chloroform-Äther (1:3) ausgeschüttelt. Die über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge hinterliessen beim Eindampfen im Vakuum 8,0 mg Rückstand. Dieser wurde auf einem 10 cm breiten Blatt wie im Beispiel 1 beschrieben chromatographiert und weiter behandelt. In zwei Versuchen wurde ein Aldosterongehalt von 5 γ und 2 γ pro l Blut gefunden.

4. Bestimmung von Aldosteron in öliger Lösung. Eine Lösung von 10 γ Aldosteron in 0,1 cm³ Sesamöl wurde mit 10 cm³ Methylenchlorid verdünnt und durch eine Säule von 1 g Silicagel (*Davison*, commercial grade, mesh size „through 200“²⁾) in Methylenchlorid filtriert. Durch Nachwaschen mit 30 cm³ Methylenchlorid liess sich das Öl vollständig entfernen. Dann wurde mit 10 cm³ Methylenchlorid-Aceton (Fr. 1) und dreimal mit je 10 cm³ reinem Aceton nachgewaschen (Fr. 2—4). Der Gehalt in den 4 Fraktionen wurde papierchromatographisch nach Beispiel 1 bestimmt. Gefunden wurde:

Fraktion	Aldosterongehalt
1	4 γ
2	5 γ
3	0,3 γ
4	0 γ
Total somit	9,3 γ (93%)

Bemerkungen: Sind sehr kleine Aldosteronmengen zu erwarten, so kann es vorzuziehend sein, auch bei Nebennierenextrakten eine Chromatographie an Silicagel einzuschalten.

Beispiel. 200 mg Äthylchloridextrakt aus 250 g Rinder-Nebennieren wurden in 10 cm³ Methylenchlorid gelöst, an 6 g Silicagel adsorbiert, dreimal mit je 10 cm³ Methylenchlorid und viermal mit je 10 cm³ Chloroform gewaschen. Dann wurde dreimal mit je 10 cm³ Chloroform-Aceton (9:1) und fünfmal mit je 10 cm³ Chloroform-Aceton (1:1) eluiert. Diese Eluate gaben beim Eindampfen im Vakuum 20—50 mg Rückstand, der auf Cellulose-Blättern nach Beispiel 1 chromatographiert wurde. Er enthielt das gesamte im rohen Extrakt vorhandene Aldosteron, Cortison und 17-Oxycorticosteron.

¹⁾ *I. E. Bush*, *J. Endocrinol.* **9**, 95 (1953).

²⁾ *The Davison Chemical Corp.*, Baltimore, U.S.A.

Weitere Farbreaktionen: Alle Versuche zur Auffindung einer empfindlichen und spezifischen Farbreaktion für Aldosteron blieben bisher erfolglos. Ausser den oben genannten wurden noch folgende Reagentien geprüft (mit je 5 γ Aldosteron auf *Whatman*-Papier Nr. 1): Chlor-SbCl₃¹⁾: gelbe Fluoreszenz (sehr schwach). SbCl₅²⁾: bräunlich mit gelber Fluoreszenz (sehr schwach). ZnCl₂-Benzoylchlorid³⁾: hellblau, mit hellblauer Fluoreszenz (sehr schwach). Anisaldehyd-H₂SO₄⁴⁾: gelbbraun (sehr schwach). H₂SO₄+15% SO₃⁵⁾: bräunlich mit gelblicher Fluoreszenz (sehr schwach). 60-proz. HClO₄⁶⁾: blaue Fluoreszenz (sehr schwach). *Millon's Reagens*⁵⁾: blaue Fluoreszenz (sehr schwach). m-Dinitrobenzol+Alkali (*Zimmermann*)⁷⁾: blaviolett mit gelber Fluoreszenz (sehr schwach). 2,4-Dinitrophenylhydrazin in methanol. HCl⁸⁾: gelb, nach Zusatz von NaOH braun (schwach, weniger deutlich als bei XII und XIII). Dianilinoäthan+Kaliumjodplatinat⁹⁾: blaviolett (schwach, wie mit XII und XIII). Ganz negativ waren: konz. H₂SO₄¹⁰⁾, Trichloressigsäure¹¹⁾ in CHCl₃ oder in H₂SO₄, Dimethylsulfat⁴⁾, Jodtrichlorid¹²⁾, Jod in HJ⁷⁾, Phenolsulfonat⁵⁾ in H₃PO₄, Hydrazin¹³⁾, Dianilinoäthan-hydrochlorid¹⁴⁾, 3,5-Dinitrobenzoesäure¹⁵⁾, Anilinphtalat¹⁶⁾, 2,6-Dichlorphenolindophenol¹⁷⁾, Ninhydrin¹⁸⁾, SnCl₄¹⁹⁾, FeCl₃²⁰⁾, FeCl₃-K₃Fe(CN)₆²¹⁾ Nitroprussidnatrium+Alkali (*Legal*)³⁾, Kieselwolframsäure²²⁾, Phosphormolybdänsäure²²⁾, Kaliumjodplatinat²³⁾, Kaliumjodwismutat²³⁾, Berylliumchlorid²⁴⁾, Lanthantriat²⁵⁾.

Präparative Isolierung von Aldosteron aus Rinder-Nebennieren. 500 kg gefrorene Rinder-Nebennieren wurden nach *Cartland & Kuizenga* (l. c.) extrahiert und gaben 167 g rohen Äthylenchloridextrakt (NN III) als dunkelbraunen Sirup. Eine weitere Charge von 500 kg Drüsen gab in gleicher Weise 1692 g analogen Extrakt (NN V)²⁶⁾.

Vorreinigung: Diese geschah in 5 Scheidetrichtern, ähnlich wie früher beschrieben²⁷⁾. Die 167 g Extrakt NN III wurden mit 2 l reinstem Pentan und 200 cm³ 30-proz. Methanol

¹⁾ *G. M. Shull, J. L. Sardinias & R. C. Nubel*, Arch. Biochem. Biophys. **37**, 186 (1952).

²⁾ *J. M. McMahon, R. B. Davis & G. Kalnitsky*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **75**, 799 (1950).

³⁾ *R. Neher & A. Wettstein*, Helv. **35**, 276 (1952).

⁴⁾ *R. Neher & A. Wettstein*, Helv. **34**, 2278 (1951).

⁵⁾ *L. R. Axelrod*, J. Biol. Chem. **201**, 59 (1953).

⁶⁾ Tauchen, dann bei 80° trocknen; *H. Tauber*, Anal. Chem. **24**, 1494 (1952).

⁷⁾ *L. R. Axelrod*, J. Biol. Chem. **205**, 173 (1953).

⁸⁾ *G. T. Bassil & R. J. Boscott*, Biochem. J. **48**, xlvi (1951).

⁹⁾ Reagens: 5,3 g Dianilinoäthan in 100 cm³ Methanol + 1,2 cm³ 50-proz. Essigsäure. Spritzen, trocknen, mit H₂O waschen, trocknen, dann mit Kaliumjodplatinat spritzen wie dort angegeben.

¹⁰⁾ *H. Reich, D. H. Nelson & A. Zaffaroni*, J. Biol. Chem. **187**, 414 (1950).

¹¹⁾ *A. B. Svendsen & K. B. Jensen*, Pharmac. acta Helv. **25**, 241 (1950).

¹²⁾ *J. Green*, Biochem. J. **47**, 1 (1950).

¹³⁾ 2% Hydrazinhydrat in Wasser. Tauchen, dann bei 90° trocknen.

¹⁴⁾ 2% in n. HCl. Spritzen, dann bei 80° trocknen.

¹⁵⁾ *I. E. Bush & D. A. H. Taylor*, Biochem. J. **52**, 644 (1952).

¹⁶⁾ *S. M. Partridge*, Nature **164**, 443 (1949).

¹⁷⁾ *L. W. Mapson & S. M. Partridge*, Nature **164**, 479 (1949).

¹⁸⁾ 0,2% in n. Butanol. Spritzen, dann 9–10 Min. auf 90° erhitzen.

¹⁹⁾ 30% in CHCl₃. Tauchen, dann 20 Min. auf 90° erhitzen.

²⁰⁾ 1% in Wasser. Spritzen, dann 9 Min. auf 90° erhitzen.

²¹⁾ *D. H. R. Barton*, Nature **170**, 250 (1952).

²²⁾ *D. Kritchevsky & M. R. Kirk*, Arch. Biochem. Biophys. **35**, 346 (1952).

²³⁾ *A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann*, J. Biol. Chem. **177**, 109 (1949).

²⁴⁾ Gesättigte Lösung in 2-n. HCl. Spritzen, dann 5 Min. auf 90° erhitzen.

²⁵⁾ Gesättigte Lösung in Wasser. Spritzen, dann 5 Min. auf 90° erhitzen.

²⁶⁾ Diese zwei Extrakte wurden uns von der *N. V. Organon*, Oss (Holland), zur Verfügung gestellt.

²⁷⁾ Vgl. *T. Reichstein*, Helv. **19**, 1107 (1936).

in einen grossen Scheidetrichter gespült und energisch durchgeschüttelt. Nach möglichst vollständiger Trennung wurde die wässrig-methanolische Phase, in der etwas unlösliches, fast schwarzes Pulver suspendiert war, filtriert und in einen weiteren Scheidetrichter mit 1 l Pentan abgelassen, wo sie wieder energisch geschüttelt wurde. Sie passierte dann analog noch 3 weitere Scheidetrichter mit je 1 l Pentan. Anschliessend wurde in gleicher Reihenfolge noch siebenmal mit je 200 cm³ 30-proz. Methanol ausgeschüttelt. Die vereinigten Pentanauszüge hinterliessen beim Eindampfen 60 g dunkles, fettartiges Material (verworfen).

