

side chain, the structure of which has been established by synthesis. Pharmacological tests revealed that the introduction of a carbonyl or hydroxy group in position 10 of the *dextro* series of morphinans causes a marked decrease in the antitussive activity. The corresponding derivatives of the *laevo* series have almost entirely lost their analgesic activity.

Wissenschaftliche Laboratorien der
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel.

239. Isolierung und Konstitutionsermittlung weiterer Pregnanverbindungen aus Nebennieren.

Über Steroide, 144. Mitteilung¹⁾

von **R. Neher** und **A. Wettstein**.

(13. X. 56.)

Bis heute sind nicht weniger als 26 Pregnanderivate aus Nebennieren gewonnen worden²⁾, darunter die genuinen Hormone Progesteron, Hydrocortison, Cortison, Corticosteron, 11-Dehydro-corticosteron, Cortexon, 17 α -Hydroxy-cortexon und Aldosteron. Die früheren Arbeiten zur Isolierung von Aldosteron aus Nebennieren³⁾ weiterführend, haben wir nun die zahlreichen bei uns vorhandenen amorphen Steroid-Fractionen systematisch auf die Anwesenheit weiterer Verbindungen geprüft, vorerst besonders solcher mit stärkerer Polarität als Cortison.

Im Folgenden berichten wir⁴⁾ über die Isolierung von 9 Pregnanderivaten, deren Konstitution aufgeklärt werden konnte. Vier derselben erwiesen sich als bekannte Steroide, die bisher nicht aus den betreffenden Nebennieren erhalten worden waren, 5 stellen unseres Wissens neue Verbindungen dar. Schliesslich beschreiben wir die von uns früher erwähnte⁵⁾ Isolierung von Δ^4 -11 β -Hydroxy-androstendion-(3,17) aus Nebennieren. Mit den neuerdings gewonnenen Substanzen steigt die Gesamtzahl der aus Nebennieren isolierten Steroide auf 41, diejenige der Pregnanderivate auf 34.

Es standen Fractionen aus 7 Aufarbeitungen^{5a)} von total 5,17 Tonnen tiefgefrorenen Rinder- bzw. Schweine-Nebennieren des Han-

¹⁾ 143. Mitt. s. *J. Heer & K. Hoffmann*, *Helv.* **39**, 1820 (1956).

²⁾ Vgl. *A. Wettstein*, *Verhandl. deutsch. Ges. innere Med.* **62**, 214 (1956).

³⁾ *S. A. Simpson, J. F. Tail, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw & T. Reichstein*, *Experientia* **9**, 333 (1953); dieselben Autoren mit *O. Schindler*, *Helv.* **37**, 1163 (1954).

⁴⁾ Vorläufige Mitt. s. *A. Wettstein*, *Verhandl. Schweiz. Naturforsch. Ges.*, 136. Jahresversamml. vom 22. IX. 56 in Basel, Vortrag im Druck.

⁵⁾ *A. Wettstein & G. Anner*, *Experientia* **10**, 397 (1954).

^{5a)} Diese Extraktionen wurden in der Pharma-Betriebsabteilung der CIBA AG. ausgeführt, wofür wir den Herren Dr. *F. Locher* und Dr. *M. Sutter* bestens danken.

dels zur Verfügung, ferner Fraktionen aus vereinigten Aufarbeitungen von Homogenaten aus insges. etwa 100 kg frischen Rinder- und Schweine-Nebennieren, welche mit Cortexon inkubiert worden waren⁶⁾. Die Fraktionen stammten teils von der 1. Verteilungschromatographie an Kieselgur, wie sie bei der Isolierung von Aldosteron angewandt wurde³⁾, teils von weiteren Chromatographien an Silicagel oder Cellulose. Die erste Sichtung erfolgte durch gründliche papierchromatographische Analyse⁷⁾, die weitere Anreicherung der interessant erscheinenden Anteile durch Silicagel- und präparative Papierchromatographie⁷⁾, wobei alle Reinigungsoperationen laufend durch analytische Papierchromatogramme verfolgt wurden. Die anfallenden Mengen der Reinsubstanzen waren im Allgemeinen sehr gering, d. h. etwa $1/10$ oder weniger des Aldosteron-Gehaltes.

Solange auf der Suche nach neuen Nebennieren-Stoffen diese nicht in kristallisierter Form anfielen, war es anfangs oft schwierig zu beurteilen, ob tatsächlich neue oder bereits bekannte Verbindungen vorlagen. Durch Kombination ausgewählter Lösungsmittelsysteme und Indikatoren bei der Papierchromatographie gelang aber die Identifizierung von Mikromengen aller bisher in den Nebennieren entdeckten Steroide und einigen weiteren Verbindungen ähnlicher Polarität mit einem hohen Grad von Wahrscheinlichkeit, ohne dass zunächst Schmelzpunkte, IR.-Spektren oder andere Kriterien benötigt wurden. Es steht ausser Frage, dass diese für eine vollständige Identifizierung, wie sie jeweils mit den Reinsubstanzen vorgenommen wurde, unumgänglich sind.

Als papierchromatographische Systeme wurden diejenigen von Zaffaroni⁸⁾, von Bush⁹⁾ und von Eberlein & Bongiovanni¹⁰⁾ bzw. Varianten davon in der bei uns üblichen, absteigenden Ausführungsform⁷⁾ verwendet. Der Nachweis der einzelnen relativ stark polaren Nebennieren-Substanzen erfolgte durch ihre UV.-Absorption im Bereiche von 240μ , durch ihr Reduktionsvermögen gegenüber Blautetrazolium³⁾¹¹⁾ oder Silberdiammin¹²⁾, ferner durch die Fluoreszenzen nach Natronlauge-⁹⁾ und Phosphorsäure-Behandlung⁷⁾¹³⁾. Da die üblichen Rf-Werte trotz formal gleicher Ausführung von Ort zu Ort

⁶⁾ a) A. Wettstein, F. W. Kahnt & R. Neher, CIBA Found. Colloquia on Endocrinol. **8**, 170 (1955); b) F. W. Kahnt, R. Neher & A. Wettstein, Helv. **38**, 1237 (1955).

⁷⁾ R. Neher & A. Wettstein, J. Clin. Investig. **35**, 800 (1956); E. von Arx & R. Neher, Helv. **39**, 1664 (1956).

⁸⁾ A. Zaffaroni, Recent Progr. Hormone Res. **8**, 51 (1953); R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann, J. biol. Chemistry **188**, 763 (1951).

⁹⁾ I. E. Bush, Brit. Med. Bull. **10**, 229 (1954); Biochem. J. **50**, 370 (1952).

¹⁰⁾ W. R. Eberlein & A. M. Bongiovanni, Arch. Biochemistry **59**, 90 (1955).

¹¹⁾ 3,3-Dianisol-bis-4,4'-(3,5-diphenyl)-tetrazolium-chlorid, W. J. Mader & R. R. Buck, Anal. Chemistry **24**, 666 (1952).

¹²⁾ A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, Sci. **111**, 6 (1950).

¹³⁾ R. Neher & A. Wettstein, Helv. **34**, 2278 (1951).

Tabelle 1.
R_M-Werte.

Verbindung	Systeme (vgl. exper. Teil)						Indikatoren				
	F/Be	P/T	F/CHCl ₃	B ₅	C	C ^{40°}	E ₂ B ^{40°}	RV	UV	NaOH	H ₃ PO ₄
<i>Reichstein's A</i>		0,04	0,04	0,00	0,10	0,13	0,67	-	-	-	rot
A ₃₂ (IV)	0,13	0,19	0,36	0,20	0,31	0,35	0,64	+	+	blaugrün	rot
V		0,20	0,22	0,33	0,42	0,57	1,12	+	-	-	violett-orange
E		0,25	0,48	0,20	0,23	0,32	0,68	-	+	gelb	gelb
TH-M (3α, 5β)		0,29	0,28	0,38	0,52	0,63	1,51	+	-	-	violett-orange
C		0,40	0,40	0,55	0,65	0,82	1,37	+	-	-	gelblich-orange-lila
D		0,40	0,79	0,70	0,60	0,77	1,78	+	-	-	hellblau
TH-Cortison (3α, 5β)		0,42	1,01	0,89	0,81	0,88	1,92	+	-	-	blau
K		0,47	0,46	(1,03)	(1,12)	1,88		-	-	-	(rot)
A ₃₃ (II)	0,31	0,49	0,58	0,44	0,53	0,59	0,90	+	+	gelb	rötlich-orange
A ₂₃ (X)	0,30	0,66	0,50	0,31	0,35	0,40	0,41	+	+	gelb	-
A ₁ (XVI)	0,60	0,69	1,37	0,80	0,64	0,77	0,83	+	+	gelb-(grün)	blau
U	0,60	0,84	1,48	0,67	0,50	0,58	0,79	-	+	gelb	-
A ₃₉ (XXII)	0,59	0,95	1,59	0,72	0,46	0,58	0,72	-	+	gelb	-
M (Hydrocortison)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	+	+	gelb	gelb-grün
A ₃₄ (XV)		1,87	1,62	0,91	0,70	0,75	0,49	+	+	gelb	blau
P		2,34	2,50	2,87	2,02	1,63	2,51	+	-	-	rotviolett
T		2,41	2,94	1,89	1,34	1,39	1,40	-	+	gelb	-

A ₄₂ (XXXVII)	2,46	2,75	2,76	1,81	1,67	1,39	+	+	gelb	–
Cortison	1,95	2,39	1,91	1,60	1,38	1,32	+	+	gelb	blau
Aldosteron	1,18	2,27	1,52	1,03	0,97	0,73	+	+	gelb	–
DH-M (5 α) = A ₃₅ (VII)	2,67	1,61	1,86	1,58	1,43	1,40	+	–	–	orange-lila
DH-M (5 β)	2,70	1,43	1,99	1,63	1,51	1,49	+	–	–	orange-lila
TH-S (3 α , 5 β)	2,80	2,79	2,81	1,99	1,81	2,71	+	–	–	–
R	4,00	2,63	2,64	1,87	1,67	1,61	+	–	–	(blau-violett)
A ₁₉ (VI)	4,11	2,79	2,34	1,71	1,40	1,24	+	+	blau-grün	–
DH-Cortison (5 β)	5,31	2,84	2,83	2,04	1,73	1,66	+	–	–	blau
TH-Corticosteron (3 α , 5 β)	5,43	2,60	3,24	2,21	2,01	1,62	+	–	–	–
DH-Cortison (5 α)	5,47	3,11	2,80	2,07	1,71	1,60	+	–	–	blau
N	> 6,00	3,71	3,19	2,23	1,74	1,52	+	–	–	–
TH-11-dehydro-corticosteron (3 α , 5 β)	> 6,00	3,75	3,71	2,28	1,92	2,18	+	–	–	–
Corticosteron (XII)		3,51		2,62			+	+	gelb	gelb-grün
epi-M (11 α -Hydrocortison)	0,20	0,46	0,24	0,25	0,31	0,81	+	+	gelb	grün
epi-Corticosteron (11 α)	5,07	3,17	2,15	1,42	1,37	1,36	+	+	gelb	grün

Einzelne Buchstaben ohne Zahlenangaben bezeichnen Nebenmierensteroide nach Reichstein's Nomenklatur (vgl. T. Reichstein & C. W. Shoppee, Vitamins & Hormones I, 352 (1943)). A 1–A 44 bezeichnen in dieser Arbeit beschriebene Verbindungen, die weiterhin durch die römischen Zahlen ihrer Formelbilder gekennzeichnet sind. Alle Lösungsmittel-Systeme wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 22° angewandt.

- TH = Tetrahydro-
- DH = Dihydro-
- RV = Reduktionsvermögen
- UV = UV-Absorption
- NaOH = NaOH-Fluoreszenz (UV.)
- H₃PO₄ = Phosphorsäurefluoreszenz (UV.)

oft beträchtlich variieren, stellten wir auf die relativen Wander-
geschwindigkeiten gegenüber bekannten Corticosteroiden, wie z.B.
Hydrocortison (*Reichstein's* Substanz M), ab (R_M -Werte). Die einzel-
nen Substanzen wurden dann charakterisiert durch ihre Stellung in
Chromatogrammen unter Verwendung von 6–7 verschiedenen Lö-
sungsmittel-Systemen, d.h. durch 6–7 R_M -Werte und durch das Er-
gebnis der genannten Nachweis-Reaktionen (s. Tab. 1).

Zur raschen Identifizierung und übersichtlichen Anordnung be-
nutzen wir mehrere graphische Schemata, welche die Nebennieren-
Verbindungen gruppenweise gemäss ihrem Reduktions- und UV.-
Absorptionsvermögen umfassen. Darin sind die Kurven aufgezeichnet,
welche sich ergeben, wenn man die R_M -Werte jeder einzelnen Verbin-
dung in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen miteinander ver-
bindet. Auf diese Weise lässt sich sofort ablesen, welches System oder
welche nacheinander angewandten Systeme sich am besten für die
Trennung bestimmter Substanzen oder Substanzgruppen eignen. Es
sind dies diejenigen Systeme, die möglichst grosse Unterschiede in

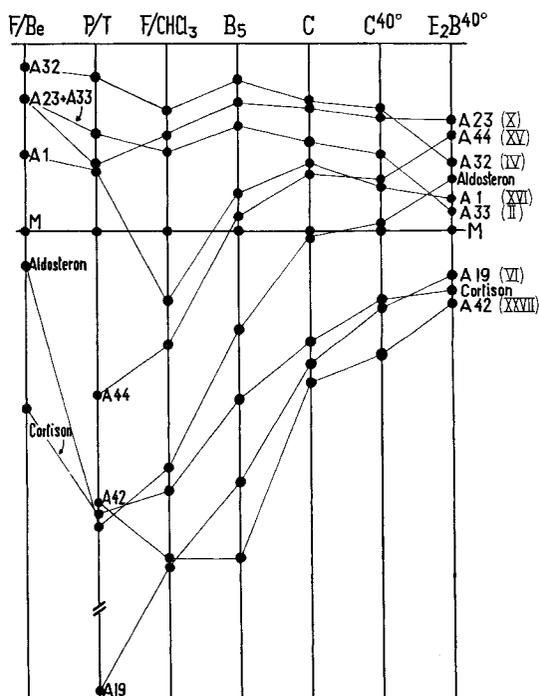


Fig. 1.

