

137. Substratspezifische Hydroxylierungen von Steroiden mittels Pilz-Stämmen der Gattung *Gibberella*¹⁾

Mikrobiologische Reaktionen, 9. Mitteilung²⁾

von J. Urech, E. Vischer und A. Wettstein

(20. IV. 60)

In einer früheren Mitteilung³⁾ haben wir die Hydroxylierung von Cortexon in der 15 α -Stellung⁴⁾ mittels *Gibberella baccata* (WALLR.) SACC. beschrieben. In der Folge wurden die Studien mit diesem Pilz sowie mit *Gibberella saubinetti* (MONT.) SACC.⁶⁾, einem weiteren Vertreter derselben Gattung, fortgeführt. Über die Ergebnisse wird im folgenden kurz berichtet.

Bei der Inkubation von 11 β -Hydroxy- Δ^4 -androst-3,17-dion (Hydroadrenosteron, I) mit *G. baccata* konnte keine Umsetzung beobachtet werden; hingegen erhielten wir mit *G. saubinetti* als Hauptprodukt eine neue, nach ihrer Analyse monohydroxylierte Verbindung IIa vom Smp. 221–222° (korr.), $[\alpha]_D^{28} = +222^\circ$ (CHCl₃), die gemäss UV.- und IR.-Absorption neben Hydroxylgruppen die unveränderte Δ^4 -3-Keto- sowie die 17-Keto-Gruppe enthielt. Letzteres wurde durch den positiven Ausfall der Farbreaktion mit m-Dinitrobenzol⁸⁾ bestätigt. Bei der Behandlung mit Acetanhydrid und Pyridin bei Zimmertemperatur entstand ein Monoacetat IIb vom Smp. 206–207°, das gemäss IR.-Spektrum noch eine freie Carbinolgruppe aufwies. Diese konnte mittels Chromtrioxyd-Pyridin zum entsprechenden Keton IIIb oxidiert werden. Die gleiche Substanz erhielt man auch, wenn das Hydroxylierungsprodukt IIa zuerst unter milden Bedingungen (Chromtrioxyd-Pyridin, Zimmertemperatur, 4 Std.) zu IIIa dehydriert und anschliessend acetyliert wurde. Aus diesen Daten ging hervor, dass die neu eingeführte Hydroxylgruppe sekundär sein musste.

Da die UV.-Absorption von Substanz IIa in alkalischem Milieu unverändert blieb, fielen die Stellungen 6 und 7 für die neue Hydroxylgruppe aus. Weil die Verbindung IIa durch Perjodsäure nicht angegriffen wurde, und weil die Substanz IIIb gegenüber Wismuthsesquioxyd⁹⁾ beständig war, konnten weiter die Stellungen 2, 12 und 16 ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass sich die Acetylierungsprodukte

¹⁾ 168. Mitt. Über Steroide; 167. Mitt. siehe J. SCHMIDLIN & A. WETTSTEIN, Helv. 43, 973 (1960).

²⁾ 8. Mitt. siehe E. VISCHER, J. SCHMIDLIN & A. WETTSTEIN, Experientia 12, 52 (1956).

³⁾ CH. MEYSTRE, E. VISCHER & A. WETTSTEIN, Helv. 38, 381 (1955).

⁴⁾ Die in der Arbeit³⁾ angegebene vorläufige sterische Zuordnung der eingeführten Hydroxylgruppen am Kohlenstoffatom 15 wurde seither revidiert⁵⁾.

⁵⁾ A. WETTSTEIN, Experientia 12, 465 (1955); E. VISCHER & A. WETTSTEIN, Adv. Enzymol. 20, 237 (1958).

⁶⁾ Wir danken den Herren Prof. E. GÄUMANN und Dr. E. MÜLLER bestens für die Überlassung und Bestimmung dieses Stammes.

⁷⁾ S. H. EPPSTEIN, P. D. MEISTER, H. M. LEIGH, D. H. PETERSON, H. C. MURRAY, L. M. REINEKE & A. WEINTRAUB, J. Amer. chem. Soc. 76, 3174 (1954).

⁸⁾ G. OERTEL, Acta endocrinol. 16, 263 (1954).

⁹⁾ W. RIGBY, J. chem. Soc. 1957, 793.

IIb und IIIb mittels Zink in Eisessig nicht entacetylieren liessen, bestätigte diese Annahmen¹⁰⁾. Somit blieben lediglich die Kohlenstoffatome 1 und 15 für die Platzierung der neuen Hydroxylfunktion übrig.

Bei der Mesylierung von IIa und anschliessender Abspaltung von Methylsulfonsäure wurde als Hauptprodukt eine doppelt ungesättigte Verbindung IV erhalten. Durch Hydrierung mit Palladiumkatalysator in Feinsprit konnte sie in die gleiche gesättigte Substanz V übergeführt werden, die auch bei der analogen Hydrierung von Hydroadrenosteron entstand. Im Papierchromatogramm zeigte Verbindung IV eine normale Natriumhydroxydfluoreszenz¹¹⁾; im UV. wies sie eine erhöhte Extinktion bei 238 m μ und im IR. eine zusätzliche Bande bei 5,85 μ , und nicht die für $\Delta^{1,4}$ -3-Ketone typische Absorption zwischen 5,95 und 6,25 μ auf. Diese Befunde deuten auf die Anwesenheit einer zweiten α,β -ungesättigten Ketongruppierung hin. Wenn sich somit Stellung 1 für die mikrobiologisch eingeführte Hydroxylgruppe ausschliessen lässt, so muss sich letztere am Kohlenstoffatom 15 befinden und zwar, wegen des schwach positiven molekularen Drehungsbeitrages¹²⁾ (+ 62), in 15 α -Stellung. Bei dem aus Hydroadrenosteron (I) mittels *G. saubinetti* erhaltenen Hydroxylierungsprodukt IIa handelt es sich also um 11 β ,15 α -Dihydroxy- Δ^4 -androst-3,17-dion (IIa) und bei den beschriebenen Umsetzungsprodukten um die im Formelschema aufgeführten Substanzen IIb–V. Ein weiterer Beweis für die Richtigkeit dieser Formulierung konnte auf mikrobiologischem Wege erbracht werden, indem die Inkubation von 15 α -Hydroxy- Δ^4 -androst-3,17-dion (VI)¹³⁾ mit einem 11 β -hydroxylierenden Stamm von *Cunninghamella elegans* LENDNER u. a. ebenfalls die Substanz IIa lieferte.

