

or aryl^{1,2} p-nitrophenyl sulfides show the band of the p-nitrophenylmercapto group at about 338 m μ , thioesters where $R_2 = \text{NO}_2$ show this band at 285 m μ .

Gross spectral changes have been observed in thioesters when hydrogen ($R_2 = \text{H}$) is replaced by a methoxyl group ($R_2 = \text{OCH}_3$), whereas similar substitution in esters have but little effect on the absorption curves. These changes consist of the development of a new, strong band at about 240 m μ , which was resolved when R_1 was the methoxyl group, overlapped with the benzoyl absorption when R_1 was hydrogen or with the nitrated

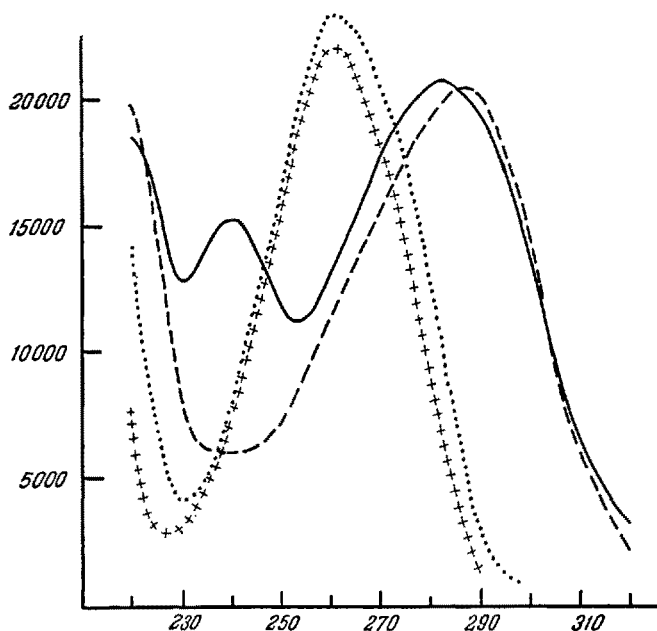
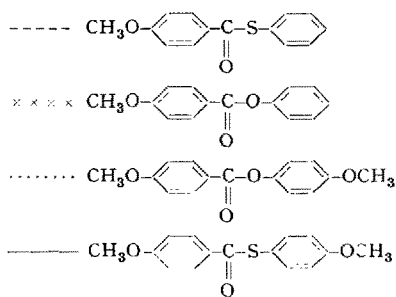


Fig. 2.

in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

ring band when R_1 was the nitro group. Apparently, the only way to account for this 240 m μ band is by postulating a decet structure for the sulfur atom in the activated state of the corresponding transition:



Provided that this explanation is the correct one, then a further result emerges. Indeed, the nitro group being a better electron acceptor than the methoxyl is an electron donor, and comparing the λ_{max} shift observed on passing from the anisole to the p-anisylmercapto absorption in thioesters (circa 217 m $\mu \rightarrow 240$ m μ) to that from the nitrobenzene to the p-nitrophenylmercapto ab-

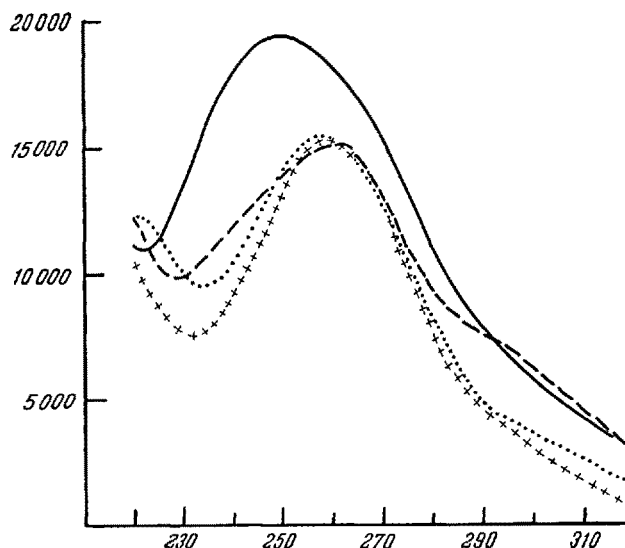
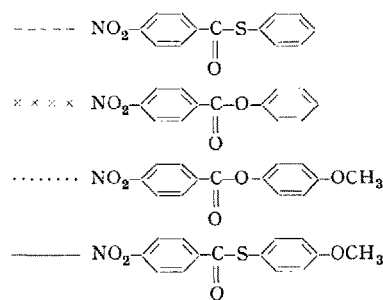