Relative Stellung polarer, reduzierender und UV.-absorbierender Nebennieren-Steroide bezogen auf Hydrocortison (M) = 1,0 bei der absteigenden Papierchromatographie mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen (vgl. Tab. 1 und experiment. Teil). A 1—A 44 bezeichnen in dieser Arbeit beschriebene Verbindungen, die weiterhin durch die römischen Zahlen ihrer Formelbilder gekennzeichnet sind.

den R_M -Werten gewährleisten. Wegen Platzmangel wird hier nur ein solches Schema in Fig. 1 beispielsweise wiedergegeben.

Als wertvoll erwies sich auch der Vergleich der relativen Wandereschwindigkeit einer unbekanntes Substanz in freier und in acetylierter Form gegenüber entsprechenden bekannten Verbindungen (s. Tab. 2). Auf diese Weise konnte oft rasch beurteilt werden, ob ein Acetoxy-, ein Hydroxy-acetoxy- oder ein Polyacetoxy-steroid vorlag, was Folgerungen auf die Stellung der Hydroxylgruppen zuließ, insbes. in Kombination mit Farbreaktionen (z. B. nach *Porter-Silber*)¹⁴).

Tabelle 2.
 $R_{Co-ac.}$ -Werte*)

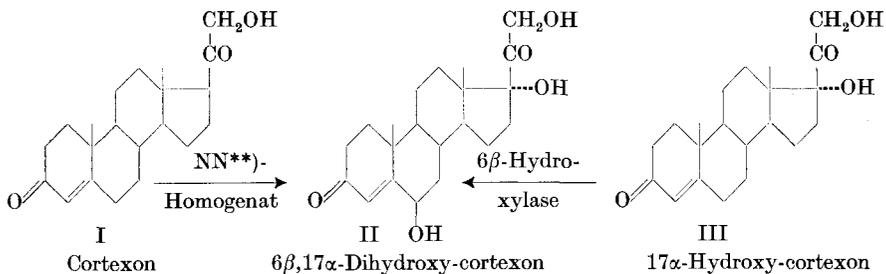
Verbindung	Systeme				
	P/T	B_3	F/Be- $CHCl_3$ 1:1	BL_1	F/Cy 40°
Cortison-acetat (XXV)	0,42				
S-Acetat	0,93				
Corticosteron-acetat	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11-Dehydro-corticosteron-acetat	1,39				1,64
Cortexon-acetat	1,54				
Cortexon (I)	1,20				
Aldosteron-21-monoacetat	0,51				
Aldosteron-diacetat	1,27				
A_{23} -Diacetat (XIII)	0,98				
6 β -Hydroxy-11-dehydro-corticosteron- diacetat (A_{44} -di-acetat) (XIV)	1,44	0,70			
A_{32} -Diacetat (V)	0,91				
A_{19} -21-Monoacetat	0,56				
A_{19} -19-Monoacetat	1,22				
A_{19} -Diacetat	1,53				
A_1 -Diacetat (XVIII)	0,84				
A_1 -Dibenzoat (XVII)	1,56	2,07			
19-Hydroxy-11-dehydro-corticosteron- diacetat (XIX)	1,43				
14 α ,19-Dihydroxycortexon-diacetat (XXI)	0,84				
A_{39} -21-Monoacetat (XXIV)	0,16		0,47	0,26	
A_{39} -Diacetat (XXIII)	0,82		0,92	0,76	
U-Diacetat	0,80			0,78	
A_{42} -Diacetat (XXVIII)	1,39				
D-Diacetat	1,17				1,70
C-Diacetat	0,98				
V-Diacetat	0,98				

*) Co-ac. = Corticosteronacetat

¹⁴) C. C. Porter & R. H. Silber, J. biol. Chemistry **185**, 201 (1950).

Mit den genannten Methoden isolierten wir erstmals aus Nebennieren die folgenden an sich bekannten Verbindungen:

$6\beta,17\alpha$ -Dihydroxy-cortexon (II), intern A 33: Die Isolierung erfolgte aus Rinder- und Schweine-Nebennierenhomogenaten, welche mit Cortexon (I) inkubiert⁶⁾ worden waren! Seine Eigenschaften, insbes. die UV.-Absorption bei $238\text{ m}\mu$, das IR.-Spektrum mit typischen Banden für Hydroxyl-, 20-Keto- und Δ^4 -3-Ketogruppen, und der positive Ausfall der *Porter-Silber*-Reaktion, wiesen auf ein Dihydroxy-cortexon hin mit Hydroxylgruppen in Stellung 17 und eventuell 6. In der Tat ergab der Vergleich mit dem bekannten $6\beta,17\alpha$ -Dihydroxy-cortexon (II)¹⁵⁾, erhalten bei der 6β -Hydroxylierung von 17α -Hydroxy-cortexon (III, *Reichstein's* Substanz S) mit *Trichothecium roseum*¹⁶⁾, Übereinstimmung im Misch-Smp., IR.-Spektrum und papierchromatographischen Verhalten.



**) NN = Nebennieren.

$17\alpha,19$ -Dihydroxy-cortexon (IV), intern A 32, wurde aus Rinder- sowie Schweine-Nebennieren gewonnen. Sein IR.-Spektrum (OH, 20-CO und Δ^4 -3-CO), die blaugrüne Natronlauge-Fluoreszenz, die positive *Porter-Silber*-Reaktion und die Bildung eines Diacetats V (Analyse) wiesen auf $17\alpha,19$ -Dihydroxy-cortexon (IV) hin. Diese Verbindung ist kürzlich bei der Perfusion von Progesteron in Blut durch Rinder-Nebennieren erhalten worden¹⁷⁾. Die dort angegebenen Eigenschaften stimmen mit denjenigen unserer Verbindung gut überein. Eine authentische Probe¹⁸⁾ zeigte Übereinstimmung im Misch-Smp. und im papierchromatographischen Verhalten.

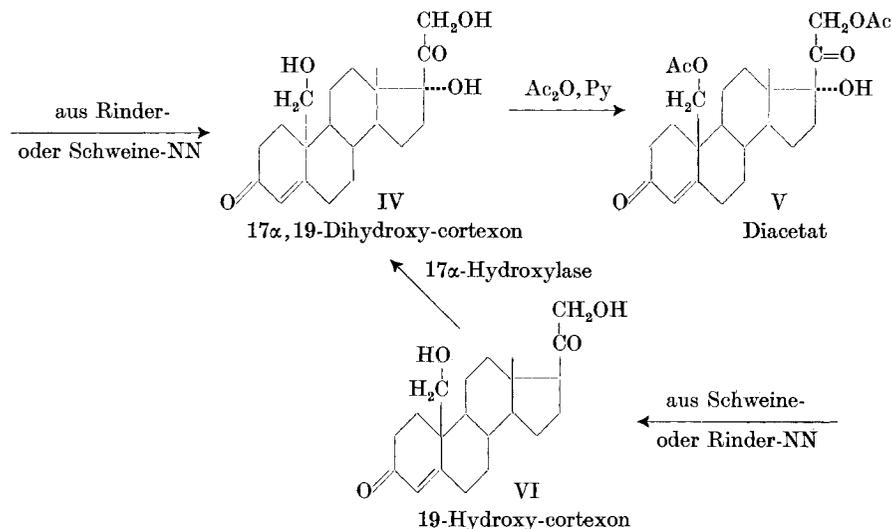
¹⁵⁾ D. H. Peterson, S. H. Eppstein, P. D. Meister, B. J. Magerlein, H. C. Murray, H. M. Leigh, A. Weintraub & L. M. Reineke, J. Amer. chem. Soc. **75**, 412 (1953); K. Florey & M. Ehrenstein, J. org. Chemistry **19**, 1331 (1954).

¹⁶⁾ Ch. Meystre, E. Vischer & A. Wettstein, Helv. **37**, 1548 (1954).

¹⁷⁾ H. Levy & St. Kushinsky, Arch. Biochemistry **55**, 290 (1955); *ibid.* **58**, 245 (1955).

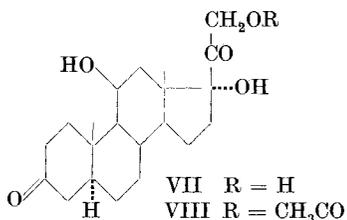
¹⁸⁾ Herrn Dr. Levy danken wir auch an dieser Stelle für die Überlassung der Vergleichssubstanz bestens.

Schliesslich gelang uns die mikrobiologische Hydroxylierung von 19-Hydroxy-cortexon (VI)^{6b)} mittels *Trichothecium roseum*¹⁶⁾ zu identischem 17 α ,19-Dihydroxy-cortexon (IV).



19-Hydroxy-cortexon (VI), intern A 19, fiel uns erstmals aus Schweine-Nebennieren an. Es ist früher von *Mattox* aus Rinder-Nebennieren isoliert worden¹⁹⁾, ferner von uns^{6b)} aus Nebennieren-Homogenaten nach Inkubation von Cortexon. Ganz kürzlich konnten wir nun VI ebenfalls aus Rinder-Nebennieren gewinnen.

11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-allopregnan-3,20-dion (5 α -Dihydrohydrocortison; VII), intern A 35, wurde aus Rinder-Nebennieren isoliert. Alle seine Eigenschaften stimmten mit denjenigen von synthetischem VII überein. Keine Erniedrigung des Misch-Smp. Auch die 21-Monoacetate VIII²⁰⁾ wurden im Misch-Smp. verglichen, ebenso im IR.-Spektrum.



An neuen Verbindungen wurden isoliert und in ihrer Konstitution aufgeklärt:

6 β -Hydroxy-corticosteron (X), intern A 23: Die Verbindung wurde aus Schweine-Nebennieren isoliert und in Rinder-Neben-

¹⁹⁾ R. Mattox, Proc. Staff Meet. Mayo Clinic **30**, 9 (1955).

²⁰⁾ J. Pataki, G. Rosenkranz & C. Djerassi, J. biol. Chemistry **195**, 751 (1952).

nieren nachgewiesen. Ferner entstand sie bei der aeroben Inkubation von Cortexon mit Homogenat von Rinder-Nebennieren^{6a}).

Von ihren Eigenschaften sind besonders bemerkenswert das Reduktionsvermögen, die UV.-Absorption bei der kurzen Wellenlänge von 237 m μ , das Ausbleiben der *Porter-Silber*-Reaktion, die Bildung eines Acetates XIII mit freier Hydroxylgruppe. Da die neue Substanz 5 Sauerstoffatome enthielt, war danach das Vorliegen eines Dihydroxycortexon mit Hydroxylgruppen in 6- und vielleicht 11 β -Stellung wahrscheinlich. Ein weiterer Hinweis auf die 6-Stellung ergab sich aus dem Verhalten gegen siedende, wässrig-methanolische Kaliumhydrogencarbonat-Lösung: Es bildete sich, analog wie beim 6 β -Hydroxycortexon (IX)²¹), ein Umlagerungsprodukt XI von schwächerer Polarität, das noch reduzierte, im UV. nicht mehr absorbierte, aber trotzdem gelbe Natronlauge-Fluoreszenz zeigte.

Der eindeutige Beweis, dass die neue Substanz das 6 β -Hydroxycorticosteron (X) darstellt, wurde dadurch erbracht, dass es gelang, diese Verbindung auf mikrobiologischem Wege einerseits durch 11 β -Hydroxylierung (*Curvularia lunata*)²²) von 6 β -Hydroxycortexon (IX), andererseits durch 6 β -Hydroxylierung (*Trichothecium roseum*)¹⁶) von Corticosteron (XII) herzustellen. Die Identität wurde durch die Smp., Misch-Smp. und das papierchromatographische Verhalten der freien Verbindungen und der Acetate XIII bewiesen, ferner durch die IR.-Spektren der letzteren.

Von biologischen Eigenschaften zeigte X bisher lediglich eine schwache Na-retinierende Wirkung.

Bei der Einwirkung von Chromtrioxyd in Pyridin ging das Diacetat XIII in 6 β -Hydroxy-11-dehydro-corticosteron-diacetat (XIV) über. Dieses färbt sich am Licht gelb und wird nach Aufbewahren im Dunkeln wieder farblos, eine Eigenschaft, die *Ehrenstein*²¹) schon am Diacetat des 6 β -Hydroxycortexon beobachtet hat.