Die vereinigten klaren 30-proz. Methanolphasen wurden im Vakuum bei 35° Badtemperatur auf 150 cm³ eingengt, wobei sich etwas unlösliches Material ausschied. Dieses Konzentrat wurde sechsmal mit je 400 cm³ frisch dest. Chloroform-Äther (1:3)¹⁾ kräftig ausgeschüttelt. (Das verwendete Lösungsmittel wurde zuerst zum Ausspülen des Kolbens benützt, an dessen Wänden sich unlösliches Material befand, wobei dieses bis auf Spuren in Lösung ging.) Die 6 Auszüge wurden in 6 Scheidetrichtern belassen, im Kaltraum auf 3° abgekühlt und bei dieser Temperatur der Reihe nach (beginnend mit erstem Auszug) zweimal mit je 20 cm³ Wasser, zweimal mit je 20 cm³ 0,5-n. HCl, einmal mit 25 cm³ Wasser, fünfmal mit je 20 cm³ 20-proz. KHCO₃-Lösung und zweimal mit je 15 cm³ Wasser gewaschen, wobei sehr starke Aufhellung eintrat. Dann wurde der Reihe nach über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum bei 35° eingedampft. Aus dem braunen Rückstand liess sich bei 0,02 Torr und 40° Badtemperatur noch eine merkliche Menge flüchtiger Anteile abdestillieren. Das verbleibende braune Konzentrat wog 27 g und diente zur Verteilungschromatographie.

Die mit Chloroform-Äther ausgeschüttelte wässrige Phase wurde anschliessend noch viermal mit Äthylacetat ausgeschüttelt, wobei 1,35 g schwarzbrauner Extrakt erhalten wurde (nicht untersucht).

Aus den KHCO₃-Auszügen liessen sich nach Ansäuern 0,87 g dunkle saure Anteile ausschütteln (nicht untersucht).

Die 1592 g Extrakt NN V wurden ganz analog vorgereinigt. Hier wurden nur 4 Scheidetrichter verwendet, wobei für den ersten 4 l Pentan, für die drei weiteren 1,5, 1,0 und 0,8 l benützt wurden. Der grösseren Fettmenge entsprechend wurde 20mal mit je 200 cm³ 30-proz. Methanol ausgeschüttelt. Erhalten wurde 26,5 g braunes Konzentrat. Die vorher beim Erwärmen im Hochvakuum (0,02 Torr und 40°) flüchtigen Anteile (23 g) wurden bei diesem Versuch in einer Kältefalle (bei -80°) aufgefangen. Redestillation dieses Anteils bei 80 Torr gab 18 g einer farblosen, scharf bei 98—99° siedenden Flüssigkeit, die sich als Diacetonalkohol erwies.

C₆H₁₂O₂ (116,16) Ber. C 62,04 H 10,43% Gef. C 62,33; 62,04 H 10,57; 10,86% (Gy)
d = 0,9395. Halogenfrei, N-frei. Leicht löslich in Wasser, Alkohol und Äther, unlöslich in Pentan.

Trennung von Konzentrat NN III. *Erste Verteilungschromatographie*: Ausführung und Bereitung der Säule wie beschrieben²⁾. Es wurde Säule Nr. 4 benützt. Sie wurde mit 1,4 kg gereinigtem Kieselgur, das mit 1,4 kg Wasser befeuchtet und in reinem Petroläther suspendiert war, gefüllt und 2 Tage mit reinem Petroläther laufengelassen, wobei die Eluate beim Eindampfen keinen wägbaren Rückstand hinterliessen.

Die 27 g Konzentrat (aus NN III) wurden in 50 cm³ Aceton gelöst, mit 25 g Kieselgur-Wasser (1:1) vermischt und von Aceton im Vakuum vollständig befreit. Dann wurde in Petroläther suspendiert, auf die Säule gegeben und nach Absitzen und Festpressen mit passenden Filterpapierscheiben gedeckt. Zum Schluss wurde noch eine Schicht (25 g) frisches Kieselgur-Wasser analog aufgetragen und wieder mit einigen Filterpapierscheiben gedeckt. Anschliessend wurde bei 20° chromatographiert, Laufgeschwindigkeit ca. 100 cm³ pro Std. Meistens wurden täglich 2 Fraktionen gewonnen, die mit einem auf das gewünschte Gewicht einstellbaren Fraktionensammler abgetrennt wurden. Im ganzen wurden 140 Fraktionen erhalten (vgl. Tab. 4).

¹⁾ Verhältnis der Volumina; dies gilt für alle andern Verhältniszahlen.

²⁾ H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. **36**, 357 (1952).

Tabelle 4.

Erste Verteilungschromatographie von NN III.

Nr.	Lösungsmittel ¹⁾		Eindampfrückstand		
	Art	Menge in cm ³	Menge in mg	P-Ch ²⁾	Habitus und präparatives Resultat ³⁾
1	Pe (rein)	700	99		
2	Pe (rein)	700	280		
3	Pe (rein)	700	200		
4	Pe (rein)	700	268		
5	Pe (rein)	700	283		
6	Pe (rein)	700	266		
7	Pe (rein)	700	258		
8	Pe (rein)	700	229		
9	Pe (rein)	700	184		
10	Pe (rein)	700	145		
11	Pe (rein)	700	180		
12	Pe (rein)	1400	540		
13	Pe (rein)	1400	895		
14	Pe (rein)	1400	1590		
15	Pe (rein)	1450	406		
16	Pe (rein)	1640	139		
17	Pe (rein)	1450	58		
18	Pe-Be (95:5)	1400	61		
19	Pe-Be (95:5)	1600	50		
20	Pe-Be (95:5)	1600	85		
21	Pe-Be (95:5)	1550	106		
22	Pe-Be (90:10)	1600	152		
23	Pe-Be (90:10)	1400	184		
24	Pe-Be (90:10)	1550	169		
25	Pe-Be (90:10)	1600	189		
26	Pe-Be (90:10)	1450	352		
27	Pe-Be (90:10)	1500	578		
28	Pe-Be (90:10)	1500	384		
29	Pe-Be (85:15)	1550	136		
30	Pe-Be (85:15)	1500	81		
31	Pe-Be (85:15)	1500	97		
32	Pe-Be (85:15)	1500	73		
33	Pe-Be (85:15)	1500	63		
34	Pe-Be (80:20)	1550	123		
35	Pe-Be (80:20)	1500	157		
36	Pe-Be (80:20)	1500	123		
37	Pe-Be (80:20)	1650	136		
38	Pe-Be (80:20)	1450	119		
39	Pe-Be (80:20)	1600	141		
40	Pe-Be (80:20)	1500	167		
41	Pe-Be (80:20)	1600	164		
42	Pe-Be (80:20)	1500	101		
43	Pe-Be (80:20)	1500	102		
44	Pe-Be (80:20)	1700	111		
45	Pe-Be (80:20)	1700	129		
46	Pe-Be (80:20)	1450	113		
47	Pe-Be (80:20)	1400	82		
48	Pe-Be (80:20)	1400	66		
49	Pe-Be (80:20)	1400	60		

2—11 gaben 470 mg rohe, bzw.
380 mg reine Subst. 86412—14 gaben viel Phenol und
5 mg AdrenosteronPhenol + 64 mg amorphes De-
stillat, Sdp. 0,01 Torr 150–220°
Phenol + 42 mg amorphes De-
stillat, Sdp. 0,01 Torr 150–220°amorph
amorph
amorph
amorph
amorph
amorph
amorph26—29 gaben ca. 100 mg reines
11-Dehydro-corticosteronamorph
amorph
amorph
amorph35—49 gaben insgesamt 184 mg
reines Corticosteron
(Mutterlauge 1,2 g)

Tabelle 4 (Fortsetzung).

Nr.	Lösungsmittel ¹⁾		Eindampfrückstand			
	Art	Menge in cm ³	Menge in mg	P-Ch ²⁾	Habitus und präparatives Resultat ³⁾	
50	Pe-Be (77:33)	1450	60	+	amorph	
51	Pe-Be (77:33)	1300	53		amorph	
52	Pe-Be (70:30)	1300	67		amorph	
53	Pe-Be (70:30)	1300	76	+	amorph	
54	Pe-Be (70:30)	1300	70		amorph	
55	Pe-Be (70:30)	1350	72		amorph	
56	Pe-Be (70:30)	1500	71	+	amorph	
57	Pe-Be (70:30)	1300	59		amorph	
58	Pe-Be (70:30)	1320	79		amorph	
59	Pe-Be (70:30)	1330	66	+	amorph	
60	Pe-Be (68:32)	1330	66		amorph	
61	Pe-Be (68:32)	1330	60		amorph	
62	Pe-Be (68:32)	1330	53	+	amorph	
63	Pe-Be (68:32)	1330	62		amorph	
64	Pe-Be (64:36)	1330	64		amorph	
65	Pe-Be (62:38)	1470	70	+	amorph	
66	Pe-Be (54:46)	1270	92		amorph	
67	Pe-Be (52:48)	1270	88		amorph	
68	Pe-Be (51:49)	1220	82	+	amorph	
69	Pe-Be (51:49)	1270	96		amorph	
70	Pe-Be (50:50)	1240	100		Spur Nadeln F. 300—320°	
71	Pe-Be (50:50)	1410	112	+	5 mg Nadeln	
72	Pe-Be (50:50)	1240	96		Spur krist.	
73	Pe-Be (50:50)	1260	86		amorph	
74	Pe-Be (49:51)	1250	82	+	amorph	
75	Pe-Be (49:51)	1250	69		amorph	
76	Pe-Be (47:53)	1290	76		amorph	
77	Pe-Be (46:54)	1290	69	+	amorph	
78	Pe-Be (45:55)	1100	63		amorph	
79	Pe-Be (45:55)	820	45		Spur krist.	
80	Pe-Be (45:55)	1000	45	+	amorph	
81	Pe-Be (45:55)	1180	54		amorph	
82	Pe-Be (42:58)	1100	56		amorph	
83	Pe-Be (40:60)	1250	59	+	amorph	
84	Pe-Be (38:62)	1250	52	+	amorph	
85	Pe-Be (38:62)	1250	50	+	Spur krist.	
86	Pe-Be (35:65)	1230	60	+	Spur krist. } 86—90 total 357 mg	
87	Pe-Be (27:73)	1210	69	+	Spur krist. } Aus 86—88 ca. 2 mg	
88	Pe-Be (26:74)	1100	68	+	Spur krist. } Krist. (subl. ab 220	
89	Pe-Be (25:75)	1350	81	+	amorph } bis ca. 270°), vom	
90	Pe-Be (25:75)	1500	79	+	amorph } Rest 324 mg für	
						2. Verteilungschromatographie.
91	Pe-Be (25:75)	850	56	+	Spur Krist. XIII	
92	Pe-Be (25:75)	1350	97	+	wenig Krist. XIII	
93	Pe-Be (25:75)	1430	91		viel Krist. XIII	
94	Pe-Be (25:75)	1400	87		Krist. XIII	
95	Pe-Be (25:75)	1400	69		Krist. XIII	
96	Pe-Be (25:75)	1430	50		Krist. Smp. 219—238°	
97	Pe-Be (23:77)	1420	40		amorph, braun	
98	Pe-Be (22:78)	1420	39		amorph, braun	
99	Pe-Be (7:93)	1300	72		amorph, braun	