Bei der beschriebenen Umsetzung von Hydroadrenosteron (I) mit *G. saubinetti* wurde in ganz minimalen Mengen noch ein zweites monohydroxyliertes Produkt VII vom Smp. 275–284°, $[\alpha]_D^{26} = +132^\circ$ (CHCl₃-CH₃OH) gebildet, eine Substanz, die in anderem Zusammenhang und in besserer Ausbeute auch bei der Inkubation von Hydroadrenosteron mit *Rhizoctonia solani* KÜHN erhalten worden war. Auch in diesem Hydroxylierungsprodukt waren gemäss UV.- und IR.-Absorption das α,β -ungesättigte Keton und die 17-Ketogruppe unverändert erhalten. Es bildete ein Monoacetat VIII vom Smp. 195–196°, das gemäss IR.-Spektrum noch eine freie Hydroxyl-

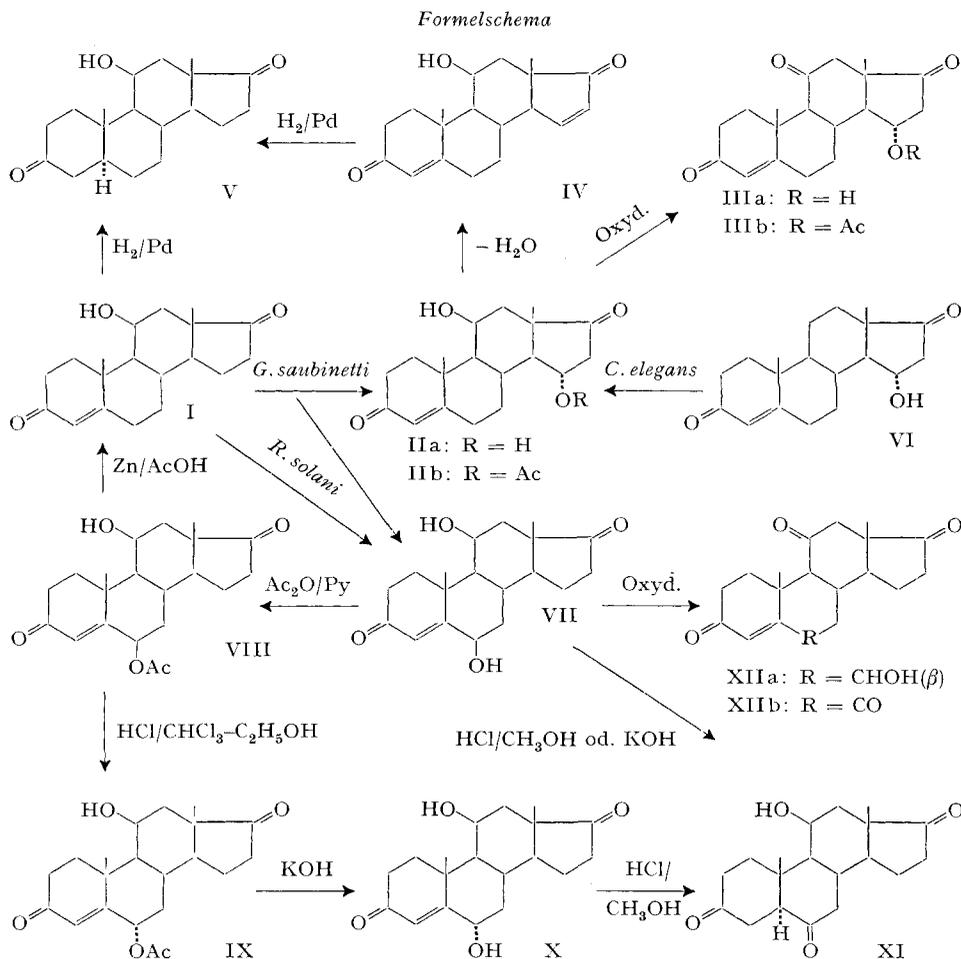
¹⁰⁾ Vgl. R. S. ROSENFELD & T. F. GALLAGHER, J. Amer. chem. Soc. 77, 4367 (1955).

¹¹⁾ Hingegen ist die für 17-Ketosteroide ohne Substitution an C-16 charakteristische Ockerbisviolett färbung mit m-Dinitrobenzol gestört (vgl. Anmerkung ⁸⁾).

¹²⁾ Die Drehungsbeiträge der 15 α -Hydroxyl-Gruppe in Derivaten von Progesteron, Cortexon, Substanz S (REICHSTEIN) und Δ^4 -Androst-3,17-dion bewegen sich zwischen + 47 und + 130, während die entsprechenden 15 β -Hydroxylgruppen durchweg negative Drehungsbeiträge (Werte von – 47 bis – 123) aufweisen; vgl. J. FRIED, R. W. THOMA, D. PERLMAN, J. E. HERZ & A. BORMAN, Rec. Progr. Hormone Res. 11, 149 (1955); S. H. EPPSTEIN, P. D. MEISTER, H. C. MURRAY, D. H. PETERSON, Vitamines & Hormones 14, 359 (1956); H. L. HERZOG, M. J. GENTLES, W. CHARNEY, D. SUTTER, E. TOWNLEY, M. YUDIS, P. KABASAKALIAN & E. B. HERSHBERG, J. org. Chemistry 24, 691 (1959); CH. MEYSTRE, E. VISCHER & A. WETTSTEIN, Helv. 38, 381 (1955) mit Berichtigung in Arbeiten ⁵⁾; S. BERNSTEIN, L. I. FELDMAN, W. S. ALLEN, R. H. BLANK & C. E. LINDEN, Chemistry & Ind. 1956, 111.

¹³⁾ Diese Verbindung wurde neben dem 6 β -Hydroxylierungsprodukt aus Δ^4 -Androst-3,17-dion ebenfalls durch Inkubation mittels *G. saubinetti* erhalten (vgl. Tab.). Wir danken Herrn Dr. CH. TAMM, Basel, für Überlassung einer Vergleichsprobe von 15 α -Hydroxy- Δ^4 -androst-3,17-dion.

gruppe enthielt, und das bei der Behandlung mit Zink in Eisessig in Hydroadrenosteron (I) zurückgeführt werden konnte. Bei milder Oxydation des Hydroxylierungsproduktes erhielt man zwei Substanzen XIIa und b, von welchen die eine (XIIa) noch eine freie Hydroxylgruppe aufwies. In der andern (XIIb) waren sämtliche Hydroxylfunktionen zu den entsprechenden Ketogruppen oxydiert, und sie zeigte



im UV. die für 3,6-Diketo- Δ^4 -steroides typische Absorption¹⁴⁾ (λ_{\max} neutral 248 μ , alkalisch 258 μ und 378 μ , nach Ansäuern 243 μ und 308 μ). Diese Befunde, sowie die Tatsache, dass auch das Hydroxylierungsprodukt in alkalischer Lösung eine UV.-Absorption bei 258 μ und bei 380 μ zeigte, bewiesen, dass die neu eingeführte Hydroxylgruppe sich am Kohlenstoffatom 6 befand. Für die sterische Zuordnung waren folgende Überlegungen massgebend:

¹⁴⁾ A. S. MEYER, J. org. Chemistry 20, 1240 (1955).