Fig. 3.

in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

sorption in thioesters (circa 260 m $\mu \rightarrow 285$ m μ), it is deduced that sulfur acts as an electron acceptor in activated thioesters where $R_2 = \text{OCH}_3$ at least with the same ability as it acts as an electron donor in those activated thioesters where $R_2 = \text{NO}_2$.

G. CILENTO

Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, June 19, 1952.

Riassunto

Lo spettro di assorbimento U.V. di esteri e tioesteri aromatici indica che nello stato eccitato di certi tioesteri l'atomo di zolfo fa uso d'una orbitale 3d.

Biologische Hydroxylierungen von Steroiden¹

Vor einiger Zeit konnten wir² die Bedingungen der Hydroxylierung in 11 β -Stellung von 17-Oxy-11-desoxy-corticosteron (Reichsteins Substanz S) und von 11-Desoxy-corticosteron mittels *Homogenaten von Nebennieren* festlegen. Solche Reaktionen haben auch wei-

¹ Über Steroide, 111. Mitteilung. [110. Mitt. Helv. chim. Acta 35, 284 (1952)]. Vgl. vorläufige Mitteilung anlässlich des Symposiums über «Probleme des Hypophysen-Nebennierenrindensystems», Freiburg i. Br., 8. Juni 1952.

² F. W. KAHNT und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 34, 1791 (1951).

¹ H. P. KOCH, J. Chem. Soc. 1949, 387.

² H. H. SZMANT and J. J. MCINTOSH, J. Amer. Chem. Soc. 73, 4356 (1951). — A. MANGINI and R. PASSERINI, J. Chem. Soc. 1952, 1168.

terhin grosses Interesse gefunden^{1,2}. An dieser Stelle ist es nicht möglich, näher auf unsere seitherigen Beobachtungen einzugehen. Es sei lediglich bemerkt, dass sich in präparativen Ansätzen das entstandene 17-Oxy-corticosteron (Substanz *M* nach REICHSTEIN, *F* nach KENDALL) jetzt mit Ausbeuten bis zu 60% isolieren liess. Wie früher erwartet, konnten Zusätze von Adenosintriphosphat² (ATP., 0,004 molar), von Muskel-Adenylsäure (etwa 0,006 molar)³ oder von Glutathion die Fumarsäure in ihren Cofaktor-Eigenschaften weitgehend ersetzen, während Cytochrom (0,02%)³ ihre Wirkung steigerte, Cozymase (DPN., 0,0003 molar) aber kaum wirkte.

Neuerdings haben wir nun mit Erfolg die elegante Methode von PETERSON und MURRAY⁴ zur mikrobiologischen Hydroxylierung von Steroiden insbesondere in 11 α -Stellung verwendet.

Dabei wurde eine 24stündige Schüttelkultur eines ausgewählten Stammes der Gattung *Rhizopus* in einem Pepton-Glukose-Maisquellwasser-Medium (pH 6,1) hergestellt, zu dieser 0,025% des betreffenden Steroids, in Methanol oder Aceton gelöst, zugegeben und das Ganze weitere 24 h bei 25° inkubiert. Das Kulturfiltrat (pH 8,0) wurde mit Essigester oder Methylchlorid extrahiert und der Rückstand nach der Durchlaufmethode an Aluminiumoxyd oder Silicagel chromatographiert. Die einzelnen Eluate sowie die umkristallisierten Reaktionsprodukte wurden papierchromatographisch⁵ auf Eindeutigkeit geprüft.