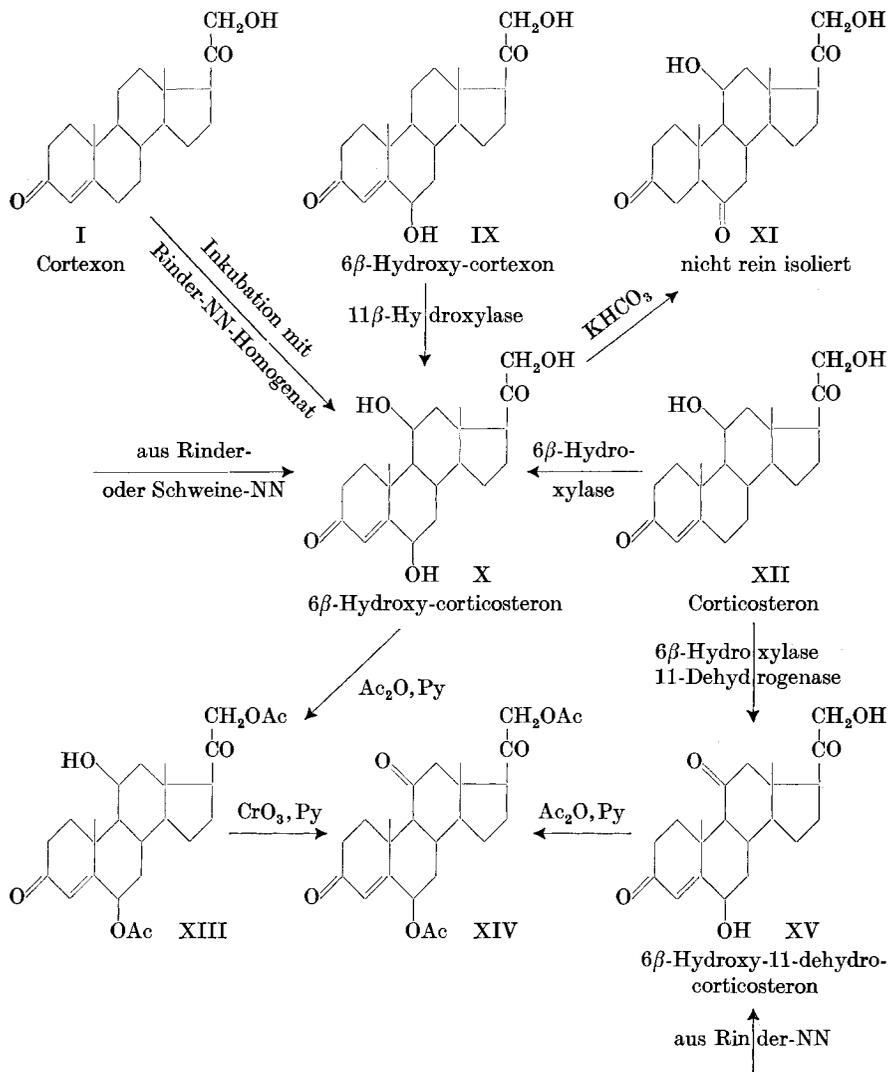
6 β -Hydroxy-11-dehydro-corticosteron (XV), intern A 44: Isoliert aus Rinder-Nebennieren. Es zeigte Reduktionsvermögen, UV.-Absorption und negative *Porter-Silber*-Reaktion, ähnlich wie Subst. X. Bei der Acetylierung ging es in eine Verbindung über, die sich nach Smp., Misch-Smp. und IR.-Spektrum als identisch mit XIV aus X erwies. Damit ist die Konstitution XV des neuen Nebennieren-Steroids gesichert.

XV fiel schliesslich neben X bei der Inkubation von Corticosteron mit *Trichothecium roseum*¹⁶) an, d. h. unter 6 β -Hydroxylierung und 11-Dehydrierung. Auch das so dargestellte XV lieferte ein Diacetat XIV, das identisch war mit dem aus X erhaltenen sowie mit dem aus XV aus Nebennieren gewonnenen Präparat.

²¹) P. Th. Herzig & M. Ehrenstein, J. org. Chemistry **16**, 1050 (1951).

²²) G. M. Shull & D. A. Kita, J. Amer. chem. Soc. **77**, 763 (1955).

19-Hydroxy-corticosteron (XVI), intern A 1: Diese Verbindung wurde aus Rinder- und Schweine-Nebennieren und bei der



aeroben Inkubation von Cortexon⁶⁾, auch von radioaktivem 21-¹⁴C-Cortexon²³⁾ mit Rinder- oder Schweine-Nebennieren-Homogenaten isoliert. Schliesslich wurde sie durch Behandlung von 19-Hydroxy-cortexon (VI) (vgl. vorne) mit einer Kultur von *Curvularia lunata*²²⁾ gewonnen. Sie zeigte die für Δ^4 -3-Ketone typische UV.-Absorption, Reduktionsvermögen, gegenüber der Norm leicht abweichende gelb-

²³⁾ F. W. Kahnt, R. Neher & A. Wettstein, *Experientia* **11**, 446 (1955).

grünliche NaOH-Fluoreszenz sowie intensiv blaue Fluoreszenz mit Phosphorsäure, hingegen eine negative Reaktion nach *Porter-Silber*. Im IR.-Spektrum waren teils stark assoziierte Hydroxylbanden, ferner solche für die 20-Ketogruppe und die Δ^4 -3-Ketogruppe feststellbar. Bei der Perjodsäure-Oxydation bildete die Verbindung kein 5-Ring-Lacton (IR.).

Tabelle 3.
R_{Cortexon}-Werte.

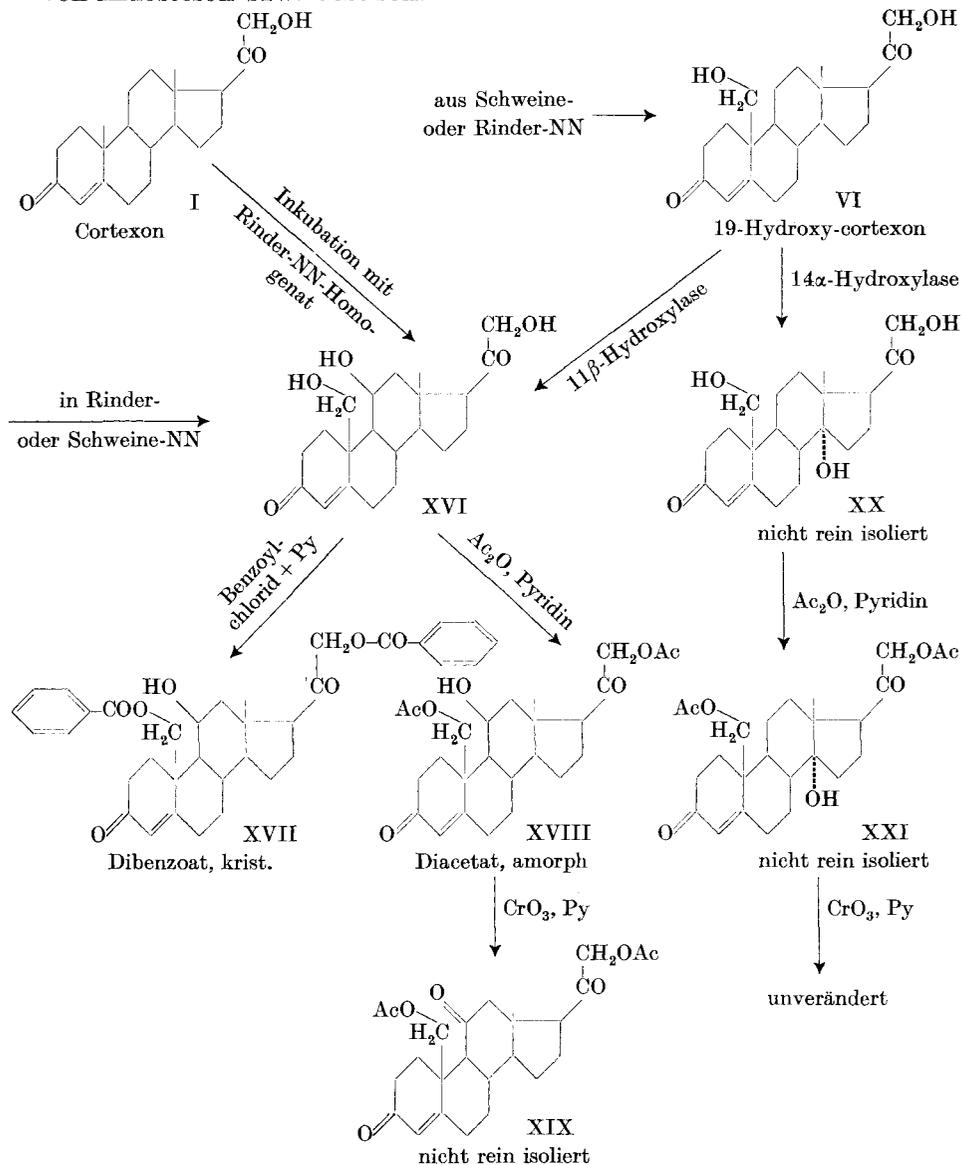
Verbindung	Systeme				
	P/T	B ₃	F/Cy—Be 1:1	A	B ₁
Cortexon-acetat	1,33	1,62		2,48	
11-Dehydro-corticosteron-acetat				0,39	
Corticosteron-acetat	0,84			0,33	
S-Acetat	0,79	0,68		0,37	
11-Dehydro-corticosteron	0,55	0,15	0,13		
Cortexon (I)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
A ₂ = Δ^4 -11 β -Hydroxy-androstendion- (3,17)	0,56	0,35	0,33		
A ₁ -Diacetat (XVIII)					0,71
A ₁₉ -21-Monoacetat	0,49	0,12			
A ₁₉ -19-Monoacetat	1,00	0,45			
A ₁₉ -Diacetat	1,34	1,19			

Bei der Einwirkung von Pyridin-Acetanhydrid wurde ein amorphes Diacetat XVIII erhalten mit praktisch unveränderten Farbreaktionen und UV.-Absorption. Hingegen gelang die Kristallisation des Dibenzoates XVII.

Die Analyse von XVII und die übrigen Eigenschaften von Substanz A 1 machten für letztere die Formel eines Dihydroxy-cortexons sehr wahrscheinlich, das neben der 19-Hydroxylgruppe eine schwer acylierbare Hydroxylgruppe enthalten muss. Ein 17 α -Hydroxyl kam nicht in Frage, hingegen war die Annahme eines 11 β -Hydroxyls naheliegend, da *Curvularia lunata* insbes. in dieser sowie in 14 α -Stellung hydroxyliert. Nun entstand bei der mikrobiologischen Umsetzung von VI ausser dem neuen Nebennieren-Steroid tatsächlich noch eine zweite Verbindung; es war also nachzuweisen, welches von beiden Produkten auf Hydroxylierung in der sekundären 11 β -Stellung und welches auf tertiäre 14 α -Hydroxylierung zurückgeht. Hiezu behandelten wir die beiden Substanzen in Form ihrer Acetylderivate mit Chromtrioxyd in Pyridin, wobei nur der Ester, der dem Nebennieren-Steroid entspricht, dehydriert wurde. Dies zeigt, dass letzteres eine sekundäre (11 β -) Hydroxylgruppe enthält und deshalb als XVI zu formulieren ist, sein Diacetat als XVIII und dessen Oxydationsprodukt als XIX. Dem nicht dehydrierbaren Ester kommt offenbar Formel XXI zu,

seiner freien Grundsubstanz, die das zweite mikrobiologische Hydroxylierungsprodukt darstellt, Formel XX. Die Dibenzoate XVII, hergestellt einerseits aus Verbindung XVI aus Nebennieren, andererseits aus VI über XVI, zeigten identische Eigenschaften (Misch-Smp., Papierchromatographie, IR.).

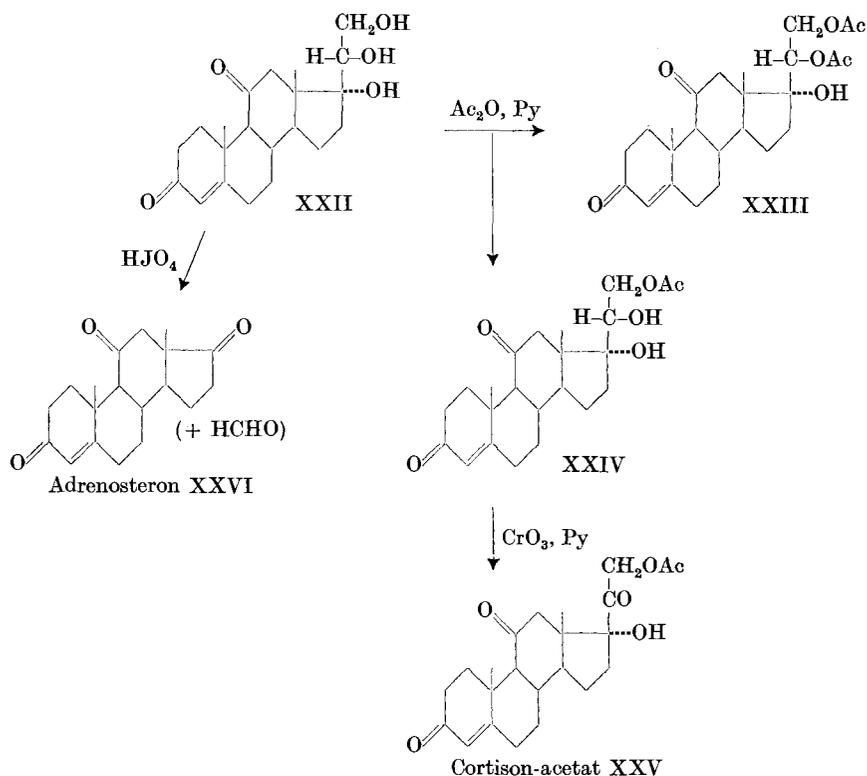
Das neue 19-Hydroxy-corticosteron (XVI) besitzt sowohl mineral- als auch glucocorticoide Wirkungen, jedoch schwächere als diejenigen von Aldosteron bzw. Cortison.