Es ist bekannt¹⁵⁾, dass 6 β -Acetoxy- Δ^4 -3-ketosteroide sowohl bei alkalischer als auch bei saurer Hydrolyse in die entsprechenden gesättigten 3,6-Diketosteroide übergeführt werden. Bei den entsprechenden 6 α -Acetoxy-Derivaten tritt diese Reaktion vorwiegend unter sauren Bedingungen ein, während im alkalischen Milieu überwiegend die normalen Verseifungsprodukte, die 6 α -Hydroxysteroiden, entstehen. Weiter lassen sich 6 β -Acetoxy- Δ^4 -3-ketosteroide mit Chlorwasserstoff in Chloroform-Äthanol unter Ausschluss von Feuchtigkeit zu den entsprechenden 6 α -Acetoxy-Verbindungen isomerisieren^{15) 16)}.

Aus dem Acetat VIII des Hydroxylierungsproduktes konnte unter den zuletzt genannten Bedingungen eine isomere Verbindung IX vom Smp. 248–249°, $[\alpha]_D^{22} = +171^\circ$ (CHCl₃) erhalten werden, die bei der alkalischen Verseifung in quantitativer Ausbeute Substanz X vom Smp. 269–272°, $[\alpha]_D^{26} = +179^\circ$ (CHCl₃-CH₃OH), lieferte, welche ihrerseits isomer mit dem Hydroxylierungsprodukt VII war. Wurde diese mit methanolischer Salzsäure behandelt, bildete sich Substanz XI vom Smp. 281–284°, $[\alpha]_D^{26} = +85^\circ$ (CHCl₃), die keine Absorption im UV. zeigte. Die gleiche Verbindung wurde bei der Behandlung des Hydroxylierungsproduktes VII mit methanolischer Salzsäure oder mit Alkali gebildet.

Aus diesen Befunden geht eindeutig hervor, dass beim zweiten Hydroxylierungsprodukt die neu eingeführte Hydroxylgruppe 6 β -Konfiguration besitzen muss, und dass es sich dabei um das 6 β , 11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3, 17-dion (VII)¹⁷⁾ handelt. Die mittels Chlorwasserstoff-Behandlung aus dem Acetat VIII erhaltene isomere Substanz stellt somit das entsprechende 6 α -Acetoxy-Derivat IX und sein Verseifungsprodukt mit Alkali die 6 α -Hydroxy-Verbindung X dar. Das Umlagerungsprodukt vom Smp. 281–284° ist die entsprechende gesättigte 3,6-Diketo-Verbindung XI, und bei den mittels Chromsäure erhaltenen Oxydationsprodukten handelt es sich um das 6 β -Hydroxy-trion XIIa und das Tetraon XIIb. Die für diese Substituenten gefundenen molekularen Drehungsbeiträge betragen für 6 α -OH = –74, 6 β -OH = –225, 6 α -OAc = –28 und 6 β -OAc = –142 und sind in guter Übereinstimmung mit bekannten Daten^{15) 16)}.

G. saubinetti besitzt also die Fähigkeit, Steroide sowohl in 15 α - als auch in 6 β -Stellung zu hydroxylieren. Dies liess sich durch Versuche, in denen eine Reihe weiterer Steroide mit diesem Pilzstamm inkubiert wurde, bestätigen. Wie aber die Tabelle zeigt, hängt der sterische Verlauf der Hydroxylierung weitgehend von der Konstitution der einzelnen Substrate ab. Es scheint, dass die 15 α -Hydroxylierung durch das Vorhandensein und die Raumbeanspruchung eines Substituenten in 17 α -Stellung erschwert bzw. verunmöglicht wird. Mit *G. baccata* konnte bei den ver-

¹⁵⁾ a) C. P. BALANT & M. EHRENSTEIN, J. org. Chemistry 16, 1050 (1951); b) P. T. HERZIG & M. EHRENSTEIN, *ibid.* 17, 1587 (1952).

¹⁶⁾ L. F. FIESER, J. Amer. chem. Soc. 75, 4377 (1953).

¹⁷⁾ Die gleiche Verbindung wurde von A. S. MEYER, Acta endocrinol. 25, 377 (1957), beschrieben. Die dort angegebenen Eigenschaften dieser Substanz sowie der früher [A. S. MEYER, *ibid.* 18, 148 (1955)] für ihr Monoacetat publizierte Smp. stimmen gut mit unseren Befunden überein. Hingegen scheint es möglich, dass es sich bei der von F. G. PÉRON & R. I. DORFMAN, Arch. Biochemistry Biophysics 67, 490 (1957), beschriebenen, aus Meerschweinchenharn isolierten und als 6 β , 11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3, 17-dion angesprochene Substanz gemäss den publizierten angesprochene Daten (Monoacetat Smp. 239–241°) um das 6 α -Isomere handeln könnte, für dessen Monoacetat wir Smp. 248–249° gefunden haben.

wendeten Substraten nie 6 β -Hydroxylierung beobachtet werden. Diese Umsetzungen stellen also ein weiteres Beispiel von Substratspezifität dar, wie sie auch in andern Fällen mikrobiologischer Reaktionen von Steroiden beobachtet worden ist.

Mikrobiologische Hydroxylierungen von Steroiden

Substrat	<i>G. bacata</i>		<i>G. saubinetti</i>	
	6 β -OH	15 α -OH	6 β -OH	15 α -OH
Hydroadrenosteron . .	keine Umsetzung		< 1%	28%
Δ^4 -Androstendion . .	0	2%	13%	21%
17 α -Methyltestosteron .	keine Umsetzung		90% ⁷⁾	0
Cortexon	0	70%	6%*	50%
17 α -Hydroxy-cortexon .	0	2-4%	26%	5%
Hydrocortison	0	0	0	0

*) Die Bildung des 6 β -Hydroxyderivates scheint nährlösungsabhängig zu sein.