Im Falle der von den genannten Autoren beschriebenen Oxydation von Progesteron konnte statt der angegebenen zehnprozentigen Ausbeute an 11 α -Oxyprogesteron eine solche von rund 40% erhalten werden⁶.

Im weiteren wurde Substanz *S* nach dieser Methode hydroxyliert. Das in etwa dreissigprozentiger Ausbeute gewonnene 11-Epimere des wichtigen Nebennierenrinden-Hormons 17-Oxy-corticosteron (Substanz *M* bzw. *F*), das Δ^4 -11 α ,17 α ,21-Trioxy-pregnen-3,20-dion (I), schmolz bei 207–211° k, $[\alpha]_D^{25} = +115^\circ \pm 3^\circ$ (in Äthanol)⁷.

$C_{21}H_{30}O_6$: ber. C 69,58, H 8,34%, gef. C 69,63, H 8,31%. Die Substanz lieferte mit Azetanhydrid in Pyridin bei 40° ein 11 α ,21-Diazetat (II) vom Smp. 206–211° k, $[\alpha]_D^{25} = +126^\circ \pm 3^\circ$ (in Äthanol) oder $[\alpha]_D^{25} = +118,5^\circ \pm 3^\circ$ (in $CHCl_3$), das im Gemisch mit einem von REICHSTEIN und LARDON⁸ auf chemischem Wege hergestellten Präparat keine Schmelzpunktniedrigung zeigte.

¹ Siehe zum Beispiel W. J. HAINES, Recent Progr. Horm. Res. 7, 279 (1952). – R. I. DORFMAN und M. HAYANO, Ciba Found. Colloquia Endocrinol. 2, 375 (1952).

² M. HAYANO, R. I. DORFMAN und E. Y. YAMADA, J. Biol. Chem. 193, 175 (1951). – M. HAYANO und R. I. DORFMAN, Arch. Biochem. 36, 237 (1952); Feder. Proc. 11, 228 (1952). – J. E. PLAGER und L. T. SAMUELS, ibid., S. 383. – Vorträge von L. T. SAMUELS und R. I. DORFMAN in London und Basel, Juli 1952.

³ Sigma Co., St. Louis, Mo., USA.

⁴ D. H. PETERSON und H. C. MURRAY, J. Amer. Chem. Soc. 74, 1871 (1952).

⁵ R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 34, 2278 (1951).

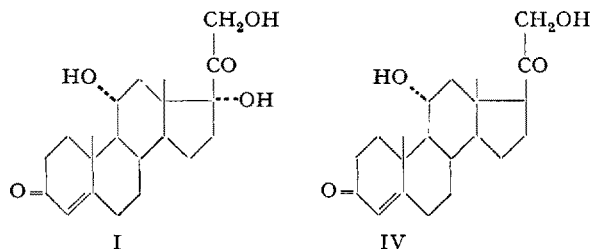
⁶ Anmerkung bei der Korrektur: Vgl. auch die Angabe von O. MANCERA und Mitarbeiter, J. Amer. Chem. Soc. 74, 3712 (1952).

⁷ Daraus errechnet sich: $M_D = +417$. Da die M_D der Substanz *M* in Äthanol +605 (REICHSTEIN), diejenige der Substanz *S* +485 (eigene Bestimmung) beträgt, ergibt sich in unserem Falle ein $M_D^{11\beta} - M_D^{11\alpha}$ von +188 und ein Drehungsbeitrag des 11 α -Hydroxyls von –68. Diese Werte stimmen richtungs- und grössenordnungsmässig mit denjenigen von L. F. FIESER und M. FIESER, Natural Products Related to Phenanthrene (New York 1949), S. 217–218, aus der Cholansäure-Reihe überein (+120 bzw. –34).

⁸ Vortrag London, Ciba-Foundation vom 4. Juli 1952. Wir danken Herrn Prof. REICHSTEIN auch an dieser Stelle für Überlas-

$C_{25}H_{34}O_7$: ber. C 67,24, H 7,68%, gef. C 66,99, H 7,78%.