Tabelle 4 (Schluss).

Nr.	Lösungsmittel ¹⁾		Eindampfrückstand		
	Art	Menge in cm ³	Menge in mg	P-Ch ²⁾	Habitus und präparatives Resultat ³⁾
100	Pe-Be (3:97)	1360	79		amorph, braun
101	Be (rein)	1570	102		amorph, braun
102	Be (rein)	1570	101		amorph, braun
103	Be (rein)	1550	87		amorph, braun
104	Be (rein)	1580	62		amorph, braun
105	Be (rein)	1580	48		amorph, braun
106	Be (rein)	1600	34		amorph, braun
107	Be (rein)	1600	33		amorph, braun
108	Be (rein)	1600	33		amorph, braun
109	Be-Chf (91: 9)	1520	49		wenig Kugeldrusen
110	Be-Chf (88:12)	1330	49		wenig Kugeldrusen
111	Be-Chf (88:12)	1470	36		amorph
112	Be-Chf (88:12)	1450	38		amorph
113	Be-Chf (88:12)	1450	25		amorph
114	Be-Chf (80:20)	1400	39		amorph
115	Be-Chf (80:20)	1400	40		amorph
116	Be-Chf (77:23)	1350	46		amorph
117	Be-Chf (73:27)	1350	48		amorph
118	Be-Chf (73:27)	1350	52		wenig krist.
119	Be-Chf (73:27)	1350	54		amorph
120	Be-Chf (68:32)	1330	50		amorph
121	Be-Chf (53:47)	1450	144		amorph
122	Be-Chf (53:47)	1190	79		amorph
123	Be-Chf (50:50)	1170	52		amorph
124	Be-Chf (35:65)	1180	30		amorph
125	Be-Chf (30:70)	1120	40		amorph
126	Be-Chf (14:86)	1000	88		amorph
127	Be-Chf (3:97)	950	60		amorph
128	Be-Chf (3:97)	950	35		amorph
129	Be-Chf (1:99)	1050	41		amorph
130	Chf (rein)	1130	45		amorph
131	Chf (rein)	1130	39		amorph
132	Chf (rein)	800	30		amorph
133	Chf (rein)	1530	58		amorph
134	Chf (rein)	1560	33		amorph
135	Chf (rein)	1350	28		amorph
136	Chf (rein)	1520	25		amorph
137	Chf (rein)	1520	16		amorph
138	Chf (rein)	1520	12		amorph
139	Chf (rein)	1520	9		amorph
140	Chf (rein)	1520	6		amorph

1) Pe = Petroläther }
 Be = Benzol } Alle in reinster Form, fein dest. Gemische jeweils mit
 Chf = Chloroform } Wasser gesättigt.

2) Prüfung im Papierchromatogramm. Resultate siehe Tab. 5 und 6.

3) Bei diesem Extrakt wurden bisher nur wenige der vor und nach Aldosteron eluierten Fraktionen genauer untersucht.

Die in der vorletzten Kolonne bezeichneten Fraktionen wurden im Papierchromatogramm in Mengen von ca. 0,1 mg im C-System von *Bush* sowie im Propylenglycol-Toluol-System orientierend geprüft. Über das Ergebnis orientiert Tab. 5.

Tabelle 5.

Prüfung einiger Fraktionen von NN III, Tab. 4, im Papierchromatogramm.

Frak- tions-Nr.	Ergebnis:	
	Zahl der Flecke	Bezeichnung der nachgewiesenen Stoffe ¹⁾
50	2	Corticosteron, höher polare Substanz
53	3	Corticosteron, höher polare Substanz, Spur Nr. 857
56	4	wenig Nr. 857, 3 schwächer polare Stoffe
59	4	wenig Nr. 857, 3 schwächer polare Stoffe
62	3-4	Spur Nr. 857, 2-3 schwächer polare Stoffe
65	3-4	Spur Nr. 857, 2-3 schwächer polare Stoffe
68	3-4	3-4 unbek. Stoffe, relativ schwach polar
71	1	S 71
74	3	S 71, wenig Cortison, S 74
77	2	Cortison, S 74
80	2	viel Cortison, S 74
83	3	Cortison, Spur S 74, S 83
84	4 ²⁾	wenig Cortison, S 83, S 84, S 85
85	4 ²⁾	Spur Aldosteron, Spur Cortison, wenig S 83, S 85
86	4 ²⁾	Aldosteron (ca. 2%), Spur Cortison, Spur XIII, wenig S 83
87	5 ²⁾	Aldosteron (ca. 3-4%), Spur Y, Spur XIII, S 85, S 87
88	5 ²⁾	Aldosteron (10%), wenig Y, Spur XIII, S 85, S 87
89	4 ²⁾	Aldosteron (10-15%), wenig Y, wenig XIII, S 85
90	5	Aldosteron (4-5%), XIII, S 85, S 87, S 90
91	5	Aldosteron (1-2%), viel XIII, S 85, S 87, S 90
92	3	viel XIII, S 85, S 90

Über die nicht identifizierten, nur mit Nummern bezeichneten Stoffe soll später berichtet werden.

Präparativ wurden aus dieser Verteilungschromatographie bisher u. a. die folgenden Kristalle gewonnen:

Die Fraktionen 2-11 (total 2,263 g) gaben aus Äther-Petroläther lange Nadeln. Das ganze Material dieser Fraktionen wurde im Molekularkolben bei 0,01 Torr bis 190° Badtemperatur destilliert (Rückstand 280 mg). Das Destillat gab aus Äther 470 mg rohe bzw. 380 mg reine Subst. Nr. 864 (vgl. spätere Mitteilung).

Die Fraktionen 12-14 (total 3,025 g) enthielten viel Phenol³⁾. Das vereinigte Material (3,025 g) wurde im Molekularkolben bei 0,01 Torr destilliert. Bis 70° wurden 1,4 g reines Phenol erhalten. Bis 150° destillierten dann ca. 175 mg Material und von 150-220° 420 mg. Letzteres gab aus Aceton-Äther 5 mg Adrenosteron, Smp. 213-217°; Rückstand ca. 100 mg.

¹⁾ Die nicht identifizierten Stoffe sind mit Nummern bezeichnet. Eigenschaften bzw. Farbreaktionen vgl. Tab. 6. Römische Zahlen entsprechen den Formeln.

²⁾ Die Fraktionen 84-89 enthielten ausserdem noch kleine Mengen einer reduzierenden Substanz, die sich noch etwas polarer verhielt als XIII.

³⁾ Solches war während der Extraktion zur Desinfektion zugegeben worden.

Die Fraktionen 26—29 (zusammen 1,45 g) gaben aus Methanol-Äther 100 mg 11-Dehydro-corticosteron, Smp. 172—180°.

Die Fraktionen 35—49 (zusammen 1,65 g) gaben aus Aceton-Äther ca. 0,2 mg Nadeln, die sich beim Erwärmen bei ca. 200—260° in lange, dünne Nadeln umwandelten, Smp. 300—320°.

Die Fraktionen 91—95 (zusammen 400 mg) gaben aus Aceton-Äther 39 mg rohes 17-Oxycorticosteron (XIII). Die Mutterlaugen von Fr. 91 enthielten noch ca. 1—2% Aldosteron und diejenigen von 92 noch Spuren davon (Gewicht dieser zwei zusammen 98 mg).

Die weiteren Fraktionen enthielten Gemische der Substanzen D, C, V, E, A usw. und wurden noch nicht getrennt.

Die verwendete Kieselgursäule konnte nach Rückwaschen mit gleichen Lösungsmitteln in umgekehrter Reihenfolge, zuletzt mit Petroläther, gleich wieder für eine neue Charge Extrakt verwendet werden. Lediglich die oberste Schicht, in der das Konzentrat aufgebracht worden war, wurde entfernt.

Zweite Verteilungschromatographie: Für diese diente Cellulosepulver als Träger und das B2-System vom *Bush*¹⁾, teilweise unter Erhöhung des Toluolzusatzes.