Δ^4 -3,11-Diketo-pregnen-17 α ,20 α ,21-triol (XXII), intern A 39: Kommt in Rinder- und Schweine-Nebennieren vor und wurde in erheblicher Menge aus Schweine-Nebennieren isoliert, ferner aus Homogenaten von frischen Rinder- und Schweine-Nebennieren⁶⁾ nach Inkubation von Cortexon.

Die Elementaranalyse ergab die Anwesenheit von 5 Sauerstoffatomen, das IR.-Spektrum diejenige von Hydroxyl, der Δ^4 -3-Keto- und einer 6-Ring-Ketogruppe. Die Substanz besitzt kein Reduktionsvermögen und gibt keine *Porter-Silber*-Reaktion. Sie lieferte mit überschüssigem Acetanhydrid in Pyridin ein Diacetat XXIII, mit der berechneten Menge Acetanhydrid in Pyridin neben XXIII ein Monoacetat XXIV.

Diese Eigenschaften sowie die Tatsache, dass das neue Nebennierensteroid in fast allen Papierchromatographie-Systemen sich sehr ähnlich verhielt wie *Reichstein's* Substanz U²⁴⁾, im Fingerprintgebiet des IR. aber deutlich davon verschieden war, liess vermuten, dass es sich um das in 20-Stellung Isomere von Substanz U handle. In der



²⁴⁾ T. Reichstein & J. von Euw, Helv. **24**, 247E (1941); S. A. Szpilfogel, M. S. de Winter & W. J. Alsche, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **75**, 402 (1956).

Tat liess sich sein Monoacetat XXIV mit Chromtrioxyd und Pyridin in eine reduzierende Verbindung überführen, welche nach Smp., Misch-Smp. und papierchromatographischem Verhalten mit Cortisonacetat (O-Acetylcortison XXV) identisch war. Ausserdem konnte die Verbindung mit Perjodsäure zu Adrenosteron (XXVI), identifiziert durch Smp., Misch-Smp. und Papierchromatographie, sowie Formaldehyd (Dimedon-Verbindung) abgebaut werden.

Aus diesen Umsetzungen ergibt sich für A 39 die Konstitution eines Δ^4 -3,11-Diketo-pregnen-17 α ,20,21-triols, und da die Verbindung von Reichstein's Substanz U verschieden ist, muss ihr die 20 α -Konfiguration, also Formel XXII zukommen. In Übereinstimmung damit stehen die molekularen Drehwerte von XXII sowie seines Diacetates XXIII: Bei der Acetylierung eines 20 α -Hydroxy-pregnans erfolgt Verschiebung nach links, während die Acetylierung einer 20 β -Hydroxylgruppe starke Rechtsverschiebung bewirkt. In Tab. 4 sind die Werte von XXII und XXIII mit denjenigen von Reichstein's Substanz E (Δ^4 -3-Keto-pregnen-11 β ,17 α ,20 β ,21-tetrol) und ihres Diacetates verglichen, da der $[M]_D$ -Wert für Substanz U nicht zur Verfügung steht. Ferner sind zum Vergleich die beiden in 20-Stellung isomeren Δ^4 -3-Keto-pregnen-11 β ,17 α ,20-triole herangezogen²⁵).

Tabelle 4.

Δ^4 -3-Keto-pregnen-Derivate	$[M]_D$ freie Verbindung	$[M]_D$ -Mono- bzw. Di- acetat	Δ
17 α ,20 α ,21-triol-11-on (XXII bzw. XXIII) . .	+ 511	+ 442	- 69
11 β ,17 α ,20 β ,21-tetrol (Reichstein's E)	+ 317	+ 567	+ 250
11 β ,17 α ,20 α -triol	+ 373	+ 309	- 64
11 β ,17 α ,20 β -triol	+ 425	+ 668	+ 243

Δ^4 -3-Keto-pregnen-20,20,21-triol-18-säurelacton (18 \rightarrow 20) (XXVII), intern A 42: Diese Verbindung wurde aus Schweine-Nebennieren isoliert.

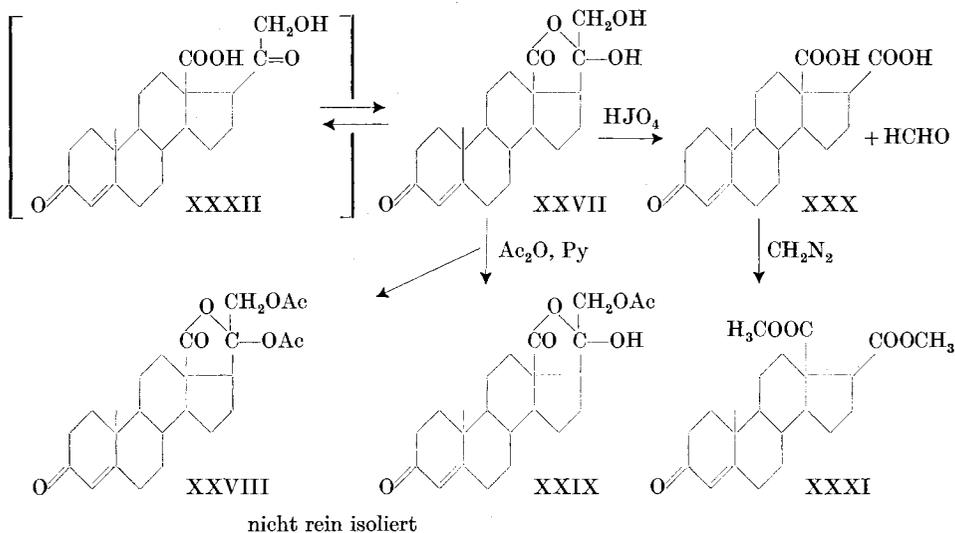
Sie weist einige besondere Eigenschaften auf: Blautetrazolium reduziert sie ebenso stark wie Cortison, Silberdiammin aber nur etwa $\frac{1}{8}$ so stark; im IR.-Spektrum finden sich Banden für assoziierte Hydroxylgruppen, für ein 5-Ring-Lacton (5,65–5,67 μ !) und für ein Δ^4 -3-Keton, dagegen keine solchen für gesättigte Carbonylfunktionen (z. B. 20-Keton).

Bei der Behandlung mit überschüssigem Acetanhydrid in Pyridin entstand eine schwach polare Verbindung, anscheinend ein Diacetat XXVIII, sowie spurenweise ein Produkt mittlerer Polarität, offenbar ein Monoacetat XXIX. Abbau des neuen Nebennieren-Steroids mit

²⁵ G. I. Poos, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4932 (1955); vgl. auch P. Wieland & K. Miescher, Helv. **32**, 1922 (1949).

Perjodsäure lieferte neben Formaldehyd (Dimedon-Verbindung) eine kristallisierte Säure mit unveränderter Δ^4 -3-Ketogruppe aber ohne Reduktionsvermögen. Einwirkung von Diazomethan auf diese Säure ergab einen ebenfalls kristallinen Ester, der im IR.-Spektrum weder OH- noch 5-Ring-Lactongruppe zeigte, hingegen noch die Δ^4 -3-Ketogruppe sowie eine sehr intensive Esterbande; es sind also wohl zwei Carbomethoxy-Gruppen enthalten.

Aus diesen Befunden kann man schliessen, dass in A 42 ein Δ^4 -3-Ketosteroid vorliegt mit 5-gliedrigem Lactonring, der an einer reduzierenden Glykol- oder α -Ketol-Seitenkette beteiligt ist. Auch die etwas nach längeren Wellenlängen verschobene Lactonbande (5,65–5,67 μ gegenüber normalerweise 5,60–5,62 μ) sprach für Hydroxyl-Substitution in Nachbarschaft zur Lactongruppe.



Eine 11β -Hydroxylgruppe ist sicher nicht vorhanden. Sieht man von ganz unwahrscheinlichen Annahmen ab, so entspricht praktisch nur eine Formel allen erwähnten Eigenschaften, diejenige einer Cortexon-18-säure (XXXII), die mit ihrer 20-Ketogruppe ein cyclisches Halbketal, d. h. ein γ -hydroxyliertes 5-Ringlacton der Formel XXVII bildet. Bei der Perjodsäure-oxydation erhält man daraus unter Abspaltung von Formaldehyd und Aufspaltung des Lacton- bzw. Säureanhydrid-Ringes die Δ^4 -3-Keto-ätien-18,20-disäure (XXX) (Trivialname Ätiensäure vgl. ²⁶).

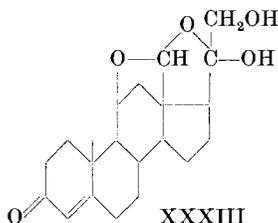
In Übereinstimmung damit steht das Ergebnis der Titration²⁷ der Disäure XXX, wonach deren ΔpK^* -Wert eindeutig der benach-

²⁶) Helv. **34**, 1686 (1951).

²⁷) Ausgeführt von Dr. E. Heilbronner, Zürich.

barten Stellung der beiden Carboxylgruppen entspricht und ausserdem die cis-Konfiguration dieser Gruppen in hohem Grad wahrscheinlich macht.

Für Aldosteron ist eine XXVII analoge cyclische Halbketalformel (XXXIII) diskutiert worden (*Sarett et al.*)²⁸⁾. Wir untersuchten deshalb, ob auch dem Aldosteron das bei Verbindung XXVII beobachtete unterschiedliche Reduktionsvermögen gegen Blautetrazolium und Silberdiammin zukommt. Dies ist tatsächlich der Fall, allerdings war der Unterschied nicht so stark: Gegenüber Silberdiammin zeigte Aldosteron ein um ca. $\frac{1}{3}$ schwächeres Reduktionsvermögen als gegenüber Blautetrazolium (Vergleich mit Cortison).



Das Vorkommen eines Hydroxy-lactons (18 \rightarrow 20) der Formel XXVII in den Nebennieren besitzt besonderes biochemisches Interesse, weist es doch darauf hin, dass die in ihnen enthaltenen Enzyme Cortexon nicht nur, wie von uns früher gezeigt^{6b)}, am Kohlenstoffatom 18 zu hydroxylieren, sondern auch weiter zur 18-Säure zu oxydieren vermögen. Dabei ist als Zwischenstufe eine Aldehydgruppe anzunehmen, wie sie im Aldosteron vorkommt. Diese Umwandlungen an C 18, die leichte Hydroxylierung in 11 β -Stellung sowie die oben beschriebenen Hydroxylierungen in 6 β - und 19-Stellung erklären wohl auch die nur geringe Menge Cortexon, die sich in den Nebennieren findet.

Experimenteller Teil.

Allgemeine Methodik.

Papierchromatographie: Es wurden Systeme von *Zaffaroni*⁸⁾, von *Bush*⁹⁾ und von *Eberlein & Bongiovanni*¹⁰⁾ oder Varianten davon in der bei uns üblichen Ausführungsform⁷⁾ verwendet, insbes. die in Tab. 5 angekreuzten Systeme.

Die Imprägnierung der Papiere erfolgte bei der ersten Gruppe normalerweise durch Eintauchen in eine 20-proz. Lösung der stationären Phase in Aceton. Nach 5–10 Min. Hängen waren die Papiere bereit zur Aufnahme der Substanzen. Bei Verwendung der zweiten Gruppe von Systemen wurden die unbehandelten Papiere mit Substanzen beladen, in das Chromatographiergefäss gehängt und 8–10 Std. equilibriert; dann wurde die mobile Phase zugegeben.

²⁸⁾ *E. A. Ham, R. E. Harman, N. G. Brink & L. H. Sarett, J. Amer. chem. Soc. 77, 1637 (1955).*

Tabelle 5.

Bei der Papierchromatographie verwendete Lösungsmittelsysteme.

* P/T = Propylenglykol/Toluol F/Cy = Formamid/Cyclohexan F/Cy-Be (1:1) = Formamid/Cyclohexan-Benzol (1:1)
* F/Be = Formamid/Benzol F/Be-CHCl ₃ (1:1) = Formamid/Benzol-Chloroform (1:1)
* F/CHCl ₃ = Formamid/Chloroform
* <i>Bush C</i> = Toluol-Essigester-Methanol-Wasser (9:1:5:5)
* <i>Bush B</i> ₅ = Benzol-Methanol-Wasser (2:1:1)
BL ₁ = Benzol-Leichtpetrol-Methanol-Wasser (7:3:5:5)
<i>Bush B</i> ₁ = Toluol-Leichtpetrol-Methanol-Wasser (25:25:35:15)
<i>Bush B</i> ₃ = Benzol-Leichtpetrol-Methanol-Wasser (17:33:40:10)
<i>Bush A</i> = Heptan-Methanol-Wasser (5:4:1)
* E ₂ B = Isooctan-t-Butanol-Wasser (10:5:9)
*) NN = Nebennieren.