Durch partielle Azetylierung mit Azetanhydrid in Dioxan-Pyridin bei 22° ging I in ein amorphes 21-Monoazetat (III) über, das mit Chromsäure in Eisessig Cortisonazetat lieferte (Mischschmelzpunkt). Bei analoger Oxydation ergab das freie I Adrenosteron (Mischschmelzpunkt). Damit ist seine Konstitution bewiesen.



Die Oxydation von Desoxycorticosteron mit der *Rhizopus*-Kultur lieferte das Δ^4 -11 α ,21-Dioxy-pregnen-3,20-dion (IV) vom Smp. 158–159° k, $[\alpha]_D^{25} = +171^\circ \pm 4^\circ$ (in Äthanol)¹.

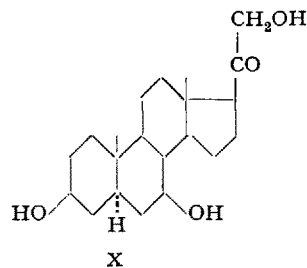
$C_{21}H_{30}O_4$: ber. C 72,80, H 8,73%, gef. C 72,95, H 8,86%.

Sein in analoger Weise wie II hergestelltes Diazetat (V) schmolz als derbe Rhomben bei 126–127° k oder als feine Nadeln bei 142–144° k, $[\alpha]_D^{25} = +155^\circ \pm 4^\circ$ (in $CHCl_3$).

$C_{25}H_{34}O_6$: ber. C 69,74, H 7,96%, gef. C 69,92, H 8,14%, das 21-Monoazetat (VI) bei 166–167° k, $[\alpha]_D^{25} = +181^\circ \pm 4^\circ$ (in Dioxan).

$C_{23}H_{32}O_5$: ber. C 71,10, H 8,30%, gef. C 71,17, H 8,60%. VI ergab bei der Chromsäure-Oxydation 11-Dehydrocorticosteron-azetat (VII), IV die Δ^4 -3,11-Diketo-ätiolcholsäure (VIII). Die Schmelzpunkte von VII und des Methylesters von VIII² im Gemisch mit authentischen Präparaten zeigten keine Depression.

Schliesslich sei hier noch die Hydroxylierung des gesättigten 3 β ,21-Dioxy-allopregnan-20-on (IX)³ angeführt. Sie trat überraschenderweise nicht in 11 α -, sondern in 7 β -Stellung ein, führte also zum 3 β , 7 β , 21-Trioxy-allopregnan-20-on (X)



sung einer Vergleichsprobe. Anmerkung bei der Korrektur: Vgl. auch das von J. ROMO und Mitarbeiter, Chem. a. Ind. 32, 783 (1952), auf chemischem Wege erhaltene Diazetat mit etwas abweichenden Eigenschaften. Die in dieser neuen Arbeit sogar im Titel genannte Grundsubstanz I wird dort nicht beschrieben, wohl aber zusammen mit anderen interessanten Hydroxylierungsprodukten in dem soeben erschienenen, ausführlichen Am. Pat. 2602769 von Peterson & Murray.

¹ Das 11-Epimere von Corticosteron besitzt also $M_D = +592$. Da die M_D für Corticosteron und 11-Desoxy-corticosteron +773 bzw. +588 betragen (REICHSTEIN), berechnen sich in diesem Falle $M_D^{11\beta} - M_D^{11\alpha}$ zu +181, der Drehungsbeitrag des 11 α -Hydroxyls zu +4.

² T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 20, 953 (1937). – H. L. MASON, W. M. HOEHN, B. F. MCKENZIE und E. C. KENDALL, J. Biol. Chem. 120, 719 (1937).