Cellulosepulver: Das käufliche Material (*Whatman-Cellulosepulver*) wurde heiss mit folgenden Lösungsmitteln gewaschen, bis diese farblos abliefen und beim Abdestillieren keinen Rückstand mehr hinterliessen: Chloroform, Äthanol, Wasser, Äthanol, Chloroform, Aceton. Es wurde dann im Vakuum getrocknet.

Petroläther: Wurde wie früher gereinigt²⁾.

Toluol: Käufliches, reines (S-freies) Toluol wurde mehrmals mit konz. H₂SO₄, dann mit starker NaOH-Lösung ausgeschüttelt und über Na destilliert. Wenn es älter als 8 Tage war, musste es frisch über wenig Na destilliert werden.

Methanol: Käufliches Methanol puriss. wurde frisch destilliert; es konnte mehrere Wochen lang aufbewahrt werden.

Lösungsmittelsystem: 666 cm³ Toluol, 333 cm³ Petroläther, 400 cm³ Wasser und 600 cm³ Methanol wurden im Scheidetrichter gemischt. Die schwere Schicht wurde als ruhende und die leichte Schicht als bewegliche Phase verwendet. Für die Fortsetzung der Chromatographie wurde die leichte Schicht aus 750 cm³ Toluol, 250 cm³ Petroläther, 400 cm³ Wasser und 600 cm³ Methanol verwendet. Es hat sich als unumgänglich erwiesen, diese Gemische jeden Tag frisch herzustellen, da sonst viel zu hohe Blindwerte resultierten.

Bereitung der Säule: Es wurde Säule Nr. 1²⁾ verwendet. 60 g gereinigtes Cellulosepulver wurden mit 30 cm³ schwerer Phase vermischt und auf einer Glasplatte mit breitem Spatel gut verrieben, bis alle Knöllchen gleichmässig verteilt waren, und in geeigneter Menge leichter Phase energisch aufgeschüttelt, in die Säule eingefüllt und gut eingepresst. Die Länge der Schicht betrug dann 26 cm. Dann wurde mehrere Tage mit der leichten Phase laufengelassen (Geschwindigkeit ca. 5 cm³ pro Std.), bis pro 10 cm³ Filtrat beim Eindampfen nicht mehr als 0,3 mg Rückstand verblieben. Es gelang nicht, diesen Blindwert noch weiter herabzudrücken. Länge der Schicht 26 cm, Durchmesser 26 mm.

Chromatographie: 324 mg der vereinigten Fraktionen 86—90 von Tab. 4 wurden in 2 cm³ schwerer Phase gelöst (eine kleine Menge Material blieb ungelöst) und mit 4 g gereinigtem Cellulosepulver vermischt auf die Säule aufgetragen. Der kleine ungelöste Rest wurde nun noch mit 1 cm³ schwerer Phase und 2 cm³ Cellulosepulver aufgenommen und ebenfalls auf die Säule gegeben. Nach Auflegen einer Filterpapierscheibe wurden noch 2 g Cellulosepulver mit 1 cm³ schwerer Phase vermischt aufgegeben, gut gepresst und mit der leichten Phase chromatographiert. Laufgeschwindigkeit 8—9 cm³ pro Std., Temp. 20°. Alle Fraktionen wurden im Vakuum bei 35° Badtemperatur eingedampft. Für die Fraktionen 34—44 wurde das Gemisch mit höherem Toluolzusatz verwendet und von Fraktion 45 an die leichte Phase eines Gemisches aus 10 Teilen reinem Benzol, 4 Teilen Wasser und 6 Teilen Methanol.

¹⁾ *I. E. Bush*, *Biochem. J.* **50**, 370 (1952).

²⁾ *H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein*, *Helv.* **36**, 357 (1952).

Tabelle 6.

Zweite Verteilungschromatographie von NN III.

Fraktions-Nr.	Volumen	Zeit in Std.	Eindampfrückstand		
			Gewicht in mg	Papierchromatogramm	Habitus bzw. präparatives Resultat
1	15	2,5	1,3		amorph braun
2	14,3	2	8,0		amorph braun
3	16	2	10,1		amorph braun
4	8	1	6,8		amorph braun
5	12	1,5	11,8		amorph braun
6	12	1,5	16,0	S 85	Körner (S 85 rein)
7	16	2	17,3		Körner (S 85 rein)
8	16	2	11,5		Spiesse
9	16	2	8,8		amorph + Spur krist.
10	15	2	7,0	S 85	amorph zunehmend heller
11	13,5	2,5	6,0		amorph zunehmend heller
12	15,3	2	7,4		amorph zunehmend heller
13	17	2	5,7		amorph zunehmend heller
14	21	2,5	6,0		amorph zunehmend heller
15	22	2,5	5,0	S 85 + S 36	amorph zunehmend heller
16	22	2,5	3,6		amorph zunehmend heller
17	22	2,5	3,0		amorph zunehmend heller
18	43	5	4,6		amorph zunehmend heller
19	42,5	5	4,4		
20	38	5	4,4	S 85	19—21 wenig Nadeln,
21	42	5	4,5		subl. 235—255°
22	42	5	3,9		Krist.
23	44	5	4,3		amorph + Spur krist.
24	44	5	3,8		amorph + Spur krist.
25	45	5	4,4	S 85 + wenig höher, polare Stoffe	Gallerte
26	46	5	3,6		Gallerte
27	47	5	3,9		amorph
28	41	5	4,6		wenig kugelige Drusen
29	41	5	2,2		amorph
30	46	5	3,3	Spur I + Spur XII (?)	amorph
31	46	5	2,1		amorph
32	40	5	2,8		krist. nach Impfen
33	30	5	4,6		krist. I
→					
34	35	5	6,0		krist. I
35	38	5	9,8	I + 3 weitere Stoffe	krist. I
36	40	5	11,0		krist. I
37	35	5	7,8		krist. I
38	28	5	4,9		krist. I

Tabelle 6 (Schluss).

Fraktions-Nr.	Volumen	Zeit in Std.	Eindampfrückstand			
			Gewicht in mg	Papierchromatogramm	Habitus bzw. präparatives Resultat	
39	30	5	4,0	I + 3 weitere Stoffe	krist. nach Impfen	
40	35	5	4,1		amorph	
41	37	5	4,4		amorph	
42	41	5	6,8		amorph	
43	36	5	4,4		amorph	
44	28	5	3,0		amorph	
→						
45	41	5	3,8		amorph	
46	45	5	9,0		amorph	
47	45	5	17,8		amorph	
48	48	5	14,1	amorph		
49	49	5	5,6	amorph		
50	29	5	3,6	amorph		
51	42	5	3,7	amorph		
52	44	5	3,6	amorph		
53	44	5	4,1	kugelige Drusen		
54	38	5	3,3	F. 220—235 ^o		
55	28	5	1,9	Spur krist.		
56	80	10	2,6	amorph		
57	100	14	1,2	amorph		

→ = Wechsel des Lösungsmittels.

Die in der vorletzten Kolonne bezeichneten Fraktionen wurden als Stichproben in Mengen von ca. 0,1 mg im Papierchromatogramm geprüft.

Die Fraktionen 6–7 gaben aus Aceton-Äther ca. 6 mg farblose Körner, nach Papierchromatogramm lag reine Subst. 85 vor (vgl. spätere Mitteilung).

Die Fraktionen 19–21 gaben aus Aceton-Äther ca. 3 mg farblose Nadeln, die beim Erhitzen bei ca. 235–255^o fortsublimierten, ohne zu schmelzen. UV.-Absorption: negativ, Reduktionsvermögen: negativ, NaOH-Reaktion: negativ¹⁾.

Die Kristalle aus den Fraktionen 53–54 erwiesen sich nach Papierchromatographie als unreine „Substanz C“.

Die Fraktionen 33–38 gaben aus Spur feuchtem Aceton mit Äther nach mehrstündigem Stehen bei 0^o spontan Kristalldrusen. Die Fraktionen 32 und 39 gaben in gleicher Weise nach Impfen gleiche Kristalle. Smp. 104–107^o, dann bei vorsichtigem weiteren Erhitzen langsam erstarrend mit zweitem Smp. bei 154–157^o. Nach Papierchromatogramm einheitliches Aldosteron. Die Hauptmenge war farblos. Die vereinigten Mutterlaugen (32–39) gaben wie oben nochmals eine reichliche Menge von Kristallen, die aber leicht gelblich gefärbt waren. Die Reinigung gelang am besten wie folgt: Die Rohkristalle wurden in Spur Aceton, das 10% Wasser enthielt, gelöst, mit ca. 5facher Menge Äther versetzt und durch eine kleine Schicht gepresster Watte (ca. 3 mm dick und 5 mm lang) filtriert, die vorher gut mit Aceton-Äther gewaschen war. Dann wurde gut mit demselben Lösungsmittel nachgewaschen. Das klare farblose Filtrat wurde auf ein kleines Volumen eingengt und vorsichtig mit Äther verdünnt. Nach Impfen setzte die Kristallisation sofort ein. Sie wurde durch mehrstündiges Stehen bei 0^o und allmählichen Zusatz von Äther

¹⁾ I. E. Bush, Biochem. J. 50, 376 (1952).

vollständig. Dann wurde mit wenig Aceton-Äther (ca. 1:10), reinem Äther und Pentan gewaschen. Ausbeute an Rohkristallen 22,5 mg. Diese wurden nochmals analog filtriert und umkristallisiert und gaben 21,8 mg analysenreines Material, Smp. wie oben. Die verbleibenden Mutterlaugen von Fr. 32—39 (27 mg) wurden mit Fr. 29—31 (7 mg) und 40—41 (8 mg) vereinigt. Dieses Material diente zum Abbau mit NaJO_4 (siehe folgende Mitteilung). Die amorphen Fraktionen 42—45 dienten ebenfalls zum Abbau mit NaJO_4 .