Experimenteller Teil¹⁸⁾

11 β ,15 α -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (IIa): 8 l einer Nährlösung, enthaltend auf 1 l Leitungswasser 10 g Rohglucose, 10 g Distillers solubles, 5 g NaCl, 1 g NaNO₃ und 10 g CaCO₃, wurden in zwei Schüttelgefäßen sterilisiert und mit *Gibberella saubinetti* beimpft. Nach zweitägigem Schütteln bei 27° gab man zu den gut entwickelten Kulturen unter sterilen Bedingungen je 1 g Hydroadrenosteron (I) in 20 ml Aceton und liess 3 Tage bei der gleichen Temperatur weiterschütteln. Dann wurde das Mycel unter Zugabe von Celite abgenutscht und mit Essigester und warmem Aceton gewaschen. Letzteres wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit den andern Filtraten vereinigt. Nach dem Abtrennen der Essigesterphase schüttelte man die wässrige Lösung noch zweimal mit Essigester aus. Die organischen Auszüge wusch man mit 10-proz. NaCl-Lösung, trocknete sie über Na₂SO₄ und dampfte sie im Vakuum ein. Der Rückstand von 9,2 g wurde in 200 ml 90-proz. wässrigem Methanol aufgenommen, worauf diese Lösung mit Petroläther (Sdp. 50–70°) wiederholt ausgeschüttelt und dann im Vakuum auf 60 ml eingeeengt wurde. Man gab 200 ml Wasser zu und extrahierte viermal mit je 200 ml Methylenchlorid. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels blieben 4,7 g eines amorphen braunen Rückstandes, welcher gemäss Papierchromatogramm neben Ausgangsmaterial ein stark polares Umsetzungsprodukt (Rf in Formamid/Chloroform 0,34) sowie in kleinen Mengen eine weitere UV.-absorbierende Substanz enthielt. In den Petroläther-Auszügen waren keine Steroide nachweisbar. Man chromatographierte den Rückstand an 190 g desaktiviertem Silicagel (erhalten durch Zugabe von 15 Gew.-% dest. Wasser zu Silicagel, welches während 24 Std. auf 140° erhitzt worden war), wobei man mit Methylenchlorid-Aceton-Gemischen von steigendem Aceton-Gehalt eluierte. Aus den Eluaten 19:1 konnten 160 mg Adrenosteron (identisch mit einem Vergleichspräparat nach Misch-Smp., IR.-Spektrum und papierchromatographischem Verhalten) erhalten werden, während die Fraktionen 9:1 Ausgangsmaterial enthielten. Mit 1:1-Gemischen liess sich das Hauptumsetzungsprodukt eluieren. Durch Kristallisation aus Aceton-Äther erhielt man 592 mg 11 β ,15 α -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (IIa) vom Smp. 221–222°; $[\alpha]_D^{28} = +222 \pm 1^\circ$ (c = 1,10 in Chloroform), M_D = +707.

C₁₉H₂₆O₄ (318,40) Ber. C 71,67 H 8,23% Gef. C 71,84 H 8,14%

UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{max} 242 m μ ($\epsilon = 16420$). Das IR.-Spektrum in Nujol zeigte Banden bei 2,92 μ (OH), 5,73 μ (17-Keton), 6,01 μ (3-Keton) und 6,18 μ (Δ^4). R_s-Werte (S = Hydrocortison): Formamid/Benzol-Chloroform-(1:1)¹⁹⁾ 1,23, Formamid-Chloroform¹⁹⁾ 1,45,

¹⁸⁾ Alle Smp. sind korrigiert. Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-double-beam-Spektrograph, Mod. 21, und diejenigen im UV. mit einem CARY-Spektralphotometer, Mod. 14, aufgenommen.

¹⁹⁾ A. ZAFFARONI, Rec. Progr. Hormone Res. 8, 51 (1953).

BUSH C²⁰) 0,70. Die Substanz in wässrig-methanolischer Lösung verbrauchte im Vergleich zu einem Blindversuch lediglich 6% d. Th. an Perjodsäure. Aus den Mutterlaugen der Methylenchlorid-Aceton-(1:1)-Fraktionen konnten durch papierchromatographische Trennung im System Formamid/Chloroform¹⁹) 18 mg 6 β ,11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androst-3,17-dion (VII, siehe unten), isoliert werden.

15 α -Monoacetat IIb: 80 mg 11 β ,15 α -Dihydroxy- Δ^4 -androst-3,17-dion wurden über Nacht mit 0,5 ml Acetanhydrid und 2,5 ml abs. Pyridin stengelassen. Hierauf versetzte man das Reaktionsgemisch mit Eis, schüttelte es mit Methylenchlorid aus, wusch die Auszüge mit verd. Salzsäure, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser neutral und trocknete sie mit Natriumsulfat. Nach Verdampfen des Lösungsmittels verblieben 110 mg rohes 15 α -Monoacetat, welches aus Aceton-Äther umkristallisiert bei 206–207° schmolz; $[\alpha]_D^{27} = +191 \pm 1^\circ$ ($c = 0,812$ in Chloroform), $M_D = +670$. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} 241 m μ ($\epsilon = 15900$). Das IR.-Spektrum in Methylenchlorid zeigte Banden bei 2,75 μ (OH), 5,74 μ (17-Keton und Acetat), 5,97 μ (3-Keton), 6,16 μ (Δ^4) und 8,15 μ (Acetat).

$C_{21}H_{28}O_5$ (360,44) Ber. C 69,97 H 7,83% Gef. C 69,69 H 7,77%

15 α -Hydroxy- Δ^4 -androst-3,11,17-trion (IIIa): Zum Komplex von 63 mg Chromtrioxyd in 1 ml abs. Pyridin gab man langsam unter Eiskühlung die Lösung von 42 mg 11 β ,15 α -Dihydroxy- Δ^4 -androst-3,17-dion in 2 ml abs. Pyridin und schüttelte 2 Std. bei Zimmertemperatur. Hierauf versetzte man das Reaktionsgemisch mit 10 ml Eiswasser, schüttelte mit Methylenchlorid aus und wusch mit eiskalter verd. Salzsäure, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser neutral. Die mit Natriumsulfat getrocknete tiefgelbe Methylenchlorid-Lösung wurde durch eine Säule von 4 g desaktiviertem Silicagel filtriert, wobei ein farbloses Filtrat resultierte, welches beim Eindampfen 34 mg rohes Oxydationsprodukt lieferte. Dieses schmolz, aus Aceton-Äther umkristallisiert, bei 221–222°. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} 238 m μ ($\epsilon = 15250$). Das IR.-Spektrum in Methylenchlorid wies Banden bei 2,75 μ (OH), 5,71 μ (17-Keton), 5,82 μ (11-Keton), 5,97 μ (3-Keton) und 6,15 μ (Δ^4) auf.