Wenn nichts anderes angegeben, wurden die Chromatogramme stets bei $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ausgeführt, sonst bei $40^{\circ} \pm 1^{\circ}$; alle Chromatogramme sind absteigend auf *Whatman*-Papier Nr. 1 ausgeführt, die analytischen Chromatogramme auf standardisierten, ausgestanzten Papierstreifen, die präparativen auf standardisierten, gewaschenen Papierblättern oder im Chromatoblock⁷). Die mobile Phase wurde entweder so lange zur Einwirkung gebracht, bis sie den unteren Papirranda erreichte („bu“ = 2–3 Std.) oder, wenn länger, abtropfen gelassen (Angabe in X mal bu oder in Std.); bei den bu-Chromatogrammen wurde stets am Rand der Farbstoff Sudan III mitlaufen gelassen zur besseren Kennzeichnung der Lösungsmittelfront. Die Tröge waren aus Glas oder rostfreiem Stahlblech eigener Konstruktion⁷). Trocknung und Photokopie der Chromatogramme sowie ihre Auswertung mit verschiedenen Farbreaktionen wurde auf übliche Weise durchgeführt (BT = Blautetrazolium).

Wir stützten uns nicht auf die üblichen R_F-Werte, sondern auf die relativen Wandergeschwindigkeiten, wie sie z. B. die R_M-Werte darstellen. Die angegebenen R_M-Werte (= Distanz Start-Mittelpunkt von Fleck X / Distanz Start-Mittelpunkt von Fleck M) wurden unter möglichst standardisierten Bedingungen bestimmt und stellen den Mittelwert von mindestens 3, häufig 10–20-Bestimmungen dar. Trotzdem müssen ca. $\pm 10\%$ Streuung in Kauf genommen werden. Bei einer Fleckenlänge von ca. 1,5–3 cm bedingt dies, dass R-Werte z. B. von 0,50 und 0,60 im Einzelchromatogramm oft nicht genau unterschieden werden können. Ist in keinem System eine grössere Differenz realisierbar, so hat man sich Mittelwerte aus mehreren Läufen zu beschaffen, gemischte Chromatogramme auszuführen und besonders auf Unterschiede bei den Indikatoren UV., RV., NaOH oder H₃PO₄ zu achten.

Tab. 1 und Fig. 1 zeigen, dass sich von den relativ stark polaren NN-Steroiden*) tatsächlich fast alle bei Verwendung mehrerer Systeme papierchromatographisch gut differenzieren lassen. Zusätzlich sind in Tab. 1 noch einige NN-Steroid-Metaboliten aufgeführt, die bisher nicht in NN gefunden worden sind (Tetrahydro-Derivate = im Ring A gesättigte 3 α -Hydroxy-pregnan-Derivate, sowie Dihydro-Derivate = im Ring A gesättigte 3-Keto-pregnan- oder -allopregnan-Derivate, von Hydrocortison, Cortison, Corticosteron, 17 α -Hydroxy-cortexon sowie 11-Dehydro-corticosteron, die teilweise in Blut oder Harn vorkommen). Die einwandfreie Trennung solcher Steroide, die sich nur durch Isomerie am C-Atom 5 oder 20 unterscheiden, ist oft ziemlich schwierig; hier können aber manchmal Farbreaktionen gute Hilfe leisten. Für die von System zu System stark wechselnden R_M-Werte gewisser Substanzen dürften wenigstens teilweise die Wasserstoff-

brückenbindungen Substanz–stationäre Phase verantwortlich sein. Dieses Verhalten kann als Hinweis auf die Konstitution einer Verbindung von Bedeutung sein.

Verteilungschromatographie an Kieselgur: siehe ³⁾.

Verteilungschromatographie an Cellulosepulver: siehe ³⁾. BL₃ bezeichnet ein Lösungsmittelsystem aus Benzol-Petroläther-Methanol-Wasser (3:7:7:3), wobei das Cellulosepulver mit der halben Menge seines Gewichtes mit der unteren Phase beladen wurde. Als mobile Phase dienten Benzol-Petroläther 3:7 bis 7:3. Bei BL₄ war das Verhältnis des Gemisches von Benzol-Petroläther-Methanol-Wasser 1:1:1:1 unter Vergrößerung des Benzol-Anteiles während der Chromatographie.

Silicagelchromatographie: Das zu trennende Gemisch wurde an der 25–60-fachen Menge Silicagel (*Davison*, through 200) in CHCl₃ adsorbiert und wie üblich im Durchlauf chromatographiert unter Verwendung von CHCl₃ mit 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 und 75% Aceton, Aceton und Methanol.

Acetylierungen wurden auf übliche Weise durch Lösen der Substanz in abs. Pyridin und Versetzen mit überschüssigem Acetanhydrid bei 0–20° und Stehenlassen des Ansatzes während 20–48 Std. bei 20° ausgeführt. Aufarbeitung wie bei ³⁾ angegeben.

Perjodsäureoxydationen: Die Substanz oder der Extrakt wurde in wenig Methanol gelöst und mit der doppelten Menge Perjodsäure in Wasser (2-proz.) versetzt und 4–24 Std. bei 20° im Dunkeln stehengelassen. Nach Entfernen des Methanols wurde Wasser zugegeben, mit Chloroform-Äther 1:3 ausgeschüttelt und auf neutrale und saure Anteile aufgearbeitet wie in ²⁹⁾ angegeben.

Chromtrioxyd-Oxydationen in Pyridin auf übliche Weise nach der Methode von *Poos et al.*³⁰⁾.

Mikrobiologische Hydroxylierungen in Schüttelkulturen bei 27° nach den bei uns üblichen Verfahren^{16)30a)}.

Alle Smp. sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert.

Die isolierten Substanzen.

6 β ,17 α -Dihydroxy-cortexon (II), intern A 33. *Vorkommen*: In Rinder- und Schweine-NN-Homogenaten nach Inkubation von Cortexon (I).

Isolierung: Die Extrakte von inkubierten Rinder- und Schweine-NN-Homogenaten⁶⁾ wurden vereinigt (18 g) und wie üblich einer Verteilungschromatographie an Kieselgur unterzogen. Die Fraktionen Nr. 98–105 (36,7 mg), erhalten durch Elution mit Benzol, wurden auf 20 Blatt Papier mit Formamid/Chloroform chromatographiert. Elution der Zone c ergab 2,4 mg Material, aus welchem 0,6 mg II kristallisiert erhalten werden konnte.

Eigenschaften: Aus Äther-Aceton in farblosen Nadeln vom Smp. 220–226° (nach Sublimation ab 190°). λ_{\max} = 238 m μ , log ϵ = 4,20. Im IR.-Spektrum (CHCl₃) sind für HO-, 20-Keto- und Δ^4 -3-Keto-Gruppen typische Banden vorhanden.

Reduktionsvermögen positiv (Blautetrazolium). NaOH-Fluoreszenz gelb. Fluoreszenz mit Phosphorsäure rötlich-orange. Reaktion mit Ferrichlorid-Kaliumferricyanid^{30b)}: negativ. *Porter-Silber*-Reaktion positiv. Bildet nach Perjodsäure-Oxydation keine Verbindung mit 5-Ring-Lacton. R_M-Werte vgl. Tab. 1 und Fig. 1.

Konstitution: Die Eigenschaften wiesen auf ein Dihydroxy-cortexon hin mit Hydroxylgruppen in Stellung 17 und eventuell 6 (λ_{\max} !). Der Vergleich mit dem bekannten 6 β ,17 α -Dihydroxy-cortexon (II) vom Smp. 234–238°, erhalten bei der 6 β -Hydroxylierung von 17 α -Hydroxy-cortexon (III) mit *Trichothecium roseum*¹⁶⁾, ergab keine Erniedrigung des Misch-Smp. sowie Übereinstimmung im IR.-Spektrum und papierchromatographischen Verhalten.

²⁹⁾ *S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler & T. Reichstein*, *Helv.* **37**, 1200 (1954).

³⁰⁾ *G. I. Poos, G. E. Arth, R. E. Beyler & L. H. Sarett*, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 422 (1953).

^{30a)} *A. Wettstein*, *Experientia* **11**, 465 (1955).

^{30b)} *D. H. R. Barton*, *Nature* **170**, 250 (1952).

17 α ,19-Dihydroxy-cortexon (IV), intern A 32. *Vorkommen*: In Rinder- und Schweine-Nebennieren.

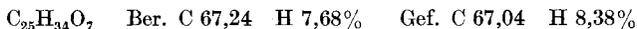
Isolierung: a) Die Extraktion einer Tonne tiefgefrorener Rinder-NN (Ansatz IV) und Vorreinigung geschah wie in³⁾ beschrieben. Es folgte eine Verteilungschromatographie des Extraktes (46,82 g) an 1,5 kg Kieselgur zwischen Wasser und organischen Lösungsmitteln. Die vereinigten Fraktionen 115—131, erhalten durch Elution mit Benzol-Petroläther 4:1 und Benzol, enthielten hauptsächlich Hydrocortison und wogen 1,03 g. Sie wurden an 50 g Silicagel in Chloroform chromatographiert. Fraktionen 18—22, erhalten durch Elution mit Chloroform-Aceton 1:1, 1:3 und Aceton, gaben 90,2 mg Material, das anschliessend auf 26 Blatt Papier im System Formamid/Chloroform papierchromatographiert wurde. Die polarste UV.-absorbierende Bande a gab 13,0 mg Eluat, das aus Aceton-Äther leicht zur Kristallisation gebracht werden konnte.

b) Die Extraktion einer Tonne tiefgefrorener Schweine-NN (Ansatz VIII), die Vorreinigung und erste Verteilungschromatographie an Kieselgur erfolgte auf übliche Weise. Die Fraktionen 174—207, erhalten durch Elution mit Benzol, Benzol-Chloroform 19:1, 9:1, 3:1 und 1:1, wurden vereinigt (850 mg) und an 50 g Silicagel in Chloroform chromatographiert. Die irrtümlich vereinigten Fraktionen 16—22, eluiert mit Chloroform-Aceton 7:3, 3:2 und 1:1, wurden an 15 g Silicagel rechromatographiert. Die Fraktionen 9—12, erhalten durch Elution mit Chloroform-Aceton 7:3 und 3:2, wogen 68,5 mg und wurden an 40 Blatt Papier im System Formamid/Chloroform papierchromatographiert, und zwar dreimal so lange, als das Lösungsmittel zur Erreichung des unteren Papierrandes benötigte. Die 2. polarste Bande b ergab 9,1 mg Eluat, das aus Äther-Aceton spontan kristallisierte.

Eigenschaften: Aus Methanol grobe farblose Spiesse vom Smp. 235—241°. $[\alpha]_D^{25} = +119,0 \pm 6,0$ ($c = 0,4595$, Dioxan); $\lambda_{max} = 243 \mu\mu$, $\log \epsilon = 4,18$. Im IR.-Spektrum, infolge schlechter Löslichkeit der Substanz aufgenommen in KBr, sind für -OH, 20-Keton und Δ^4 -3-Keton typische Banden vorhanden.

Reduktionsvermögen positiv (Blautetrazolium). NaOH-Fluoreszenz: blaugrün. Konz. H₂SO₄: rot. Phosphorsäure-Reaktion: schwach grau mit roter UV.-Fluoreszenz. Reaktion mit FeCl₃-K₃Fe(CN)₆: negativ. *Porter-Silber*-Reaktion: positiv. R_M-Werte vgl. Tab. 1 und Fig. 1.

Bildet ein Diacetat V: Aus Äther-Aceton grosse Kristallnadeln vom Smp. 229—232° (nach starker Sublimation).



IR. (CH₂Cl₂): Banden für -OH, 20-Keton, Δ^4 -3-Keton und Acetylgruppen. Wandert in Prop./Toluol etwas langsamer als Corticosteron-acetat, siehe Tab. 2.

UV.-Absorption und Farbreaktionen sind praktisch identisch mit denjenigen der freien Verbindung.

Konstitution: Die erwähnten Eigenschaften wiesen auf ein Dihydroxy-cortexon hin mit Hydroxygruppen in 17 α -Stellung (schwer acetylierbar, *Porter-Silber*-Reaktion) und 19-Stellung (NaOH-Fluoreszenz!), also auf eine in 19-Stellung hydroxylierte Substanz S. Die Eigenschaften dieser bekannten Verbindung¹⁷⁾ stimmen mit denjenigen unserer Substanz sehr gut überein.

Die von Herrn Dr. Levy freundlicherweise zur Verfügung gestellte Probe (Smp. 224—230°) zeigte im Gemisch mit unserer Substanz keine Smp.-Erniedrigung. Beide Verbindungen verhielten sich papierchromatographisch (3 Systeme, 4 Indikatoren) völlig identisch. Ausserdem gelang es, 19-Hydroxy-cortexon (VI)^{6b)} durch mikrobiologische Hydroxylierung mit *Trichothecium roseum*¹⁶⁾ in IV überzuführen, wobei daneben offenbar 6 β ,19-Dihydroxy-cortexon erhalten wurde.

Bei der biologischen Prüfung von IV konnte keine Wirkung im Eosinophilen-Test und im Na-Retentions-Test festgestellt werden³¹⁾.