Trennung von Konzentrat aus NN V. *Erste Verteilungschromatographie*: Die 26,5 g Konzentrat wurden auf derselben Kieselsäure säule genau gleich chromatographiert wie NN III. In Tab. 7 wird nur der Teil des Chromatogramms wiedergegeben, der für die Gewinnung von Aldosteron wichtig war.

Tabelle 7.

Teil des ersten Verteilungschromatogramms von NN V¹⁾.

Frak-tions-Nr.	Lösungsmittel		Eindampf-rückstand		
	Art	Menge in cm ³	Menge in mg	Resultat nach Papier-chromatogramm	Prä-parativ
64	Pe-Be (40:60)	1240	215	Cortison + Subst. 56/2	Cortison
65	Pe-Be (38:62)	980	147		Cortison
66	Pe-Be (35:65)	1480	187		Cortison
67	Pe-Be (35:65)	1170	93		amorph
68	Pe-Be (35:65)	1185	75	Cortison, I, Y, höher polare	amorph
69	Pe-Be (35:65)	1145	68		amorph
70	Pe-Be (35:65)	1135	72	Cortison, I, Y, höher polare	amorph
71	Pe-Be (35:65)	1160	42		amorph
72	Pe-Be (35:65)	1010	82	I, Y, höher polare (UV.-)	amorph
73	Pe-Be (35:65)	1140	90		amorph
74	Pe-Be (30:70)	1150	90	I, Y, höher polare (UV.-)	amorph
75	Pe-Be (28:72)	1145	80		amorph
76	Pe-Be (28:72)	1140	59	wenig I, XIII, Y, höher polare (UV.-)	amorph
77	Pe-Be (27:73)	1140	70		Spur XIII
78	Pe-Be (25:75)	1140	74		XIII
79	Pe-Be (20:80)	1125	118		XIII
80	Pe-Be (20:80)	1120	131		XIII

Bei diesem Chromatogramm wurden präparativ bisher die folgenden Kristalle isoliert: Fr. 1—12 gaben Gemische, die noch nicht fertig getrennt sind.

Die Fraktionen 15—23 (total 1,37 g) gaben aus Aceton-Äther 163 mg reines 11-Dehydro-corticosteron, Smp. 176—179°.

Die Fraktionen 24—36 (total 1,71 g) gaben aus Aceton-Äther 222 mg reines Corticosteron, 47 mg Kristallgemisch sowie 18 mg Nadeldrusen (noch nicht identifiziert). Die Mutterlauge (1,4 g) kristallisierte noch weitgehend.

Die Fraktionen 38—43 gaben aus Methanol-Äther 36 mg krist. „Subst. R“.

Die Fraktionen 59—66 (total 1,476 g) gaben aus Aceton-Äther 80 mg krist. Cortison.

Die Fraktionen 78—81 (inkl. wenig Kristalle aus Fr. 77) gaben aus Aceton-Äther, Methanol-Äther und Wasser 135 mg analysenreines 17-Oxycorticosteron (XIII).

Die Fraktionen 82—84 gaben weitere 102 mg Kristalle von XIII, die aber bereits „Subst. D“ enthielten.

¹⁾ Abkürzungen wie bei Tab. 4.

Die weiteren Fraktionen gaben wieder die schwer trennbaren Gemische von C, D, E, V usw.

Auch die Fraktionen 44–58 gaben teilweise Kristalle, die aber noch nicht getrennt wurden.

Nach Abtrennung einer kleinen Menge Krist. XIII aus Fr. 77 wurde die Mutterlauge davon mit den amorphen Fraktionen 68–76 vereinigt (770 mg). Dieses braune Material wurde zur Vorreinigung in ca. 2–3 cm³ Aceton gelöst und mit ca. 100 cm³ abs. Äther (frisch dest.) versetzt, wobei eine geringe dunkelbraune, pulverige Fällung entstand, die abfiltriert und mit Aceton-Äther nachgewaschen wurde. Sie war frei von Aldosteron. Die klaren Lösungen wurden bei 30° eingedampft und gaben 675 mg hellbraunes Harz, das wieder an der Cellulosesäule chromatographiert wurde.

Zweite Chromatographie von NN V: Für diese diente eine gleiche Säule wie bei NN III, aber folgendes System: Benzol-Petroläther-Methanol-Wasser (1:1:1:1)¹⁾ wurde geschüttelt.

Zur Bereitung der Säule wurde trockene gereinigte Cellulose mit ihrem halben Gewicht an schwerer Phase imprägniert. Weiter wurde genau gleich verfahren wie dort. Zur Elution der ersten 11 Fraktionen diente die leichte Phase des obigen Gemisches, für die Fraktionen 12–25 die leichte Phase eines Gemisches aus 1,2 Benzol, 0,8 Petroläther, 1 Methanol und 1 Wasser, für die Fraktionen 26–42 die leichte Phase des Gemisches 1,4:0,6:1:1 und für die Fraktionen 43–50 die leichte Phase des Gemisches Benzol-Methanol-Wasser (1:1:1).

Die Fraktionen 28–37 (zusammen 167 mg) gaben aus feuchtem Aceton-Äther wie oben 35 mg krist. Aldosteron. Die farblosen Blättchen wurden bei ca. 115–125° opak und schmolzen erst bei 164–170°. Sie waren nach Papierchromatogramm mit dem Material aus NN III identisch.

Die Mutterlauge von 28–37 (132 mg) wurden mit den teilweise kristallinen Fraktionen 24–27 (34,5 mg) und Fr. 38 (28,5 mg) vereinigt. Dieses Material (195 mg) diente zum Abbau mit NaJO₄ (vgl. spätere Mitteilung). Auch die amorphen Fraktionen 39–42 wurden für sich mit NaJO₄ abgebaut, gaben aber nur Spuren Lacton Nr. 874.

Die Fraktionen 43–44 waren amorph. Die Fraktionen 45–48 gaben Kristalle, die noch nicht untersucht wurden. Und die letzten Fraktionen 49–50 gaben noch 10,3 mg amorphes Material.

Aldosteron: Die aus feuchtem Aceton-Äther erhaltenen Blättchen zeigten, wie erwähnt, entweder einen Doppel-Smp., ca. 104–108° und nach langsamem Wiedererstarren ca. 154–158°, oder sie wurden bei ca. 115–125° nur opak und schmolzen dann erst bei ca. 164–170°. Zur Drehung und Analyse wurde einige Std. im Exsikkator ohne Vakuum über CaCl₂ getrocknet. $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +145,0^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ($c = 0,9896$ in Aceton).

9,902 mg Subst. zu 1,0006 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_{\text{D}}^{23} = +1,435^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$ ²⁾

Für die wasserfreie Substanz berechnet sich daraus $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +152,2^{\circ} \pm 2^{\circ}$ in Aceton.

3,286 mg Subst. 9 Std. bei 0,02 Torr und 50° über P₂O₅ getrocknet und im Schweinchen eingewogen gaben 0,135 mg Gewichtsverlust. Das Gewicht blieb innerhalb der letzten Stunde innerst 0,002 mg konstant. (A. P.).

C₂₁H₂₈O₅·H₂O (378,45) Ber. H₂O 4,76% Gef. H₂O 4,11%

3,151 mg Subst. (trocken) gaben 8,046 mg CO₂ und 2,361 mg H₂O (A. P.)

Das Präparat war aschefrei, S-frei³⁾ und N-frei³⁾.

C₂₁H₃₀O₅ (362,45) Ber. C 69,58 H 8,34% Gef. C 69,68 H 8,39%

C₂₁H₂₈O₅ (360,43) Ber. „ 69,97 „ 7,84%

¹⁾ Verhältnis der Volumina.

²⁾ Auf zwei Apparaten, *Schmidt* und *Haensch*, sowie *Hilger*, *Standard-Polarimeter NK III* gemessen, wobei derselbe Wert erhalten wurde.

³⁾ Quantitative Bestimmung. Wir danken Herrn Dr. *H. Gysel*, *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel, auch hier für diese Prüfung, die mit 0,630 und 0,735 mg Kristallen ausgeführt wurde.

Das Hydrat kristallisiert besonders schön aus wenig Aceton-Wasser (vgl. Photo^a) in zu Drusen vereinigten flachen Nadeln oder langgestreckten Blättchen. Solche Kristalle zeigten bisher stets den Doppel-Smp. ca. 110–114° und dann ca. 153–157°, wobei aber bei langsamem Erhitzen bei der tieferen Temperatur nicht immer vollständiges Schmelzen eintrat. In solchen Fälle war der obere Smp. oft etwas höher, die letzten Reste verschwanden erst bei ca. 165°.

Absorptionsspektren siehe theoret. Teil und Farbreaktionen bei Bestimmung von Aldosteron.