$C_{19}H_{24}O_4$ (316,38) Ber. C 72,12 H 7,65% Gef. C 72,16 H 7,43%

8 mg dieses Oxydationsproduktes wurden mit 5 mg Bi₂O₃ in 1 ml Eisessig 16 Std. auf 100° erwärmt. Es schied sich dabei kein metallisches Wismuth ab. Nach Verdünnung des Reaktionsgemisches mit Wasser und Extraktion mit Methylenchlorid konnte unverändertes Ausgangsmaterial isoliert werden.

15 α -Acetoxy- Δ^4 -androst-3,11,17-trion (IIIb): – a) *Durch Acetylierung von 15 α -Hydroxy- Δ^4 -androst-3,11,17-trion (IIIa)*: 6 mg IIIa in 0,5 ml abs. Pyridin wurden mit 0,1 ml Acetanhydrid über Nacht bei Zimmertemperatur stengelassen. Die gewohnte Aufarbeitung ergab 7,5 mg rohes Acetylierungsprodukt.

b) *Durch Oxydation von 11 β -Hydroxy-15 α -acetoxy- Δ^4 -androst-3,17-dion (IIb)*: Zum Chromtrioxyd-Pyridin-Komplex, gebildet aus 50 mg Chromtrioxyd und 0,8 ml Pyridin, gab man 40 mg IIb in 1 ml Pyridin, schüttelte die Suspension über Nacht bei Zimmertemperatur und arbeitete analog dem Acetylierungsversuch von 15 α -Hydroxy- Δ^4 -androst-3,11,17-trion auf. Die beiden nach a) und b) erhaltenen Produkte wurden papierchromatographisch verglichen und erwiesen sich sowohl Rf-mässig als auch nach Farbreaktionen identisch. Rf-Werte: Formamid/Cyclohexan-Benzol-(1:1)¹⁹) 0,35, Propylenglykol/Toluol²¹) 0,82, Bush B₁²⁰) 0,34.

Abspaltung der mikrobiologisch eingeführten 15 α -Hydroxylgruppe und anschliessende Hydrierung: 27 mg 11 β ,15 α -Dihydroxy- Δ^4 -androst-3,17-dion (IIa) in 2 ml abs. Pyridin wurden mit 10 Tropfen Methylsulfonylchlorid 5 Std. bei 0° stengelassen. Man goss die gelbe Lösung auf Eis, schüttelte sie mit Methylenchlorid aus und wusch die Auszüge mit eiskalter verd. Salzsäure, Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum verblieben 40 mg rohes Mesylat. Dieses wurde ohne weitere Reinigung mit einer 10-proz. Lösung von wasserfreiem Lithiumchlorid in Dimethylformamid 1½ Std. auf dem siedenden Wasserbad unter Feuchtigkeitsausschluss erwärmt. Hierauf engte man die Reaktionslösung im Vakuum auf ca. 2 ml ein, verdünnte sie mit 20 ml Wasser und schüttelte sie mit Methylenchlorid aus. Die mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschenen Extrakte

²⁰) I. E. BUSH, Biochem. J. 50, 370 (1952).

²¹) R. B. BURTON, A. ZAFFARONI & E. H. KEUTMANN, J. biol. Chemistry 188, 763 (1951).

wurden durch eine kleine Säule von 1 g desaktiviertem Silicagel filtriert und hinterliessen beim Eindampfen im Vakuum 25 mg eines farblosen öligen Produktes. Die papierchromatographisch festgestellte UV.-absorbierende Hauptkomponente IV liess sich an 20 Blatt WHATMAN-Papier Nr. 1 mit dem System Formamid/Benzol in einheitlicher, amorpher Form isolieren. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} 238 m μ ($\epsilon = 19600$); IR.-Spektrum in Methylenchlorid: Banden bei 2,76 μ (OH), 5,85 μ (ungesättigtes 5-Ring-Keton), 5,97 μ (3-Keton), 6,15 μ und 6,30 μ (konjug. Doppelbindungen).

4,5 mg dieser Substanz wurden in Feinsprit mit 5 mg Palladium auf Calciumcarbonat (5-proz.) hydriert. Die Wasserstoff-Aufnahme betrug 0,97 ml (ber. 0,67 ml für 2 Mol.). Parallel dazu wurde Hydroadrenosteron unter genau gleichen Bedingungen hydriert. Nach Filtration und Eindampfen erhielt man in beiden Fällen Produkte, welche gemäss ihrem Smp. und papierchromatographischen Verhalten in 5 verschiedenen Systemen identisch waren und als das 11 β -Hydroxy-androstan-3,17-dion (V), Smp. 223–225°, $[\alpha]_D^{25} = +97^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,607$ in Chloroform)²²⁾ identifiziert werden konnten.

6 β -Hydroxy- und 15 α -Hydroxy- Δ^4 -androsten-3,17-dion: Zu 8 Liter einer gut entwickelten Kultur von *Gibberella saubinetii*, verteilt auf zwei Schüttelgefässe (Nährlösung und Züchtung wie oben) gab man unter sterilen Bedingungen 2 g Δ^4 -Androsten-3,17-dion in 20 ml Aceton und liess bei 26° 8 Std. schütteln. Es wurde gemäss den oben gemachten Angaben aufgearbeitet und man erhielt 4,468 g Rohextrakt. Dieser wurde an 180 g desaktiviertem Silicagel chromatographiert: Mit Methylenchlorid-Aceton-Gemisch 98:2 liessen sich 750 mg Δ^4 -Androsten-3,17-dion eluieren. Die Eluate mit 19:1-Gemisch gaben nach Umkristallisation aus Aceton-Petroläther 265 mg 6 β -Hydroxy- Δ^4 -androsten-3,17-dion vom Smp. 192–193,5°, $[\alpha]_D^{29} = +107 \pm 2^\circ$ ($c = 0,698$ in Chloroform)^{15b)}²³⁾. Der Rückstand der Eluate mit Methylenchlorid-Aceton (9:1) und (4:1), total 673 mg, wurde aus Aceton umkristallisiert und lieferte 440 mg 15 α -Hydroxy- Δ^4 -androsten-3,17-dion (VI) vom Smp. 195–196°²⁴⁾. Der Misch-Smp. mit authentischem Material¹³⁾ zeigte keine Depression.