³¹⁾ Vgl. hierzu H. Levy & St. Kushinsky, Arch. Biochemistry Biophys. **58**, 245 (1955)

19-Hydroxy-cortexon (VI), intern A 19. *Vorkommen*: In Schweine- und Rinder-NN.

Isolierung: a) Eine Tonne Schweine-NN (Ansatz VIII) wurde wie üblich extrahiert, der Extrakt vorgereinigt und an Kieselgur einer Verteilungschromatographie unterzogen. Die mit Petroläther-Benzol 7:3 eluierten Fraktionen 40–46 wurden vereinigt (1,296 g) und an 30 g Silicagel in Chloroform chromatographiert. Die mit Chloroform-Aceton 3:1 eluierten Fraktionen 19 und 20 (314,4 mg) chromatographierte man auf 75 Blatt Papier mit Formamid/Benzol-Chloroform (1:1). Die knapp vor Cortison befindliche Zone ergab 38,1 mg Eluat, welches nochmals auf 40 Blatt Papier im gleichen System chromatographiert wurde, wobei $\frac{1}{4}$ des Materials verloren ging. Das Eluat der reduzierenden Zone (9,9 mg) enthielt 2 mg Substanz, von welcher 1,1 mg aus Äther-Aceton kristallisierten: Smp. 160–162°. Nach Misch-Smp., papierchromatographischem Verhalten und IR.-Spektrum handelt es sich um 19-Hydroxy-cortexon (VI). Die Eigenschaften dieser Verbindung sind von uns schon früher beschrieben worden^{6b)}. R_M -Werte vgl. Tab. 1 und Fig. 1. Wandergeschwindigkeit der Acetate siehe Tab. 2 und 3.

Aus schwächer polaren Fraktionen der Kieselgur- und Silicagelchromatographien konnten in analoger Weise noch geringe Mengen A 19 isoliert werden, so dass sich der Gehalt dieser NN-Charge zu etwa 3–5 mg 19-Hydroxy-cortexon errechnen lässt.

19-Hydroxy-cortexon besitzt nach der Literatur keine nennenswerte Na-retinierende Wirkung.

b) Wir konnten nun 19-Hydroxycortexon ebenfalls aus Rinder-NN in geringer Menge isolieren, und zwar aus dem ketonischen Anteil von 4 Chargen nach üblicher Anreicherung durch Silicagel- und Papierchromatographie.

11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-allopregnan-3,20-dion (5 α -Dihydro-hydrocortison; VII), intern A 35. *Vorkommen*: In Rinder-NN.

Isolierung: a) Aus Charge III von einer Tonne tiefgefrorener Rinder-NN. Die nach üblicher Aufarbeitung durch Verteilungschromatographie an Kieselgur erhaltenen Fraktionen 77–84, gewonnen durch Elution mit Benzol-Petroläther 7:3 und 4:1, wurden vereinigt (400 mg) und an Cellulose (60 g) einer weiteren Verteilungschromatographie unterzogen. Die vor Aldosteron mit Benzol-Petroläther 7:3 eluierten Fraktionen 4–9 wogen 56,3 mg. Sie wurden mit den Fraktionen 62–72 (563,7 mg) der oben erwähnten Kieselgursäule (erhalten durch Elution mit Benzol-Petroläther 3:2 und 7:3) vereinigt und an 30 g Silicagel in Chloroform erneut chromatographiert.

Fraktionen 13–16, eluiert mit Chloroform-Aceton 4:1, enthielten neben Cortison die Substanz A 35. Sie wurden vereinigt (68,8 mg) und präparativ auf 37 Blatt Papier mit F/CHCl₃ (bu) chromatographiert. Bande b (polarer als Cortison) lieferte 7,7 mg Eluat, welches zu ca. 25% die gesuchte Verbindung enthielt. Letztere verhielt sich papierchromatographisch wie 5 α -Dihydro-hydrocortison (VII) und sehr ähnlich wie die entsprechende 5 β -Verbindung. Aus Aceton-Äther konnten ca. 1 mg Kristalle vom Smp. 219–224° erhalten werden.

b) Aus Chargen I + II von tiefgefrorenen Rinder-NN: Die nach Isolierung des Aldosterons und teilweise anderer, bekannter NN-Steroide verbleibenden Fraktionen wurden vereinigt (29,72 g) und mit *Girard*-Reagens P³²⁾ in Ketone und „Nicht-Ketone“ aufgetrennt. Die ketonischen Anteile von insgesamt 2,7245 g wurden an 150 g Silicagel vorgereinigt. Die Fraktionen 21–26, eluiert mit Chloroform-Aceton 7:3 und 3:2, enthielten noch etwas Aldosteron und wurden vereinigt (455,2 mg). Die folgende präparative Chromatographie auf 120 Blatt Papier im System F/CHCl₃ (bu) lieferte eine Reihe von UV.-absorbierenden und reduzierenden Banden. Bande c, zwischen derjenigen von Hydrocortison und Aldosteron gelegen, ergab 16,2 mg Eluat, welches u.a. A 35 enthielt. Es wurde auf 10 Blatt Papier im System *Bush* C (40°, bu) weiter aufgetrennt. Das Eluat c davon lieferte 0,5 mg Kristallinat vom Smp. 215–219°, welches nach Misch-Smp. und papierchromatographischem Verhalten mit dem unter a) gewonnenen Produkt identisch war.

³²⁾ A. Girard & G. Sandulesco, Helv. **19**, 1095 (1936).

Eigenschaften: Smp. 219—224° (Subl. ab 200°); keine UV.-Absorption bei 240 m μ ; Reduktionsvermögen positiv (BT), NaOH-Fluoreszenz negativ, H₃PO₄-Fluoreszenz orange-lila (je nach Lösungsmittel-System). R_M-Werte s. Tab. 1.

21-Monoacetat (VIII): Mit Acetanhydrid-Pyridin, Smp. aus Aceton-Äther: 209—214°. Im IR.-Spektrum (CH₂Cl₂) zeigte es Banden für OH-, 6-Ring-Keton-, 20-Keton- und Acetoxy-Gruppen.

Konstitution: Die Verbindung zeigte im Misch-Smp. mit einer authentischen Probe VII vom Smp. 222—230° keine Depression. Ihr Acetylderivat gab ebenfalls keine Depression im Misch-Smp. mit authentischem Acetat VIII vom Smp. 204—210°, hingegen eine eindeutige Depression mit dem Acetat von 5 β -Dihydro-hydrocortison (Smp. 205—211°).

Die Acetate von A 35 und 5 α -Dihydro-hydrocortison erwiesen sich auch im IR.-Spektrum als identisch.

6 β -Hydroxy-corticosteron (X), intern A 23. *Vorkommen:* Isoliert aus Schweine-NN und nachgewiesen in Rinder-NN. Identisch mit A 28, welches bei der aeroben Inkubation von Cortexon mit Rinder-NN-Homogenaten^{6a}) entstand; als radioaktives amorphes Produkt isoliert nach Inkubation von 21-¹⁴C-Cortexon mit Rinder-NN-Vollhomogenat²³).

Isolierung: a) Aus Schweine-NN (Ansatz VIII): Die bei der üblichen Aufarbeitung von 1 Tonne Schweine-NN anfallenden sauren, alkalischen und neutralen Waschwässer wurden vereinigt und bei pH 8 fünfmal mit dem gleichen Volumen Äther-Chloroform 3:1 extrahiert. Der Extrakt (2,86 g) wurde in Chloroform an 150 g Silicagel chromatographiert. Die vereinigten, mit Chloroform-Aceton 3:2 eluierten Fraktionen 20—22 gaben 193,2 mg Material, das auf 50 Blättern Papier mit Formamid/Chloroform präparativ chromatographiert wurde, und zwar dreimal so lange als die mobile Phase zur Erreichung des unteren Papierrandes benötigte. Bande c enthielt 21,2 mg Eluat und wurde nochmals auf 12 Blättern Papier mit Formamid/Chloroform chromatographiert. Bande a enthielt 3,0 mg noch stark verunreinigtes A 23. Es wurde daher nochmals auf 2 Blatt Papier im System C von *Bush* aufgetrennt. Bande a lieferte 0,5 mg Eluat, aus dem mit Äther-Aceton eine kleine Menge Kristallisat erhalten werden konnte. In analoger Weise wurden auch aus Ansatz VIII selbst, und zwar aus den Fraktionen 164—173 (Kieselsäure, eluiert mit Benzol), ca. 0,75 mg der Verbindung X isoliert.

b) Aus mit Cortexon (I) inkubierten Rinder-NN-Homogenaten: Die Inkubation und Aufarbeitung der erhaltenen Extrakte erfolgte nach ^{6a}). Aus etwa 30 Inkubationen mit je 200—250 g Rinder-Nebennieren wurden die stark polaren Fraktionen, enthaltend Cortison, Aldosteron, Hydrocortison und andere unidentifizierte Verbindungen, vereinigt (875 mg). Man chromatographierte an 50 g Silicagel in Chloroform und sammelte die Fraktionen 21—24, die mit Chloroform-Aceton 7:3 und 3:2 eluiert und darauf an 48 Blatt im System Formamid/Chloroform papierchromatographiert wurden. Die am stärksten polare Bande enthielt A 23, welches aus dem Eluat (7,9 mg) mit Äther-Aceton kristallisiert erhalten werden konnte. Weitere kleine Mengen erhielt man auch noch aus den Fraktionen 25—30 der oben erwähnten Silicagelchromatographie.

c) Herstellung durch 11 β -Hydroxylierung von 6 β -Hydroxy-cortexon (IX): 47 mg 6 β -Hydroxy-cortexon (IX) wurden dem filtrierten und in dest. Wasser suspendierten Mycel einer 6-tägigen Kultur von *Curvularia lunata*²²) zugegeben und 2 Tage bei 27° unter Schütteln inkubiert. Der aus dem Filtrat mit Chloroform gewonnene Neutraleextrakt (72,3 mg) wurde an 30 Blatt Papier mit F/CHCl₃ chromatographiert. Nach Elution des stark polaren Umsetzungsproduktes erhielt man aus diesem aus Äther-Aceton 1,8 mg reine Kristalle von X.

d) Herstellung durch 6 β -Hydroxylierung von Corticosteron (XII): 700 mg Corticosteron, isoliert aus Nebennieren, wurden einer 1-wöchigen Kultur von *Trichothecium roseum*¹⁶) in Bierwürze zugegeben und 3½ Tage bei 27° inkubiert. Die klar filtrierte Lösung wurde auf übliche Weise extrahiert und der Neutraleextrakt (912 mg) an 50 g Silicagel in Chloroform chromatographiert. Fraktionen 14—20, eluiert mit Chloroform-

Aceton 7:3, 3:2, 1:1 und 1:3 wurden auf insgesamt 100 Blatt Papier in Formamid/Chloroform chromatographiert. Die dem A 23 entsprechenden Banden lieferten 16,1 mg Eluat, aus dem leicht 7,2 mg 6 β -Hydroxy-corticosteron (X) kristallisiert werden konnten.

Eigenschaften: Aus Äther-Aceton und Methanol Nadeln vom Smp. 225–227° (nach Sublimation ab 200°). $[\alpha]_D^{25} = +118^\circ \pm 15^\circ$ (c = 0,857, Dioxan). $\lambda_{\max} = 237 \mu\mu$, $\log \epsilon = 4,13$.

Im IR.-Spektrum, infolge schlechter Löslichkeit der Substanz aufgenommen in KBr, sind für –OH, 20-CO und Δ^4 -3-Keton typische Banden vorhanden.

$C_{21}H_{30}O_5$ Ber. C 69,58 H 8,34% Gef. C 69,76 H 8,27%

Reduktionsvermögen positiv (Blautetrazolium). NaOH-Fluoreszenz: gelb. Einwirkung von konz. H_2SO_4 : grünlich gelb \rightarrow grün. Keine Farbreaktionen mit Phosphorsäure, $FeCl_3$ – $K_3Fe(CN)_6$ oder nach *Porter-Silber*. Bildet bei Perjodsäureoxydation keine Verbindung mit 5-Ring-Lacton (IR.).

Bildet ein Diacetat XIII vom Smp. 182–188° (farblose Nadelbüschel aus Äther-Aceton, kristallisiert aus der Schmelze leicht wieder in langen Nadeln); IR. (CH_2Cl_2): Banden für OH-, 20-CO-, Δ^4 -3-Keton- und Acetat-Gruppen. UV.-Absorption und Farbreaktionen praktisch identisch mit denjenigen der freien Verbindung. Wandert im System Prop./Toluol etwas langsamer als Corticosteron-acetat, s. Tab. 2.

Konstitution: Die erwähnten Eigenschaften der freien Verbindung und seines Acetates wiesen auf ein Dihydroxy-cortexon hin, in welchem eine Hydroxylgruppe schwer acetylierbar ist. Das nach kurzen Wellenlängen verschobene λ_{\max} liess das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe in 6 β -Stellung vermuten, ebenso die Entstehung eines Umlagerungsproduktes XI bei der Einwirkung von siedender wässrig-methanolischer $KHCO_3$ -Lösung (1 Std.). (Eigenschaften s. theoretischer Teil.) Für die zweite, schwer acetylierbare Hydroxylgruppe kam in erster Linie die 11 β -Stellung in Frage, da diese biogenetisch bevorzugt ist.