21-Monoacetyl-aldosteron (Nr. 867) (II): 10,8 mg Aldosteronhydrat (rein) wurden bei 0,01 Torr und 40° gut getrocknet, in 80 mm³ abs. Pyridin gelöst, mit 53 mm³ 10-proz. Acetanhydridlösung in abs. Benzol versetzt und 17 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde im Vakuum bei 20° eingedampft, der Rückstand in 3–4 cm³ frisch dest. Chloroform-Äther (1:3) gelöst und je einmal mit je 0,3 cm³ 0,5-n. HCl, Wasser, 2-n. Soda-lösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Alle Waschlösungen passierten einen zweiten Scheidetrichter mit 2 cm³ Chloroform-Äther (1:3), wo sie nochmals ausgeschüttelt wurden. Die über Na₂SO₄ getrockneten Chloroform-Äther-Lösungen gaben beim Eindampfen 13,4 mg Rückstand. Aus wenig Chloroform (ca. 0,2 cm³) mit Äther (ca. 0,4 cm³) 6,3 mg reinste Kristalle, Smp. 198–199° aus den Mutterlaugen noch 1,1 mg vom. Smp. 191–195°. Die Mutterlaugen (6,0 mg) enthielten nach Papierchromatographie neben wenig Diacetyl-aldosteron (III) und weiterem II vor allem freies Aldosteron. Der Stoff kristallisiert auch aus Aceton-Äther sehr gut in flachen Nadeln, Smp. 198–199°, $[\alpha]_D^{24} = +121,7^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,7105$ in Chloroform).

7,11 mg Subst. zu 1,0006 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{24} = +0,865^\circ \pm 0,03^\circ$

Bestimmt im Polarimeter von *Schmidt & Haensch*. Im *Hilger*-Apparat wurde ein merklich höherer Wert ($+136,7^\circ \pm 3^\circ$) gefunden, doch halten wir den ersteren für genauer.

Im Papierchromatogramm (Propylenglykol-Toluol) wandert 21-Monoacetyl-aldosteron nur wenig rascher als 21-Acetyl-cortison.

Diacetyl-aldosteron (Nr. 869) (III): Präparativer Versuch, 3,8 mg Aldosteronhydrat (reinst) wurden in 60 mm³ abs. Pyridin und 40 mm³ Acetanhydrid gelöst (kurz auf 35° erwärmt) und 16 Std. bei 22° stehengelassen. Aufarbeitung wie bei II gab 4,6 mg Rohprodukt, das an 250 mg alkalifreiem Al₂O₃ chromatographisch in 28 Fraktionen zerlegt wurde.

Die Fraktionen 1–12 (eluiert mit Petroläther-Benzol [2:1], [1:1] und [1:2]) gaben nur wenig schmierigen Rückstand (= Verunreinigungen, verworfen).

Die Fraktionen 13–14 (eluiert mit reinem Benzol) hinterliessen gar keinen Rückstand.

Die Fraktionen 15–23 (eluiert mit reinem Benzol sowie Benzol-Äther [1:1]) gaben zusammen 2,7 mg Diacetyl-aldosteron (III) als farbloses Glas (Präparat Nr. 869).

Die Fraktionen 24–27 (ca. 1,2 mg eluiert mit reinem Äther sowie Äther-Äthylacetat (1:1)) gaben aus Spur Chloroform mit Äther noch 0,7 mg reines 21-Monoacetyl-aldosteron, Smp. 193–195°.

Diacetyl-aldosteron zeigte im Papierchromatogramm (Propylenglykol-Toluol) eine Wanderungsgeschwindigkeit etwa wie 11-Dehydro-corticosteron-acetat. Versuche, gut ausgebildete Kristalle zu erhalten, scheiterten. Beim Eindampfen des in wenig Methanol gelösten Materials ohne Wärmezufuhr im Vakuum, wobei Abkühlung vorübergehend auf ca. –10° eintrat, wurde der Rückstand kristallin erhalten. Er zeigte einen Smp. ca. 70°. IR.-Spektrum siehe theoret. Teil.

Verseifung mit KHC₃O₃: 0,832 mg Diacetyl-aldosteron (Nr. 869) (III) wurden in kleiner Ampulle in 130 mm³ reinstem Methanol gelöst, mit der Lösung von 1 mg KHC₃O₃ in 35 mm³ Wasser versetzt, im Vakuum eingeschmolzen, 48 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde im Vakuum bei 20° das Methanol entfernt und zweimal mit je 3 cm³ frisch dest. Chloroform-Äther (1:3) ausgeschüttelt. Die zweimal mit je 0,2 cm³ Wasser gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge hinterliessen beim Eindampfen im Vakuum 0,62 mg Rückstand. Aus Spur feuchtem Aceton-Äther (Impfen) ca. 0,3 mg reine Kristalle (flache Nadeln,

in Drusen), bei 121° nur sinternd, dann wieder ganz fest mit Smp. 166–168°. Nach Papierchromatogramm (beide Systeme und 5 Farbreaktionen) identisch mit Aldosteron.

Die Verseifung von 21-Monoacetyl-aldosteron gelang in gleicher Weise mit fast quantitativer Ausbeute.

Bestimmung der Acetylgruppen in Diacetyl-aldosteron durch Veresterung mit $\text{CH}_3^{14}\text{COOH}$: ^{14}C -Carboxyl-Acetanhydrid: 0,3 cm³ Acetanhydrid und 100 mg wasserfreies ^{14}C -Carboxyl-Na-Acetat¹⁾ mit 1 mC per mMol wurden im Einschlussrohr 6 Std. auf 140° erhitzt. Dann wurde das Acetanhydrid im Vakuum abdestilliert. Es wurde dabei ein ca. 60proz. Austausch erreicht, wie durch Messung der Aktivität von Acetylcortison festgestellt wurde, das mit 98% Ausbeute mit dieser Probe Acetanhydrid bereitet war.

Messmethoden: Die Radioaktivität wurde an praktisch unendlich dünnen Substanzproben (< 0,1 mg pro cm²) mit einem Zählrohr mit Glimmerfenster gemessen, unter Anwendung der üblichen Untergrund- und Koinzidenzkorrekturen.

Die UV.-Absorption wurde in einem Hilger-Uvispek-Spectrophotometer in Quarzzellen von 0,5 cm Schichtdicke und 1,5 cm³ Inhalt gemessen. Bei Acetylcortison wurde die Intensität bei 238 m μ und bei Aldosteron diejenige bei 240 m μ verwendet.

Die Tetrazoliumreaktion wurde in geringer Modifikation nach der Methode von Mader & Buck²⁾ ausgeführt. Die Absorptionen wurden nach 45 Min. bei 510 m μ gemessen, wofür der obige Apparat verwendet wurde. Der bei reinem Alkohol erhaltene Blindwert wurde abgezogen.

Verteilungschromatographie: Hiefür diente 15 g Kieselgur (Celite 545) mit 7,5 cm³ Methanol-Wasser (4:1) als ruhende Phase. Es wurde in eine Säule von 1 cm Durchmesser und 30 cm Länge gepackt. Benzol-Petroläther (Sdp. 80–100°) (1:1) diente als bewegliche Phase zur Abtrennung von Diacetyl-aldosteron und Benzol-Petroläther (2:1) für Acetylcortison. Zur Markierung der Front wurde den Steroiden eine Spur Sudanrot III zugesetzt. Nach Erscheinen der Front wurden mit einem mechanischen Fraktionensammler Fraktionen von je 3 cm³ abgetrennt. In beiden Fällen erschien die Hauptmenge des Acetylderivats ca. 24 cm³ nach der Front.

Ausführung: 2 mg Cortison in 0,1 cm³ abs. Pyridin und 0,05 cm³ ^{14}C -Carboxyl-acetanhydrid 15 Std. bei 20° stehengelassen. Dann im Vakuum bei 0,001 Torr getrocknet. Ein kleiner Teil wurde im Papierchromatogramm geprüft, ob völlige Acetylierung eingetreten sei. Es war weniger als 2% Cortison anwesend. Das verbliebene Material wurde in 1 cm³ beweglicher Phase gelöst, nach Zugabe von Sudanrot chromatographiert. In einem kleinen aliquoten Teil jeder Fraktion wurde die Radioaktivität bestimmt. Die Fraktion mit höchster Aktivität sowie die vorherige und die anschließende wurden verwendet. Diese 3 Fraktionen, welche die Hauptmenge des reinsten Acetats enthielten, wurden vereinigt und der Rückstand auf einer Glasplatte unter dem Glimmerfensterzähler ausgewertet. Dann wurde es abgespült und aliquote Teile zur Messung der UV.-Absorption sowie Formazanfärbung bei 510 m μ verwendet.

0,2 mg Aldosteron³⁾ in 0,1 cm³ abs. Pyridin und 0,05 cm³ ^{14}C -Carboxyl-acetanhydrid wurden genau wie oben behandelt.

Die Resultate wurden als Zahl der Stöße pro Absorptionseinheit berechnet. Da für beide Acetylderivate genau dasselbe Verfahren benützt wurde, ist das Verhältnis dieses Wertes massgebend für die relative Anzahl von Acetylgruppen in beiden Stoffen. Dieses Verfahren ist möglich, weil Diacetyl-aldosteron und Acetylcortison nahezu gleiche UV.-Absorption zeigen und auch die molekularen Extinktions-Koeffizienten der Formazanfarbstoffe fast gleich sind.

Resultate: Gefunden wurde als Verhältnis: Zahl der Stöße pro Einheit der opt. Dichte (E).

¹⁾ Erhalten vom *Radiochemical Centre*, Amersham.

²⁾ *W. J. Mader & R. R. Buck*, *Anal. Chem.* **24**, 666 (1952).

³⁾ Hiefür diente das früher^e) beschriebene amorphe Präparat.

Auf Grund der UV.-Messung:

Diacetyl-aldosteron = 1750 ± 150 (S.D.)¹⁾

Acetylcortison = 1012 ± 400

Relative Zahl der Acetylgruppen = $1,7 \pm 0,2$

Auf Grund des Reduktionsvermögens (Formazanbildung):

Diacetyl-aldosteron = 1948 ± 130

Acetylcortison = 1025 ± 20

Relative Zahl der Acetylgruppen = $1,90 \pm 0,1$

Obleich die auf Grund der UV.-Absorption erhaltenen Werte etwas tief sind und ziemlich schwanken, ist es doch deutlich, dass Aldosteron zwei Acetylgruppen enthalten muss. Es ist möglich, dass der zu tiefe Wert durch Spuren von UV.-absorbierenden Verunreinigungen hervorgerufen wird. Die Formazanmethode liefert nach unseren Erfahrungen fast stets etwas geringere Blindwerte.