11 β -Hydroxylierung von 15 α -Hydroxy- Δ^4 -androsten-3,17-dion (VI): In einem 500-ml-ERLENMEYER-Kolben mit 100 ml Nährlösung, enthaltend pro l Leitungswasser 2 g NaNO₃, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 0,5 g KCl, 50 g Glucose und 1 g Difco-Hefeextrakt, liess man eine Kultur von *Cunninghamella elegans* anwachsen. Nach zwei Tagen hatte sich der Pilz gut entwickelt, worauf man unter sterilen Bedingungen 30 mg 15 α -Hydroxy- Δ^4 -androsten-3,17-dion (VI) in 1,5 ml Aceton zugab. Nach dreitägiger Inkubation bei 27° trennte man vom Mycel ab, extrahierte das Kulturfiltrat mehrmals mit Essigester, wusch die Extrakte mit 10-proz. Natriumchlorid-Lösung und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Die qualitative papierchromatographische Kontrolle in verschiedenen Systemen liess neben Ausgangsmaterial und anderen Umsetzungsprodukten eine Substanz erkennen, welche sich wie 11 β ,15 α -Dihydroxy- Δ^4 -androsten-3,17-dion (IIa) verhielt. Diese konnte mittels präparativer Papierchromatographie (15 Blatt, System Formamid/Chloroform) in reiner Form isoliert werden, Smp. 218–220°, und erwies sich als identisch mit dem bei der Hydroxylierung von Hydroadrenosteron mit *G. saubinetii* erhaltenen 11 β ,15 α -Dihydroxy- Δ^4 -androsten-3,17-dion (Mischprobe, papierchromatographischer Vergleich in 6 Systemen).

6 β ,11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androsten-3,17-dion (VII): 5 g Hydroadrenosteron (I) wurden in 5 Schüttelgefässen, enthaltend je 4 l einer 3 Tage alten Kultur von *Rhizoctonia solani*, 3 Tage bei 26° inkubiert. Die verwendete Nährlösung enthielt auf 1 l Leitungswasser 2,6 g Weinsäure, 2,6 g Ammoniumtartrat, 0,17 g Ammoniumsulfat, 0,4 g sek. Ammoniumphosphat, 0,4 g Kaliumcarbonat, 0,27 g Magnesiumcarbonat, 50 g Glucose und 1 g Difco-Hefeextrakt. Die übliche Aufarbeitung lieferte 7,85 g Rohextrakt, welcher an 340 g desaktiviertem Silicagel unter Verwendung

²²⁾ R. W. JEANLOZ, H. LEVY, R. P. JACOBSEN, O. HECHTER, K. SCHENKER & G. PINCUS, J. biol. Chemistry 203, 453 (1953); A. S. MEYER, O. G. RODGERS & G. PINCUS, Endocrinology 53, 245 (1953).

²³⁾ C. AMENDOLLA, G. ROSENKRANTZ & F. SONDHEIMER, J. chem. Soc. 1954, 1226; A. S. MEYER, M. HAYANO, M. C. LINDBERG, M. GUT & O. G. RODGERS, Acta endocrinol. 18, 148 (1955).

²⁴⁾ Vgl. S. BERNSTEIN, L. I. FELDMAN, W. S. ALLEN, R. H. BLANK & C. E. LINDEN, Chemistry & Ind. 1956, 111; A. GUBLER & CH. TAMM, Helv. 41, 301 (1958).

von Gemischen von Methylchlorid mit steigendem Gehalt an Aceton chromatographiert wurde. Aus den Eluaten mit Methylchlorid-Aceton-(4:1) liessen sich nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton 1,027 g $6\beta,11\beta$ -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (VII) gewinnen; Smp. 275–284°; $[\alpha]_D^{25} = +132 \pm 1^\circ$ ($c = 0,912$ in Chloroform-Methanol (1:1); $M_D = +419$).

$C_{19}H_{26}O_4$ (318,40) Ber. C 71,67 H 8,23% Gef. C 71,74 H 8,17%

UV.-Spektr.: in Äthanol: λ_{\max} 236 m μ ($\epsilon = 13180$); in alkalischem Äthanol²⁵) nach 24-stündigem Stehenlassen bei 22° und 1½-stündigem Erwärmen auf 60°: $\lambda_{1\max}$ 258 m μ ($\epsilon = 10875$), $\lambda_{2\max}$ 378 m μ ($\epsilon = 8640$), λ_{\min} 310 m μ ($\epsilon = 4290$); in konz. Schwefelsäure: unmittelbar nach dem Lösen: $\lambda_{1\max}$ 280 m μ ($\epsilon = 3875$), $\lambda_{2\max}$ 351 m μ ($\epsilon = 9750$), nach 45 Min.: $\lambda_{1\max}$ 265 m μ ($\epsilon = 4065$), $\lambda_{2\max}$ 340 m μ ($\epsilon = 16000$), nach 120 Min.: $\lambda_{1\max}$ 265 m μ ($\epsilon = 4060$), $\lambda_{2\max}$ 340 m μ ($\epsilon = 16310$). Das IR.-Spektrum in Nujol zeigte Banden bei 2,95 μ (OH), 5,72 μ (17-Keton), 5,97 μ (3-Keton) und 6,16 μ (Δ^4). R_S -Werte (S = Hydrocortison): Formamid/Chloroform¹⁹) 1,55, BusH C²⁰) 0,86, BusH B₅²⁰) 0,96, Formamid/Benzol-Chloroform (1:1)¹⁹) 1,75.

Bei direktem Vergleich erwies sich die Verbindung als identisch mit dem bei der Umsetzung von Hydroandrogenosteron mittels *G. saubinetti* erhaltenen Nebenprodukt (siehe oben).

6β -Monoacetat VIII: 30 mg $6\beta,11\beta$ -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (VII) wurden in 1,5 ml abs. Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid über Nacht bei Raumtemperatur acetyliert. Das Acetat schmolz nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther bei 195–196°; $[\alpha]_D^{25} = +139 \pm 3^\circ$ ($c = 0,761$ in Chloroform), $M_D = +502$. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} 235 m μ ($\epsilon = 14450$). Das IR.-Spektrum in Methylchlorid zeigte Banden bei 2,75 μ (OH), 5,75 μ (17-Keton und Acetat), 5,95 μ (3-Keton), 6,15 μ (Δ^4), 8,13 μ und 8,16 μ (Acetat).