In der Tat konnte A 23, das also 6 β -Hydroxy-corticosteron (X) darstellt, auf mikrobiologischem Wege sowohl durch 6 β -Hydroxylierung von Corticosteron (XII) mittels *Trichothecium roseum*¹⁶) als auch durch 11 β -Hydroxylierung von 6 β -Hydroxy-cortexon (IX) mittels *Curvularia lunata*²²) gewonnen werden.

6 β -Hydroxy-11-dehydro-corticosteron-diacetat (XIV): 3 mg XIII wurden mit Chromtrioxyd in Pyridin bei Zimmertemperatur dehydriert. Das Rohprodukt chromatographierte man an Al_2O_3 . Mit Benzol-Äther 1:1 wurden 1,8 mg amorphes Material eluiert, aus dem mit Äther-Aceton 0,6 mg Kristalle vom Smp. 178–183° erhältlich waren. Verhalten im Licht und Dunkeln: siehe theoretischer Teil.

Das IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) zeigte Banden, die der Δ^4 -3-Ketogruppe, der 20-Ketogruppe, der 6-Ring-Ketogruppe und den Acetatgruppen zugeordnet werden können. Reduktionsvermögen und UV.-Absorption positiv. NaOH-Fluoreszenz gelb. Wanderwindigkeiten siehe Tab. 2.

6 β -Hydroxy-11-dehydro-corticosteron (XV), intern A 44. *Vorkommen:* In Rinder-NN.

Isolierung: Aus Ansätzen III + IV. Von Ansatz III wurden die von der üblichen Kieselgurverteilungschromatographie stammenden Fraktionen a) 77–84, b) 85–86 und c) 97–104 verwendet, die durch Elution mit Benzol-Petroläther 7:3 und 4:1 erhalten worden waren. Die Fraktionen 77–84 (400 mg) wurden an 60 g Cellulosepulver erneut chromatographiert (Verteilung, System BL_1). Davon wurden die mit Benzol-Petroläther 7:3 erhaltenen Unterfraktionen a/21–41 verwendet.

Dazu kamen noch von Ansatz IV die Fraktionen d) 91–102 und e) 103–109 von der Kieselgurchromatographie, die mit Benzol-Petroläther 7:3 und 4:1 eluiert worden waren. Fraktionen 91–102 (812,7 mg) und 103–109 (551 mg) wurden separat an 70 bzw. 60 g Cellulose mit den Systemen BL_3 bzw. BL_4 rechromatographiert. Von ersteren wurden die mit Benzol-Petroläther 7:3 eluierten Unterfraktionen d/101–105 und von e die mit Benzol-Petroläther 7:3 eluierten Unterfraktionen e/33–46 verwendet. Diese, neben M noch andere Substanzen enthaltenden Fraktionen a/21–41, b), c), d/101–105

und e/33—46 wurden vereinigt (1,8396 g) und an 100 g Silicagel in Chloroform rechromatographiert.

Die mit Chloroform-Aceton 7:3 und 3:2 eluierten Fraktionen 14—18 (110,1 mg) wurden auf 30 Blatt Papier mit F/CHCl₃ (zweimal bu) rechromatographiert. Die vor Hydrocortison befindliche Bande e ergab 12,1 mg Eluat, das auf 8 Blatt Papier im System *Bush C* bei 40° (bu) weiter gereinigt wurde. A 44 war im Eluat der Bande a (5,9 mg) enthalten.

2,5 mg davon wurden durch Einwirkung von Acetanhydrid in Pyridin bei Zimmer-temperatur acetyliert und an 100 mg Al₂O₃ chromatographiert. Aus der mit Benzol-Äther 1:1 eluierten Fraktion liess sich das Diacetat XIV in kristallisierter Form isolieren (0,9 mg).

Verbindung XV wurde auch, neben viel X, bei der Inkubation von Corticosteron (XII) mit einer Kultur von *Trichothecium roseum*¹⁶⁾ unter 6β-Hydroxylierung und gleichzeitiger 11-Dehydrierung erhalten. Es fiel beim präparativen Papierchromatogramm in einer schwächer polaren Fraktion als derjenigen von X an.

Eigenschaften: Smp. 206—208° (aus Äther-Aceton); UV. positiv (Photokopie), Reduktionsvermögen positiv (BT), NaOH-Fluoreszenz gelb, H₃PO₄-Fluoreszenz schwach blau. R_M-Werte siehe Tab. 1 und Fig. 1.

Diacetat XIV: Smp. 178—183°. Gleiche Farbreaktionen wie die freie Verbindung. Das IR.-Spektrum (CH₂Cl₂) zeigt Banden, die der 6-Ring-Keton-, 20-Keton-, Δ⁴-3-Keton-Gruppe und den Acetatgruppen zugeordnet werden können. R-Wert siehe Tab. 2. Das mikrobiologisch gewonnene Präparat erwies sich nach Misch-Smp., papierchromatographischem Verhalten und IR.-Spektrum als identisch mit XIV aus X, sowie mit der durch Acetylierung des NN-Präparates XV erhaltenen Verbindung. Auch zeigte es das im theoretischen Teil erwähnte typische Verhalten im Licht und im Dunkeln.

19-Hydroxy-corticosteron (XVI), intern A 1. *Vorkommen*: In Rinder- und Schweine-NN sowie nach aerober Inkubation von Cortexon mit solchen Homogenaten.

Isolierung: a) Eine Tonne tiefgefrorener Schweine-NN (Ansatz VIII) wurde wie üblich extrahiert, vorgereinigt und an Kieselgur chromatographiert. Die mit Benzol-Petroläther 7:3 und 4:1 eluierten Fraktionen 129—163 wurden vereinigt (1,067 g) und an 30 g Silicagel in Chloroform chromatographiert. Fraktionen 24 und 25 (45,0 mg), erhalten durch Elution mit Chloroform-Aceton 1:1, chromatographierte man anschliessend auf 20 Blatt Papier mit Formamid/Chloroform. Bei der Elution von Bande c wurden 15,2 mg amorphes Material gewonnen, welches noch uneinheitlich war und ca. 10% A 1 enthielt. Es wurde auf 18 Blatt Papier im System *Bush C* dreimal so lange chromatographiert, als die mobile Phase zur Erreichung des Papierrandes benötigte. Zone b ergab 2,8 mg einheitliches Material mit ca. 50% Gehalt an A 1.

b) Aus Rinder- und Schweine-NN-Homogenaten nach Inkubation mit Cortexon: Von der Silicagelchromatographie wurden die Fraktionen 25—30 und 34 (120,4 mg), eluiert mit Chloroform-Aceton 3:2, 1:1 und Methanol, auf 60 Blatt Papier und die restlichen Methanol-Fraktionen (94,8 mg) separat auf 40 Blatt Papier mit Formamid/Chloroform chromatographiert. Die Zonen d wurden vereinigt und gaben 44,3 mg amorphes Material mit ca. 40% Gehalt an Substanz A 1.

Weitere Reinigung: 58,8 mg der amorphen Fraktionen wurden in 2 ml abs. Alkohol gelöst und mit 50 mg *Girard*-Reagens T³²⁾ in 8 ml abs. Alkohol 32 Std. bei 20° stehengelassen. Nach Versetzen mit 2 Vol. Wasser und Ausäthern der „Nicht-Ketone“ wurde die wässr.-alkohol. Lösung im Vakuum eingengt, mit 0,4 ml 2-n. HCl angesäuert und sofort dreimal mit Chloroform-Äther 1:3 extrahiert (Ketone I, 24,7 mg). Eine gleiche Extraktion erfolgte nach 24stündigem Stehen bei 20° (Ketone II, 11,8 mg). Ketone I enthielten ca. 40% Substanz A 1, Ketone II ca. 20%, während im „nicht-ke-tonischen“ Anteil nur ca. 10% verblieben; kein Kristallisieren. Insgesamt 57,1 mg ketonische Anteile wurden an 3 g Silicagel in Chloroform rechromatographiert. Die mit Chloroform-Aceton 3:2 bis 1:1 erhaltenen Fraktionen 8—14 enthielten die neue Verbindung. Ein kleiner Teil davon war durch Eindampfenlassen der methanolischen Lösung zur Kristallisation zu bringen (papierchromatographische Kontrolle der Kristalle!).

c) 11 β -Hydroxylierung von 19-Hydroxy-cortexon (XI): *Curvularia lunata*²²) wurde auf 5 l Nährlösung 7 Tage bei 27° gezüchtet, das Mycel abfiltriert, in dest. Wasser suspendiert und mit 100 mg 19-Hydroxy-cortexon (VI) (isoliert aus NN-Homogenaten) 2 Tage auf der Schüttelmaschine inkubiert. Nach Filtration und Extraktion des Filtrates mit Chloroform erhielt man einen Neutralextrakt von 68,6 mg, welcher neben unverändertem 19-Hydroxy-cortexon und einem stärker polaren Hydroxylierungsprodukt Substanz A 1 enthielt. 68,4 mg wurden auf 40 Blatt Papier in Formamid/Chloroform chromatographiert. Die entsprechende Zone gab nach üblicher Elution 15,5 mg amorphes Material von XVI, das vorläufig nicht kristallisierte. Die stärker polare Fraktion lieferte XX.

Eigenschaften: Aus feuchtem Methanol Smp. 187–192°, vermutlich könnte er noch höher getrieben werden. $\lambda_{\max} = 243 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,01$ (mit amorphem Material). Im IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) zeigt die gut gereinigte, aber noch amorphe Verbindung Banden für OH-Gruppen, teils sehr stark assoziiert, ferner solche, wie sie für die 20-Ketogruppe und die Δ^4 -3-Ketogruppe charakteristisch sind.

Reduktionsvermögen positiv (BT); NaOH-Fluoreszenz: gelb mit Grüntich (je nach Lösungsmittelsystem stärker oder schwächer grünlich!); Reaktion mit Phosphorsäure: intensive blaue UV.-Fluoreszenz; keine Farbreaktionen mit $\text{FeCl}_3 \cdot \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, m-Dinitrobenzol oder nach *Porter-Silber*.

Bildete bei Perjodsäureoxydation keine Verbindung mit 5-Ring-Lacton (IR.).

Die neue Verbindung XVI wechselt in den Chromatogrammen mit verschiedenen Lösungsmittel-Systemen ihre Stellung gegenüber Hydrocortison (M) in charakteristischer Weise; siehe Tab. 1 und Fig. 1.

Sie bildet mit Acetanhydrid in Pyridin ein Diacetat XVIII mit freier OH-Gruppe, das polarer ist als Corticosteronacetat; siehe Tab. 2 und 3. Bisher war das Diacetat trotz Chromatographie an Al_2O_3 nicht zur Kristallisation zu bringen. UV.-Absorption und Farbreaktionen sind praktisch identisch mit denjenigen der freien Verbindung XVI. Im IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) sind Banden sichtbar für -OH, Acetylgruppen (überlagern die 20-Keto-Bande) und die Δ^4 -3-Ketogruppe.

Dibenzoat XVII: 5,2 mg amorphes, ca. 50-proz. XVI wurden in 0,3 ml Pyridin gelöst und mit 0,4 ml 10-proz. Benzoylchlorid-Lösung in Benzol 48 Std. bei 20° behandelt. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man 24,3 mg Rohprodukt, das an 500 mg Al_2O_3 gereinigt wurde. Die Fraktionen 5–9 (je 2 ml Benzol-Äther 1:1 und Äther) enthielten den Ester und lieferten mit Benzol-Petroläther leicht Kristallkörper vom Smp. 170–178°; nochmalige Kristallisation ergab 2,3 mg XVII vom Smp. 177–182°.

$\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_7$ Ber. C 73,66 H 6,71% Gef. C 73,41 H 6,89%

Mol. Gew. Ber. 570,65 Gef. 604, 600 (Exalton).

$\lambda_{\max} = 231 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,59$ (Äthanol). (Zum Vergleich: Cortexon-mono-benzoat $\lambda_{\max} = 234 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,39$.) $[\alpha]_D^{25} = +200 \pm 8^\circ$ (c = 0,2935, Dioxan).

Im IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) erscheinen u. a. Banden bei 2,67 μ (OH-Gruppe), 5,81 μ (20-Keton + Benzoat), 5,98 μ und 6,15 μ (Δ^4 -3-Keton), 6,23 und 6,30 μ (aromat. Ring).

Reduktionsvermögen positiv (BT), NaOH-Fluoreszenz gelb; R-Werte s. Tab. 2.

Zur Konstitution: Die Natronlauge-Fluoreszenz von XVI in den Chromatogrammen war nicht satt gelb wie bei den normalen Δ^4 -3-Ketosteroiden, sondern citronengelb, meist mit einem leichten grünlichen Stich, je nach dem vorher verwendeten Lösungsmittelsystem. Dies wies auf eine 19-Hydroxyl-Gruppe hin, obwohl 19-Hydroxy-cortexon oder 17 α ,19-Dihydroxy-cortexon eine ganz deutlich blaugrüne NaOH-Fluoreszenz zeigen. Es scheint möglich, dass die Grün-Verschiebung bei entsprechend substituierten Derivaten weniger ausgeprägt ist.

Die Behandlung von XVIII in Pyridin mit Chromtrioxyd führte zu einer schwächer polaren Verbindung XIX mit R in Prop./Toluol 1,43 gegenüber 0,85 des Ausgangsmaterials (Corticosteron-acetat R = 1,0).

Δ^4 -3,11-Diketo-pregnen-17 α ,20 α ,21-triol (XXII), intern A 39. *Vorkommen:* In Rinder- und Schweine-NN.