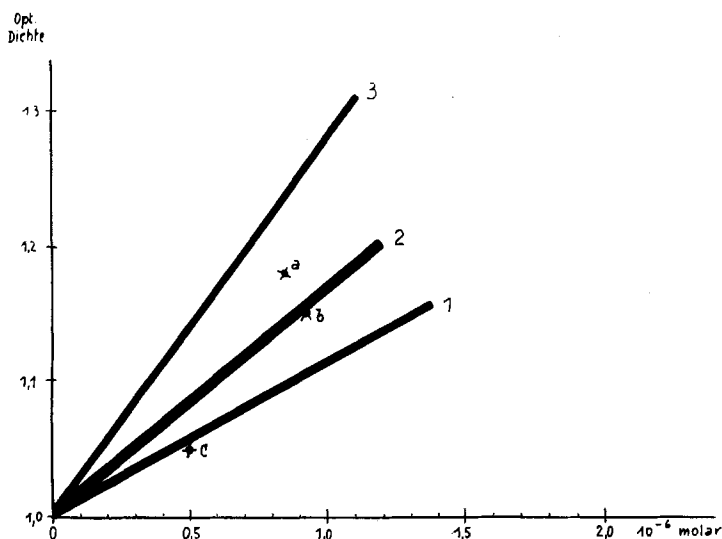


Fig. 11.

1 = Standardkurve für Mono-acetoxysteroide (Cortexon-acetat).

2 = Standardkurve für Di-acetoxysteroide (11 α , 21-Diacetoxy-17 α -oxy-pregnen-(4)-dion-(3, 20) und 3 α , 21-Diacetoxy-pregnanon-(11)).

3 = Standardkurve für Tri-acetoxysteroide (3 α , 12 α , 21-Triacetoxy-pregnanon-(20)).

a = Amorphes Diacetat III, roh, 375 γ , ber. auf Mol.-Gew. 444,5.

b = Amorphes Diacetat III, chromatographiert, 409 γ , ber. auf Mol.-Gew. 444,5.

c = Krist. Monoacetat II, 200 γ , ber. auf Mol.-Gew. 402,5.

Kolorimetrische Bestimmung²⁾ der Acetylgruppen im Monoacetyl- und Diacetyl-aldosteron: 200–500 γ Steroidester wurden in 1 cm³ abs. Methanol mit 2 cm³ frisch bereitetem Hydroxylaminreagens 5 Min. stehengelassen, sodann mit 1 cm³ verd. Salzsäure und 0,1 cm³ Ferrichloridlösung versetzt. Anschliessend wurde im Lumetron-Colorimeter bei 540 m μ die Transmission gegen eine Blindlösung gemessen. In Fig. 11

¹⁾ S.D. (Standard deviation) = mittlerer Fehler der Einzelmessung

$$= \sqrt{\frac{\sum (M-x)^2}{n-1}}$$

²⁾ A. Zaffaroni, Recent Progress in Hormone Research 8, 78 (Academic Press Inc., New York 1953).

sind die Standardkurven 1, 2 und 3 von Mono-, Di- und Tri-acetoxysteroiden in molarer Konzentration gegen die opt. Dichte wiedergegeben. Die gefundenen Werte, b für das amorphe, chromatographierte Acetat III und c für das krist. Acetat II, passen gut auf ein Diacetox- bzw. Monoacetox-Derivat.

Tabelle 8.

Verhalten von Aldosteron und 21-Monoacetylaldosteron gegenüber Na-Wismutat¹⁾.

Substanz	Menge in		Ablesung abzüglich Blindwert	Formaldehyd gef. in Mol·10 ⁻⁹
	γ	Mol·10 ⁻⁹		
Aldosteron (I)	4,43	11,7 ²⁾	0,217	11,9
	8,85	23,4 ²⁾	0,430	23,6
21-Monoacetyl-aldosteron (II) .	4	9,95	0	0
	8	19,9	0	0
Cortison (XII)	5	13,85	0,246	13,5
	10	27,77	0,492	27,0
Acetylcortison	8	19,8	0,003	0,1
	8	19,8	0,027	1,4

21, 21-Dimethoxy-progesteron (VII) aus VIII und aus XI: Für diesen und die folgenden Versuche bewährten sich folgende Bedingungen: 15 mg 21-Acetoxypregnadien-(4,16)-dion (VIII)³⁾ vom Smp. 147–149° wurden mit 1 cm³ 1-proz. HCl in Methanol 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Dann wurde mit 1 cm³ Wasser versetzt, das Methanol im Vakuum abdestilliert und mit Chloroform-Äther (1:4) ausgeschüttelt. Die mit wenig Na₂CO₃-Lösung und Wasser gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge wurden eingedampft. Der Rückstand (14 mg, langsam kristallisierend) wurde zur Hydrolyse von Ketalgruppen mit 1 cm³ 80-proz. Essigsäure 1 Min. leicht gekocht. Aufarbeitung wie oben gab 14 mg Rohprodukt. Aus Äther-Petroläther 8 mg 21, 21-Dimethoxyprogesteron (VII), Smp. 80–84°, Misch-Smp. mit authentischem Material bei 82–86°.

15 mg 21-Acetyl-17-oxy-cortexon („S-acetat“) wurden wie oben behandelt und gaben neben wenig 17-Oxycortexon 7 mg Dimethoxyprogesteron (VII). Aus 50 mg Cortison wurden in gleicher Weise 30 mg reines 11-Keto-21,21-dimethoxyprogesteron (X) vom Smp. 160–163° erhalten.

21, 21-Dimethoxy-11 β -oxy-progesteron (XIV): 60 mg 21-Acetyl-17-oxy-corticosteron wurden in 5 cm³ 1-proz. HCl in Methanol wie oben behandelt und gaben 61 mg neutrales Rohprodukt. Aus Aceton-Äther 22 mg 17-Oxy-corticosteron (XIII), Smp. 217–221°. Die Mutterlauge (39 mg) wurde an 1,2 g Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Benzol-Äther und reinem Äther eluierten Anteile (30 mg) gaben aus Aceton-Petroläther 27 mg farblose, viereckige Prismen, Smp. 133–134,5°, $[\alpha]_D^{25} = +219,0 \pm 2^\circ$ (c = 0,9497 in Chloroform).

9,63 mg Subst. zu 1,014 cm³, l = 1 dm; $\alpha_D^{23} = +2,08 \pm 0,02^\circ$

Zur Analyse Trocknung 3 Std. bei 60° über P₂O₅.

3,846 mg Subst. gaben 9,944 mg CO₂ und 3,095 mg H₂O (OAB)

C₂₃H₃₄O₅ (390,50) Ber. C 70,74 H 8,78% Gef. C 70,56 H 8,89%

¹⁾ Diese Versuche wurden von Herrn R. W. H. Edwards (London) ausgeführt, dem auch hier bestens dafür gedankt sei.

²⁾ Auf Monohydrat berechnet.

³⁾ Wir danken Herrn Dr. W. Voser, CIBA-Aktiengesellschaft, Basel, für dieses Präparat.

Die Substanz reduzierte alkalische Silberdiamminlösung nicht, gab aber mit konz. H_2SO_4 wie 17-Oxycorticosteron eine gelbe Lösung, die grün fluoreszierte.

Subst. Nr. 870 und Subst. Nr. 871 aus Aldosteron: 3 mg Aldosteronhydrat wurden mit 1 cm³ 1-proz. HCl in Methanol eine Stunde gekocht. Die Aufarbeitung wie oben gab 2,66 mg neutrales Rohprodukt. Auch nach Impfen mit VII, X und XIV trat keine Kristallisation ein. Es wurde an 100 mg alkalifreiem Al_2O_3 in 5 Fraktionen zerlegt.

Tabelle 9.

Frak-tions-Nr.	Lösungsmittel	Eindampfrückstand	
		Menge*)	Smp. der Rohkristalle und Habitus
1	Petroläther-Benzol (1:1)	Spur	194—210° Drusen
2	Benzol	++	185—210° Nadeln
3	Benzol-Äther (1:1)	+	
4	Äther	Spur	196—222° Nadeln
5	Äthylacetat	++	196—206° Drusen

*) ++ bedeutet ca. 0,5—1 mg, + bedeutet ca. 0,1—0,5 mg.

Die Eindampfrückstände waren zuerst amorph. Nach ca. 4 Wochen hatte sich in Fraktion 1 und in Fraktion 5 je eine Kristalldruse gebildet. Impfen der Fraktionen 2—4 mit dem Kristallkeim aus Fr. 1 gab aus Äther Kristalle. Sie waren im Vakuum unzersetzt sublimierbar. Daher wurden alle Kristalle aus den Fr. 1—4 vereinigt und im Molekular-kolben bei 0,03 Torr und 160° sublimiert. Das Sublimat gab aus Äther zuerst ca. 0,2 mg Subst. Nr. 870 in farblosen, zu Drusen vereinigten Nadeln, Smp. 216—222°, und aus der Mutterlauge noch Nadeln (Smp. 222—226°) und Drusen (Smp. 180—192°). Die vereinigten Kristallmutterlauge aus Fr. 1—4 wurden ebenfalls bei 0,03 Torr destilliert. Das Destillat gab noch etwas Kristalle, Smp. 168—172°.