$C_{21}H_{28}O_5$ (360,44) Ber. C 69,97 H 7,83% Gef. C 69,66 H 7,66%

6β -Hydroxy- Δ^4 -androgen-3,11,17-trion und Δ^4 -Androgen-3,6,11,17-tetraon (XIIa und b): 40 mg $6\beta,11\beta$ -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (VII) in 1 ml abs. Pyridin wurden zum Komplex von 60 mg Chromtrioxyd in 1 ml abs. Pyridin gegeben und unter Feuchtigkeitsausschluss 18 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Man versetzte das Reaktionsgemisch mit 10 ml Wasser, schüttelte mit Methylchlorid aus und wusch die Auszüge mit eiskalter, verd. Salzsäure, eiskalter 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser neutral. Die stark gelb gefärbte Methylchlorid-Lösung liess sich durch Filtration durch eine Säule von 7 g desaktiviertem Silicagel vollständig entfärben. Das Filtrat hinterliess beim Eindampfen im Vakuum 34 mg eines farblosen amorphen Rückstandes, welcher an 20 Blatt WHATMAN-Papier, Nr. 1, im System Formamid/Benzol-Chloroform (1:2) aufgetrennt wurde. Die beiden UV.-absorbierenden Hauptkomponenten mit Rf 0,60 (Zone a) und Rf 0,90 (Zone b) wurden eluiert. Der Rückstand des Eluates aus der Zone a, 22 mg, wurde aus Aceton-Hexan kristallisiert und gab 6β -Hydroxy- Δ^4 -androgen-3,11,17-trion (XIIa) in farblosen Plättchen vom Smp. 234–235°; $[\alpha]_D^{25} = +205 \pm 2^\circ$ ($c = 0,92$ in Chloroform), $M_D = +650$. UV.-Spektren: in Äthanol: λ_{\max} 232 m μ ($\epsilon = 13750$); in alkalischem Äthanol²⁵) nach 24stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur: $\lambda_{1\max}$ 258 m μ ($\epsilon = 8860$), $\lambda_{2\max}$ 378 m μ ($\epsilon = 6140$), λ_{\min} 304 m μ ($\epsilon = 1700$). IR.-Spektrum in Nujol: Banden bei 2,89 μ (OH), 5,73 μ (17-Keton), 5,84 μ (11-Keton), 5,98 μ (3-Keton) und 6,17 μ (Δ^4).

$C_{19}H_{24}O_4$ (316,38) Ber. C 72,12 H 7,65% Gef. C 72,00 H 7,44%

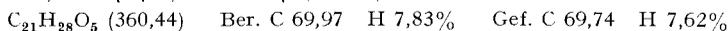
Das Eluat aus der Zone b wurde zur weiteren Reinigung nochmals an 10 Blatt WHATMAN-Papier, Nr. 1, im System Formamid/Benzol chromatographiert. Aus dem Eluat (Rf 0,6) erhielt man 7 mg eines papierchromatographisch einheitlichen Produktes. Nach Umkristallisation aus Aceton-Äther erhielt man das Δ^4 -Androgen-3,6,11,17-tetraon (XIIb), welches nicht ganz scharf bei 191–197° schmolz. Das IR.-Spektrum in Methylchlorid wies keine Hydroxybanden auf. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} 248 m μ ($\epsilon = 9416$); nach Zugabe von 2 Tropfen 10N Natronlauge zu 10 ml 10^{-4} M Lösung: $\lambda_{1\max}$ 258 m μ ($\epsilon = 10000$), $\lambda_{2\max}$ 378 m μ ($\epsilon = 7830$); nach Ansäuern mit 4 Tropfen konz. Salzsäure: $\lambda_{1\max}$ 243 m μ ($\epsilon = 20330$), $\lambda_{2\max}$ 308 m μ ($\epsilon = 20530$).

Behandlung von 6β -Acetoxy-11 β -hydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (VIII) mit Zink und Essigsäure: 10 mg 6β -Acetoxy-11 β -hydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (VIII) und 40 mg Zinkstaub wurden in 1 ml Eisessig und 0,3 ml dest. Wasser 1¾ Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Man fil-

²⁵) Aufgenommen in 0,06 N KOH (Feinsprit-Wasser 9:1 als Lösungsmittel); vgl. A. S. MEYER, J. org. Chemistry 20, 1240 (1955).

trierte hierauf vom überschüssigen Zink ab, verdünnte das Filtrat mit 10 ml Wasser und extrahierte mehrmals mit Methylenchlorid. Die mit 1N Salzsäure, Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abermals mit Wasser gewaschenen und mit Natriumsulfat getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 9 mg Hydroadrenosteron (I), welches nach Umkristallisieren aus Methanol bei 194–196° schmolz und mit einem Vergleichspräparat keine Smp.-Depression gab.

6 α -Acetoxy-11 β -hydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (IX): Durch eine Lösung von 48 mg 6 β -Acetoxy-11 β -hydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (VIII) in 50 ml trockenem Chloroform, enthaltend 0,7 Vol.-% abs. Äthanol, wurde bei 0° 1½ Std. lang trockener Chlorwasserstoff geleitet. Hierauf wusch man die Lösung mit eiskalter ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und dann mit Eiswasser, trocknete sie mit Natriumsulfat und kristallisierte den Eindampfungsrückstand aus Aceton-Äther um. Das dabei erhaltene 6 α -Acetoxy-11 β -hydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (IX) schmolz bei 248–249°, $[\alpha]_D^{22} = +171 \pm 2^\circ$ ($c = 0,748$ in Chloroform); $M_D = +616$. Das IR.-Spektrum in Methylenchlorid wies Banden bei 2,77 μ (OH), 5,73 μ (17-Keton und Acetat), 5,96 μ (3-Keton), 6,15 μ (Δ^4) und 8,15 μ (Acetat) auf.



6 α ,11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (X): 30 mg 6 α -Acetoxy-11 β -hydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (IX) wurden in 3 ml Methanol warm gelöst und nach vorsichtiger Abkühlung auf Raumtemperatur mit 0,52 ml 1-proz. methanolischer Kalilauge versetzt. Man liess unter Stickstoff 3 Std. bei 23° stehen, fügte hierauf 10 ml ges. Natriumchlorid-Lösung zu und extrahierte mit 5 Portionen von 15 ml Essigester. Die mit 10-proz. Natriumchlorid-Lösung gewaschenen Auszüge wurden mit Natriumsulfat getrocknet und gaben beim Eindampfen 27 mg rohes Verseifungsprodukt. Zweimalige Umkristallisation aus Aceton-Petroläther lieferte reines 6 α ,11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (X) vom Smp. 269–272°; $[\alpha]_D^{26} = +179 \pm 4^\circ$ ($c = 0,559$ in Chloroform-Methanol (1:1)); $M_D = +570$.