³ Smp. 171–176° k, $[\alpha]_D^{25} = +87^\circ \pm 2^\circ$ (in $CHCl_3$). Hergestellt aus dem bekannten Diazetat (T. REICHSTEIN und J. von EUW, Helv. chim. Acta 22, 1209 [1939]) durch Verseifung mit Hydrogencarbonat in Methanol.

vom Smp. 205–213° K und $[\alpha]_D^{25} = +106^\circ \pm 3^\circ$ (in Äthanol).

$C_{21}H_{34}O_4$: ber. C 71,96, H 9,78 %, gef. C 71,73, H 9,88 %.

Seine Konstitution wurde bewiesen durch Oxydation mit Chromsäure und Behandlung mit Diazomethan, die zum 3,7-Diketo-ätiolcholeinsäure-methylester (XI) führten. Dieses Präparat zeigte keine Schmelzpunktserniedrigung im Gemisch mit authentischem XI¹, während mit dem 3,11-Diketo-ester eine starke Depression eintrat. Die sterische Lage der 7-Hydroxylgruppe (β) ergibt sich aus dem Vergleich der molekularen Drehungen².

Die mikrobiologische Hydroxylierung³ hat gegenüber derjenigen mit Nebennieren-Homogenaten den grossen Vorteil, dass die Reaktionsprodukte meist leichter abzutrennen sind, da die Kulturen keine Vielzahl von nahe verwandten Verbindungen (Nebennierenrinden-Hormone aus der Drüse) enthalten. Damit wird auch die Zuordnung von in kleinen Mengen anfallenden Nebenprodukten zum Reaktionsgeschehen sicherer. Im Gegensatz zu den rein chemischen Methoden, die im allgemeinen die nur schwer verseifbaren 11 α -Azetoxy-Derivate liefern, erhält man bei der mikrobiologischen Gewinnung die freien 11 α -Oxy-Verbindungen, die einzig für die Testierung der Aktivität in Frage kommen.

Im Hinblick auf die in letzter Zeit erneut in Gang gekommene Suche nach der noch unbekannten Substanz aus Nebennieren mit stark «mineralocorticoider» Wirkung⁴, bei der man auch Epimere der bekannten Nebennieren-Steroide in Betracht zieht, wurden die Verbindungen I (11-epi-M), IV (11-epi-Corticosteron) und X im Überlebensstest an epinephrektomierten Hunden geprüft⁵. Alle drei Substanzen waren bei täglich einmaliger, subkutaner Injektion in ölgiger Lösung wenn überhaupt, so wesentlich schwächer wirksam als Desoxycorticosteron.

F. W. KAHNT, CH. MEYSTRE, R. NEHER,
E. VISCHER und A. WETSTEIN

Forschungslaboratorien der Ciba Aktiengesellschaft,
Basel, Pharmazeutische Abteilung, den 10. August 1952.

Summary

New observations on the necessary cofactors for the hydroxylation of steroids using adrenal homogenates are described.

By microbiological hydroxylation of steroids preferably in 11 α -position using molds i. a. the new 11-epimers of corticosterone and 17-hydroxy-corticosterone have been obtained. They are lacking high mineralocorticoid activity.

¹ T. REICHSTEIN und H. G. FUCHS, *Helv. chim. Acta* **22**, 1160 (1934).

² $M_D(X) - M_D(IX) = +80$. Drehungsbeitrag des 7 β -Hydroxyls in der 7-Oxy-cholestanolreihe = +121, des 7 α -Hydroxyls = –60 (vgl. FIESER und FIESER, l. c., S. 216).

³ Vgl. auch die Einwirkung von Streptomyces-Stämmen, die nach D. R. COLINGWORTH, M. P. BRUNNER und W. J. HAINES, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2381 (1952), zu 11 β -Oxy-Verbindungen führt, sowie diejenige von Proactinomyces-Stämmen zu 16 α -Oxy-Verbindungen: D. PERLMAN, E. TITUS und U. FRIED, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 2126 (1952).

⁴ J. F. TAIT, S. A. SIMPSON und H. M. GRUNDY, *Lancet* **262**, 122 (1952). – S. A. SIMPSON und J. F. TAIT, *Endocrinology* **50**, 150 (1952). – H. M. GRUNDY, S. A. SIMPSON und J. F. TAIT, *Nature* **169**, 795 (1952).