Die in Fraktion 5 abgeschiedene Druse wurde mit Aceton-Äther, dann mit Äther gewaschen (Smp. 196—206°). Auch diese Rohkristalle liessen sich bei 0,03 Torr und ca. 165° sublimieren. Das Sublimat gab aus Äther durch Einengen eine aus gerade abgeschnittenen Stäbchen gebildete Druse, ca. 0,2 mg, Smp. 192—196° (Nr. 871). Daneben wurden wenige grobe Prismen, Smp. 194—200°, erhalten. Auch die Mutterlauge dieser Kristalle liess sich bei 0,03 Torr und 165° praktisch vollständig destillieren.

Einwirkung von HCl oder Essigsäure auf Aldosteron: Für die in Tab. 3 (theoret. Teil) erwähnten Versuche wurden je 20 γ Aldosteron in 5 cm³ des angegebenen Lösungsmittels gelöst. Nach beendeter Einwirkung wurde in den Versuchen b) und d) je 5 cm³ Wasser zugegeben und das Gemisch dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. In den anderen Versuchen wurde direkt ausgeschüttelt. Die klarzentrifugierten Chloroform-lösungen wurden im Vakuum eingedampft und der Rückstand auf Papier im B5-System von *Bush*¹⁾ chromatographiert. Alle durch die Säurewirkung entstandenen Produkte (ausser Spuren) wanderten in diesem System fast mit der Front, sie zeigten UV.-Absorption und gelbe Fluoreszenz, nach Erhitzen mit NaOH, aber kein oder schwaches Reduk-tionsvermögen. Die Summe der UV.-Absorptionen von unverändertem Aldosteron + Zer-setzungsprodukte entsprach jeweils ungefähr der eingesetzten Menge von 20 γ .

In vier weiteren Versuchen wurden noch je 20 γ Aldosteron wie folgt behandelt:

i) Gelöst in 0,25 cm³ Chloroform, 0,9 cm³ Methanol, 0,08 cm³ Wasser und 0,05 cm³ konz. HCl und 48 Std. bei 20° stehengelassen. Dann im Vakuum rasch eingedampft und Rückstand im B5-System chromatographiert.

k) Gelöst in 1 cm³ Methanol, 0,1 cm³ Wasser und 0,05 cm³ konz. HCl. Weiter wie i).

¹⁾ I. E. Bush, Biochem. J. 50, 370 (1952).

m) Gelöst in 1 cm³ Wasser, 0,05 cm³ konz. HCl, 4 Std. bei 20° stehengelassen. Dann zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt, Chloroformlösung im Vakuum eingedampft und Rückstand im B5-System chromatographiert.

n) Gelöst in 0,5 cm³ Wasser und 0,025 cm³ konz. HCl, weiter wie m).

Als Vergleich wurden je 20 γ Cortison (XII) entsprechend den Versuchen h), k) und m) angesetzt.

Nach der angegebenen Zeit war in allen vier Versuchen nur noch ca. 10% unverändertes Aldosteron nachweisbar.

Eigenschaften des Hauptproduktes, das mit HCl in Wasser entsteht: 0,45 mg Aldosteronhydrat wurden in 5 cm³ Wasser gelöst, mit 0,5 cm³ konz. HCl versetzt und 72 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand für papierchromatographische Trennungen verwendet. Zum Nachweis des Hauptproduktes war das B3-System von *Bush* (l. c.) gut brauchbar. Das oben genannte Reaktionsgemisch gab in diesem System ausser einem schwachen Fleck an der Startlinie (unverändertes Aldosteron) nur einen gut sichtbaren Hauptfleck; dessen Wanderungsgeschwindigkeit zwischen Acetylcortison und Acetyl-17-oxycortexon („S-Acetat“) betrug ca. 0,5 vom letzteren. Dieser Hauptfleck zeigte positive UV.-Absorption, aber kein Reduktionsvermögen. Er hemmte sogar die Bildung des hellblauen Hintergrundes, der mit alkalischer Blautetrazoliumlösung immer langsam entsteht, und war dann als weisser Fleck auf hellblauem Grund gut sichtbar. Auf Grund dieser Farbreaktionen und der genau gleichen Laufstrecke dürfte der Hauptfleck mit Nr. 871 identisch sein. Nr. 870 zeigte eine viel grössere Laufgeschwindigkeit (ca. 0,9 von Acetylcortexon), aber ebenfalls positive UV.-Absorption ohne Reduktionsvermögen.

Biologische Wirksamkeit von Aldosteron (I), 21-Monoacetyldosteron (II) und Diacetyldosteron (III) im ²⁴Na-⁴²K-Test nach *Simpson & Tait*¹⁾. Die Resultate von 6 ausgewogenen Versuchen mit steigenden Dosen von Cortexon und Aldosteron werden in Tab. 10 wiedergegeben.

Tabelle 10.

Verabreichte Dosis in γ pro Ratte		VA ²⁾	FL ³⁾	IP ⁴⁾
Cortexon	Aldosteron			
1,5; 3,0	0,015; 0,030	107	90—133	0,21
1,0; 2,0; 4,0	0,01; 0,02; 0,04	102	61—172	0,35
1,25; 2,50; 5,00	0,0125; 0,025; 0,050	108	69—174	0,32
1,25; 2,50; 5,00	0,0125; 0,025; 0,050	145	83—319	0,41
2,0; 4,0	0,01; 0,02; 0,04	117	81—162	0,21
1,0; 2,0; 4,0	0,01; 0,02; 0,04	146	90—301	0,42
arithmet. Mittel		121 \pm 8 ⁵⁾		0,32 \pm 0,037 ⁵⁾

21-Monoacetyldosteron (II) wurde mit 0,015 γ und 0,03 γ pro Ratte an je 8 Tieren analog geprüft, mit freiem Aldosteron zum Vergleich in denselben Dosen ebenfalls an je 8 Tieren. Es ergab sich, dass 1 γ freies Aldosteron 1,25 γ 21-Monoacetyldosteron entsprach (FL³⁾ (P=0,05) : (0,88—2,14). Das Verhältnis ist somit ähnlich bei Acetylcortexon und Cortexon (dort wurde 1,35 gefunden)¹⁾ sowie bei Acetylcortison und Cortison (1,14).

¹⁾ *S. A. Simpson & J. F. Tait*, *Endocrinol.* **50**, 150 (1952).

²⁾ Verhältnis der Wirksamkeit in γ Cortexon entspr. 1 γ Aldosteron.

³⁾ Fiducial Limits (P = 0,05) = Fiduzialgrenzen in γ Cortexon entspr. 1 γ Aldosteron.

⁴⁾ Index of precision = Präzisionsindex = $\frac{s}{b} = \frac{\text{Streuung}}{\text{Winkel der Regressionslinie}}$

⁵⁾ (SE) = Standard Error = mittlere Streuung = $\sqrt{\frac{d^2}{n(n-1)}}$

Diacetyldosteron wurde in Dosen von 0,3 und 0,6 γ an je 8 Ratten geprüft im Vergleich zu freiem Aldosteron in Dosen von 0,01; 0,02 und 0,04 γ an je 8 Ratten. Es war in beiden Dosen wirksam. 1 γ Aldosteron entsprach 136 γ Diacetyldosteron (FL¹) ($P = 0,05$):73—200). Dies stimmt gut mit dem von *Mason* u. Mitarb.^c) gefundenen Wert von 100 überein.

Die Mikroanalysen wurden im Mikrolabor der Organisch-chemischen Anstalt, Basel (Leitung *E. Thommen*) (OAB), bei Herrn *A. Peisker*, Brugg (A.P.) sowie im Mikrolabor der CIBA-Aktiengesellschaft (Leitung Dr. *H. Gysel*) (Gy) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Die Bestimmung von Aldosteron, seine Isolierung in Kristallen und seine Eigenschaften werden beschrieben.

The Middlesex Hospital Medical School, London W. 1,
Forschungslaboratorien der CIBA-Aktiengesellschaft, Basel,
Organisch-chemische Anstalt der Universität, Basel.

139. Die Konstitution des Aldosterons.

Über Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandte Stoffe.

92. Mitteilung²)³)

von S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw,
O. Schindler und T. Reichstein.

(26. IV. 54.)

Über die Isolierung^b)^c) und Konstitutionsermittlung^d) des Aldosterons^d)^e) ist in vorläufigen Mitteilungen berichtet worden. Einzelheiten über die Isolierung, die Eigenschaften und einige Derivate dieses Hormons sind in der 91. Mitteilung dieser Reihe angegeben worden. Hier wird über die Resultate der Konstitutionsermittlung eingehender berichtet.

Die Analyse^e) des Aldosterons passte auf die Formel $C_{21}H_{30}O_5 \pm H_2$, wobei sich $C_{21}H_{28}O_5$ durch Abbau als richtig erwies⁴). Aldosteron zeigte im UV. die für Δ^4 -3-Ketosteroide typische Absorption^a)^b)^e). Ausserdem besass es stark reduzierende Eigenschaften und lieferte mit Na-Wismutat ein Mol Formaldehyd^a)^e), was für das Vorliegen einer Ketolgruppe $-CO-CH_2OH$ spricht. Die *Porter-Silber-Reaktion*⁵) fiel

¹) Fiducial Limits ($P = 0,05$) = Fiduzialgrenzen in γ Cortexon entspr. 1 γ Aldosteron.

²) 91. Mitt.^e).

³) Die mit Buchstaben bezeichneten Fussnoten siehe bei den Formeln.

⁴) Wegen der Kostbarkeit des Materials konnten von den hier genannten Stoffen nur wenige der Verbrennungsanalyse unterzogen werden. Aus demselben Grunde musste von Doppelbestimmungen abgesehen werden.

⁵) *C. C. Porter & R. H. Silber*, J. Biol. Chem. **185**, 201 (1950).