UV.-Spektren: in Äthanol: λ_{max} 241 m μ ($\epsilon = 14500$); in alkalischem Äthanol²⁶) nach 24stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur und 1½stdg. Erwärmen auf 60°: $\lambda_{1\text{max}}$ 258 m μ ($\epsilon = 13500$), $\lambda_{2\text{max}}$ 377 m μ ($\epsilon = 10000$); in konz. Schwefelsäure: unmittelbar nach dem Lösen: λ_{max} 281 m μ ($\epsilon = 11250$), nach 45 Min.: $\lambda_{1\text{max}}$ 281 m μ ($\epsilon = 10750$), $\lambda_{2\text{max}}$ 340 m μ ($\epsilon = 1940$), nach 120 Min.: $\lambda_{1\text{max}}$ 280 m μ ($\epsilon = 10000$), $\lambda_{2\text{max}}$ 340 μ ($\epsilon = 3500$). Gemäss papierchromatographischer Untersuchung enthielten die Mutterlaugen kein 11 β -Hydroxy-androstan-3,6,17-trion (XI).

11 β -Hydroxy-androstan-3,6,17-trion (XI): – a) *Durch Isomerisierung von 6 β ,11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (VII)*: 512 mg 6 β ,11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion wurden in 170 ml Methanol unter leichtem Erwärmen gelöst, mit 170 ml methanolischer Salzsäure (1 Vol.-Teil konz. Salzsäure, 9 Vol.-Teile Methanol) versetzt und unter Stickstoff 24 Std. bei 25° stehen gelassen. Nach vorsichtigem Einengen des Reaktionsgemisches im Vakuum auf ca. 35 ml (Badtemperatur nicht über 35°) verdünnte man die verbleibende Suspension mit 150 ml Wasser, extrahierte sie viermal mit 100 ml Methylenchlorid und wusch die Auszüge mit Wasser neutral. Umkristallisation aus Aceton-Äther gab 443 mg 11 β -Hydroxy-androstan-3,6,17-trion (XI), Smp. 281–284°; $[\alpha]_D^{26} = +85 \pm 1^\circ$ ($c = 0,955$ in Chloroform); $M_D = +268$. Die Verbindung zeigte im Papierchromatogramm bei vollständiger Abwesenheit von UV.-Absorption im 240-m μ -Gebiet eine intensiv gelbe Natronlaugenfluoreszenz und reduzierte Blautetrazolium.



b) *Durch Isomerisierung von 6 α ,11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (X)*: 13 mg 6 α ,11 β -Dihydroxy- Δ^4 -androgen-3,17-dion (X) in 8 ml Methanol wurden wie oben beschrieben mit 8 ml methanolischer Salzsäure behandelt und aufgearbeitet. Das erhaltene Isomerisierungsprodukt schmolz bei 280–284° und war identisch mit 11 β -Hydroxy-androstan-3,6,17-trion (XI) (Misch-Smp., papierchromatographischer Vergleich).

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Dr. W. PADOWETZ durchgeführt. Die IR.-Spektren verdanken wir den Herren Dres. E. GANZ und R. ZÜRCHER, die papierchromatographischen Untersuchungen den Herren Dr. R. NEHER und E. VON ARX.

SUMMARY

Continuing our earlier work on the action of fungi of the genus *Gibberella* on steroids we have shown that *G. saubinetti* (MONT.) SACC. has the ability of hydroxylating steroids in the 6 β - or the 15 α -position. On the other hand, the steroid transforming properties of *G. baccata* (WALLR.) SACC. seem to be limited to 15 α -hydroxylation. Some interesting substrate specificity has been observed in this connection. 15 α -Hydroxy- Δ^4 -androstene-3,17-dione has been obtained for the first time in the course of these experiments.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

138. Tieffarbige Fluorenchinone

von G. Schwarzenbach und P. Waldvogel

(20. IV. 60)

A. Überblick

Im Jahre 1954 konnten tschechische Chemiker¹⁾ erstmals das früher²⁾ nie sauber erhaltene Brenzcatechinsulfonphtalein (I) in analysenreiner Form gewinnen, und sie³⁾ führten dasselbe als ausgezeichneten Metallindikator in die Analytik⁴⁾ ein.

Beim einfachen Phenolsulfonphtalein kann man die beiden chromophoren Hydroxylgruppen leicht durch Aminogruppen $-\text{NR}_2$ ($\text{R} = \text{H}$, Alkyl oder Aryl) ersetzen, wenn man den Indikator in der Lösung des wasserfreien Amins NHR_2 erwärmt⁵⁾. Es wurde nun versucht, die analoge Substitution auch beim Brenzcatechinsulfonphtalein durchzuführen, die von I zum Aminophenolsulfonphtalein II führen sollte, welches beim Anlagern von Metallionen diesen neben Sauerstoff auch N-Atome darbietet und deshalb gegenüber I andere Koordinationscharakteristiken, also andere Indikator-eigenschaften haben sollte.

Der Umsatz von I mit Aminen nimmt aber einen andern, überraschenden Verlauf, was sich sofort aus den auftretenden Farberscheinungen ergibt: Erhitzt man I z. B. mit Äthylamin in einer evakuierten Ampulle, so entsteht aus der anfänglich tief dunkelviolettten Lösung im Verlauf einiger Stunden eine praktisch farblose Flüssigkeit, welche beim Luftzutritt augenblicklich tiefgrün wird. Dieser grüne Farbstoff ist offensichtlich nicht das gesuchte Aminophenolsulfonphtalein II, da er mit Metallionen kaum Komplexe bildet und auch beim Verändern des pH-Wertes innerhalb der Grenzen 3 und 14 keinen Farbwechsel zeigt, dafür aber mit Dithionit in einer Sofort-

¹⁾ Z. VODAK & O. LEMINGER, Coll. czech. chem. Comm. 19, 925 (1954); DRP 1061328.

²⁾ C. B. WOOD, J. Amer. chem. Soc. 52, 3463 (1930).

³⁾ M. MALAT, V. SUK & O. RYBA, Coll. czech. chem. Comm. 19, 258, 679 (1954); M. MALAT, V. SUK & A. JENICKOVA, *ibid.* 19, 1157 (1954); 20, 158 (1955); O. RYBA, J. CEFKA, M. MALAT & V. SUK, *ibid.* 27, 349 (1956).

⁴⁾ G. SCHWARZENBACH, Die komplexometrische Titration, Enke, Stuttgart 1957.

⁵⁾ G. SCHWARZENBACH & G. OTT, Helv. 20, 498, 627 (1937).