⁵ Dr. F. GROSS von unserer biologischen Abteilung danken wir für die Durchführung dieser Tests.

Über ein neues Trisaccharid

Im Verlauf papierchromatographischer Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Nektar und Phloemsaft wurden verschiedene Monosaccharide in die Stoffleitungsbahnen von *Impatiens Holstii* eingeführt. Die extrafloralen Nektarien von *Impatiens* sezernieren unter natürlichen Bedingungen im Gegensatz zu den meisten übrigen Pflanzen reine Saccharose. Durch die Injektion eines Monosaccharids (Arabinose, Glukose, Fruktose, Sorbose usw.) ins Phloem trat im Nektar eine ganze Reihe von Zuckern auf, nämlich Fruktose, Glukose, Saccharose, Raffinose und ein neuer Zucker, nennen wir ihn «Impatiöse». Der R_F -Wert der Impatiöse, der mit der Trennungslösung Butanol-Essig-Wasser¹ zwischen denjenigen von Saccharose und Raffinose liegt, lässt auf ein Di- oder Trisaccharid schliessen (siehe Tabelle). Der Zucker reagiert mit den üblichen Entwicklungsmitteln genau wie Saccharose, das heisst mit Naphthoresorzin-Trichloressigsäure¹ rot, Anilinoxalat² braun und Anilolphthalat³ schwach braun. Mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)⁴ entwickelt, zeigt der Zucker keine Reaktion, das heisst, er ist nicht reduzierend.

| | R_{Fr} |
|-----------------------------|----------|
| Raffinose | 0,25 |
| Impatiöse | 0,35 |
| Glukose-Fruktosid | 0,52 |
| Saccharose | 0,58 |
| Glukose | 0,84 |
| Fruktose | 1,00 |

Es wurden quantitative Bestimmungen der Hydrolysate durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Zucker nach dem Trennungsvorgang aus dem Chromatogramm extrahiert und auf ein neues Filterpapier aufgetragen. Die Hydrolyse erfolgte direkt auf dem Papier mit Invertase⁵. Auf diese Weise können die Hydrolysate gleich darauf chromatographiert werden. Die quantitativen Bestimmungen wurden auf zwei verschiedene Arten durchgeführt, einerseits mit TTC, andererseits wurden die Chromatogramme mit Anilinoxalat entwickelt und die Flecke planimetriert⁶. Das Resultat war bei beiden Methoden Fruktose: Glukose = 2:1. Eine partielle Hydrolyse mit $n/50$ HCl ergab Fruktose + Glukose + Saccharose. Das Ganze deutet also daraufhin, dass es sich um ein Trisaccharid handelt, das aus Saccharose und Fruktose besteht. Die hydrolytische Spaltung mit Invertase war in zwei Fällen nacheinander unvollständig. Beide Chromatogramme wurden mit TTC entwickelt und zeigten Fruktose + Glukose (Spur) + einen Fleck (reduzierend!) direkt über Saccharose. Es handelt sich in diesem Fall offenbar um die Spaltung der Saccharose des Trisaccharids. Der dritte Fleck müsste dann das reduzierende Glukose-Fruktosid sein.

Bringt man in einige Kubikzentimeter einer siebenprozentigen Lösung reinsten Saccharose 100 μ g des ver-

¹ S. M. PARTRIDGE und R. G. WESTHALL, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).

² S. M. PARTRIDGE, *Biochem. Soc. Symposia* **1951**, Nr. 3, 52.

³ S. M. PARTRIDGE, *Nature* **164**, 443 (1949).

⁴ K. WALLENFELS, *Naturwissenschaften* **37**, 491 (1950).

⁵ K. T. WILLIAMS und A. BEVENUE, *Science* **113**, 582 (1951).

⁶ R. B. FISHER, D. S. PARSONS und G. A. MORRISON, *Nature* **161**, 764 (1948).