Isolierung: a) Nach üblicher Extraktion von einer Tonne tiefgefrorenen Schweine-NN, Vorreinigung und Verteilungschromatographie an Kieselgur, kristallisierte XXII leicht aus den Fraktionen 142—163, erhalten durch Elution mit Benzol-Petroläther 4:1, Benzol und Benzol-Chloroform 24:1. Die Ausbeute betrug ca. 300 mg!

b) Aus Homogenaten von frischen Rinder- und Schweine-NN, welche mit Cortexon inkubiert worden waren⁹). Isolierung analog wie bei a), wobei aber zusätzlich präparative Papierchromatogramme verwendet wurden.

Eigenschaften: Aus Methanol-Äther und Aceton dünne Kristallplättchen vom Smp. 240—243°. $[\alpha]_D^{24} = +141^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,78$, Dioxan). $\lambda_{\max} = 239 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,11$ (Äthanol). Das IR.-Spektrum (CHCl_3) zeigt typische Banden für OH-, Δ^4 -3-Keto- und 6-Ring-Keto-gruppen (5,87 μ).

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ Ber. C 69,58 H 8,34% Gef. C 68,89 H 8,40%

Die Substanz hält offenbar hartnäckig Spuren von Feuchtigkeit zurück; das Gleiche gilt von ihrem Diacetat.

Sie zeigt kein Reduktionsvermögen (Blautetrazolium) und keine *Porter-Silber*-Reaktion, hingegen weist sie gelbe NaOH-Fluoreszenz und hellblaue H_3PO_4 -Fluoreszenz auf.

R_M -Werte siehe Tab. 1; XXII verhält sich in fast allen Systemen sehr ähnlich wie *Reichstein's* Substanz U und kann nicht mit absoluter Sicherheit davon unterschieden werden.

Mit überschüssigem Acetanhydrid in Pyridin entstand ein Diacetat XXIII, Smp. aus Aceton-Äther 277—280°. $[\alpha]_D^{25} = +99^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,722$, Dioxan). Das IR.-Spektrum (CHCl_3) zeigt Banden, die charakteristisch sind für OH-, Acetoxy-, 5-Ring-Keto- und α,β -ungesättigte Keto-Gruppen. Das Fingerprintgebiet ist deutlich verschieden von demjenigen von *Reichstein's* U-Diacetat. Die übrigen Eigenschaften sind denjenigen der freien Verbindung sehr ähnlich (RV, NaOH, etc.). R-Werte vgl. Tab. 2.

Mit der berechneten Menge Acetanhydrid in Pyridin bildete sich neben dem Diacetat ein Monoacetat XXIV, Smp. aus Aceton 246—248°. R-Werte vgl. Tab. 2.

Überführung von XXIV in Cortison-acetat (XXV) unter 2stündiger Einwirkung von Chromtrioxyd in Pyridin bei 20°, sowie Abbau von XXII mit Perjodsäure zu Adrenosteron (XXVI) und Formaldehyd: s. theoretischer Teil.

Δ^4 -3-Keto-pregnen-20,20,21-triol-18-säurelacton (18 \rightarrow 20) (XXVII), intern A 42. *Vorkommen und Isolierung:* Schweine-NN (Charge VIIIc; Waschwasser-extrakt). Die von der Silicagelchromatographie (siehe bei Verbindung X) anfallenden Fraktionen 12—16 (473 mg), eluiert mit Chloroform-Aceton 7:3, wurden an 30 g Silicagel in Chloroform rechromatographiert. Die mit Chloroform-Aceton 4:1 eluierten Fraktionen 14—17 (166,3 mg) und 18—22 (126,3 mg), die noch besonders Hydrocortison, Cortison und Corticosteron enthielten, wurden präparativ an 100 bzw. 40 Blatt Papier mit F/ CHCl_3 (bu) weiter aufgetrennt. Verbindung XXVII befand sich knapp vor Cortison. Die Eluate dieser Bande a wurden vereinigt und bestanden aus 56,2 mg amorphem Material. Dieses lieferte mit Aceton sofort kleine Kristallnadeln (8,5 mg).

Eigenschaften: Smp. 215—219° unter Gelbfärbung (Subl. ab ca. 190°). $\lambda_{\max} = 241 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,24$. $[\alpha]_D^{25} = +88^\circ \pm 6^\circ$ ($c = 0,5416$, Dioxan).

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$ Ber. C 69,97 H 7,85% Gef. C 69,44 H 8,23%

Reduktionsvermögen gegenüber BT ebenso stark wie Cortison, gegenüber Silberdiammin aber nur ca. $\frac{1}{8}$ so stark! NaOH-Fluoreszenz gelb, H_3PO_4 -Reaktion negativ; Reaktion mit Ferriehlorid-Kaliumferricyanid und nach *Porter-Silber* negativ; Dinitrophenylhydrazin-Reaktion positiv, SbCl_5 -Reaktion schwach hellblau, unverändert nach zusätzlicher Behandlung mit konz. H_2SO_4 .

Im IR.-Spektrum (in KBr oder CHCl_3) sind bemerkenswerterweise Banden festzustellen für OH (assoziiert), für 5-Ring-Lacton (5,65—5,67 μ !) und für α,β -ungesättigtes Keton, jedoch keine Banden für gesättigte Carbonylfunktionen (z. B. 20-Keton).

R_M -Werte siehe Tab. 1 und Fig. 1.

Bei der Behandlung mit überschüssigem Acetanhydrid in Pyridin entstand ein Acetat, das bedeutend schwächer polar war als Corticosteron-acetat (s. Tab. 2) und ungefähr wie 11-Dehydro-corticosteron-acetat lief. Unter Berücksichtigung der Polarität der freien Verbindung dürfte es sich um das Diacetat XXVIII handeln. Spurenweise entstand bei der Acetylierung auch ein Produkt mittlerer Polarität (RV +, NaOH gelb, $R_{Co.-ac.}$ 0,53), das wohl dem Monoacetat XXIX entspricht.

Konstitution: 1 mg der Verbindung XXVII wurde auf übliche Weise mit Perjodsäure oxydiert. Neben Formaldehyd, der einwandfrei als Dimedon-Verbindung gefasst und identifiziert werden konnte, entstand eine kristallisierte Säure XXX; sie reduzierte nicht mehr, zeigte aber UV.-Absorption und gelbe NaOH-Reaktion; im System F/CHCl₃ wanderte sie langsamer als Hydrocortison. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Aceton-Äther schmolz sie bei 150–152° unter starker Gasentwicklung, worauf die Schmelze rasch wieder zu Prismenbüschel erstarrte. Letztere wandelten sich bei weiterem Erhitzen in grobe Prismen um, die bei 245–249° unter Gelbfärbung schmolzen.

Die Säure XXX wurde mit Diazomethan in Äther-Aceton verestert. Der rohe Ester XXXI (0,7 mg) liess sich durch Chromatographie an 100 mg Al₂O₃ reinigen; er befand sich zur Hauptsache in der mit Benzol-Äther 1:1 eluierten Fraktion und kristallisierte ebenfalls (ca. 0,5 mg). Smp. 131–134°. Sein IR.-Spektrum (CS₂) zeigte weder OH- noch 5-Ring-Lacton-gruppe, hingegen die α,β -ungesättigte Ketogruppe und in grosser Intensität Estergruppen, so dass sehr wahrscheinlich 2 COOCH₃-Gruppen vorliegen.

Titration²⁷⁾ der Säure XXX: C₂₀H₂₆O₅ (346); Äqu. Gew. ber. 173; gef. 200, 173,5.

Bei der ersten Titration von 0,518 mg XXX in Cellosolve/Wasser 80:20 mit 0,1-n. Tetramethylammoniumhydroxyd blieben Spuren der Substanz ungelöst, so dass das Äquivalentgewicht mit 200 etwas zu hoch ausfiel. Hingegen stimmte das Äquivalentgewicht der Rücktitration mit 0,1-n. HCl mit 173,5 genau auf das Molekulargewicht von 346.

Die scheinbaren pK_1^* -Werte von 6,58 und 6,50 stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein, und die Differenz in den pK_2^* -Werten von 10,04 bzw. 9,87 ist dadurch bedingt, dass bei der ersten Titration Spuren ungelöst geblieben sind.

Der ΔpK^* -Wert von 3,46 bzw. 3,37 entspricht eindeutig der benachbarten Stellung der beiden Carboxylgruppen und mit grosser Wahrscheinlichkeit deren cis-Stellung.

A⁴-11 β -Hydroxy-androstendion-(3,17), intern A 2. *Vorkommen:* Rinder-, besonders aber Schweine-NN.

Isolierung: Von den aus Ansatz VII (Gemisch aus 760 kg Rinder- und Schweine-NN) auf übliche Weise gewonnenen Fraktionen 16–25 (3,412 g) der Verteilungschromatographie an Kieselgur (Elution mit Petroläther-Benzol 3:2) wurden 100 mg auf 10 Blättern Papier im B₁-System 3½ Std. chromatographiert. Die vor 11-Dehydro-corticosteron befindliche Zone b wurde eluiert und gab 18,4 mg Rückstand, aus welchem mit Äther-Aceton leicht 10 mg A 2 kristallisierten. In analoger Weise konnte es auch aus Ansatz VIII (Schweine-NN) und Ansatz III (Rinder-NN) isoliert werden. In Schweine-NN kommt es in etwa gleicher oder sogar grösserer Menge als Adrenosteron vor.

Eigenschaften: Smp. 190–195° (aus Äther-Aceton). UV.-Absorption bei 240 m μ , Reduktionsvermögen (BT) negativ, NaOH-Fluoreszenz gelb, Phosphorsäurefluoreszenz gelbgrün. Wandergeschwindigkeiten siehe Tab. 3. Nach Misch-Smp., papierchromatographischer Analyse und IR.-Spektrern erwies sich A 2 als völlig identisch mit *A⁴-11 β -Hydroxy-androstendion-(3,17)*³³⁾. Es besitzt keine Na-retinierende Wirkung.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung von Herrn Dr. H. Gysel ausgeführt. Die Infrarotspektren in Lösung verdanken wir Herrn Dr. E. Ganz, diejenigen in Kaliumbromid Herrn Dr. P. Zoller, Basel, bestens.

³³⁾ S. u. a. I. I. Salamon & K. Dobriner, J. clin. Endocrinol. **12**, 967 (1952); I. E. Bush, CIBA Found. Colloqu. on Endocrinol. **5**, 203 (1953); **7**, 210 (1953); J. Endocrinol. **9**, 95 (1953).

Für die Messung der pK-Werte sind wir Herrn Dr. *E. Heilbronner*, Zürich, und für die biologische Prüfung der neuen Nebennieren-Steroide Herrn Prof. *R. Meier* und Herrn Dr. *P. Desaulles* dankbar.

Bei der technischen Durchführung der mikrobiologischen Hydroxylierungen war uns Herr Dr. *E. Vischer*, bei derjenigen der vielen Papierchromatogramme Herr *E. von Arx* bestens behilflich.

SUMMARY.

Nine additional compounds of the pregnane series have been isolated from adrenals. Elucidation of their constitution showed that four are known compounds, but five are new. They are derived from the classical corticoids by hydroxylation in the 6 β - or 19-positions, by reduction of the 4,5-double bond or 20-keto group, and by oxydation of the angular 18-methyl group not merely to an aldehyde, as in aldosterone, but to a carboxyl group. The latter derivative is of special biochemical interest.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

240. Aminosäure-Analogue aus der Hydrazinreihe III¹⁾

von **K. Ronco**, **B. Prijs** und **H. Erlenmeyer**.

(13. X. 56.)

In vorangegangenen Mitteilungen¹⁾ berichteten wir über einige dem Phenylalanin bzw. Alanin entsprechende Hydrazinverbindungen.

Wie *F. E. Lehmann*²⁾ gezeigt hatte, sind von den α -Aminoketonen die vom Leucin abzuleitenden Verbindungen im Regenerationstest besonders wirksam. Es war daher interessant, auch die dieser Aminosäure entsprechenden Hydrazinderivate zu gewinnen.

Wir folgten bei der Darstellung dieser Verbindungen (IV a–c) im Prinzip der bisherigen Arbeitsweise, wobei jedoch einige Schwierigkeiten zu Modifikationen der früher gegebenen Darstellungsvorschriften führten.

Die N-Alkylierung mit Isobutyljodid erfolgt schwieriger als diejenige mit Methyljodid, so dass die bis jetzt angewandten Bedingungen¹⁾ nicht zu einem Umsatz führten. Bei Versuchen unter erhöhtem Druck im Bombenrohr bei 90° in Aceton konnten die gewünschten

¹⁾ *K. Ronco & H. Erlenmeyer*, Helv. **39**, 1045 (1956); *K. Ronco, B. Prijs & H. Erlenmeyer*, Helv. **39**, 1253 (1956).

²⁾ *F. E. Lehmann, A. Bretscher, H. Kühne, E. Sorkin, M. Erne & H. Erlenmeyer*, Helv. **33**, 1217 (1950); *F. E. Lehmann, R. Weber, H. Aebi, J. Bäumler & H. Erlenmeyer*, Helv. Physiol. Acta **12**, 147 (1954); *H. Erlenmeyer & F. E. Lehmann*, Experientia **12**, 472 (1949). Vgl. auch *H. Erlenmeyer & H. Kühne*, Helv. **32**, 370 (1949).