

hydroxy-15 β -halo formulation is derived from the observation that the halohydrins are converted back to the parent oxide with potassium acetate in ethanol, while the bromohydrin afforded II upon treatment with Raney nickel²¹ under carefully defined conditions. Zinc dust in acetic acid²² at room temperature converted XII to III, but unchanged starting material was recovered when XII was allowed to react with potassium iodide in refluxing acetone²³. The chlorohydrin XI was not attacked by chromic acid.

In those steroid olefins where the direction of attack by bulky electrophilic reagents is rigidly determined by steric factors (*inter al.*: $\Delta^{9(11)}$ - and Δ^{11} -compounds), the addition of hypobromous acid followed by elimination of the elements of hydrogen bromide has invariably led to epoxides²⁴ isomeric with those resulting from direct peracid oxidation. Attempts to apply such a procedure to the D-ring olefin III provided unusual results which we attribute to participation of the neighboring cortical side chain. When III was allowed to react with *N*-bromoacetamide in aqueous dioxane containing perchloric acid, the product isolated directly was a *halogen-free* compound XIV, m. p. 242.4–245.8° w. p. s.; $[\alpha]_D^{23}$ (dioxane); ϵ EtOH/237 = 17,900; λ KBr/max 2.93, 5.77, 5.94, 6.04, 6.21, 8.13; (Anal. Calculated for $C_{23}H_{30}O_6$; C, 68.6; H, 7.51. Found: C, 68.7; H, 7.65). The infrared spectrum of XIV displayed no additional hydroxyl or carbonyl bands and this fact considered along with the unreactiveness of the compound toward perphthalic acid and the chromic acid-pyridine complex²⁵ led to the conclusion that the newly introduced oxygen atom was present in a cyclic ether linkage. The reaction of XIV with anhydrous hydrogen chloride in chloroform for 4 h at 0° gave a chlorohydrin XV, m. p. 177.4–179.2° (dec.); $[\alpha]_D^{23}$ + 101° (dioxane); ϵ EtOH/240 = 16,750; λ KBr/max 2.96, 5.71, 5.85, 6.06, 6.21, 8.13; (Anal. Calculated for $C_{23}H_{31}O_6Cl$; C, 62.9; H, 7.12; Cl, 8.08. Found: C, 63.0; H, 7.14; Cl, 7.97). The chlorohydrin could be recovered unchanged after treatment with chromic anhydride in acetic acid, suggesting the absence of a secondary hydroxyl function. The possibility that a skeletal rearrangement had occurred during the preparation of the chlorohydrin was excluded by converting back to XIV with potassium acetate in refluxing ethanol. Further structure studies on the cyclic ether XIV and related compounds are underway.

BARRY M. BLOOM, E. J. AGNELLO,
and G. D. LAUBACH

Research Laboratories Chas. Pfizer and Co., Inc.,
Brooklyn 6, N. Y., September 21, 1955.

Zusammenfassung

Eine Anzahl am D-Ring substituierter Derivate von Reichsteins Verbindung S wurde als Modellverbindun-

gen in der Synthese neuer Corticosteroide hergestellt. Die beschriebenen Strukturtypen schliessen Dehydroverbindungen, Epoxyde, Halogenhydrine und ein Glykol ein.

Leukozytenemigrationsfördernde Wirkung von Crotonöl

In einer früheren Arbeit haben wir beschrieben, dass unter den entzündungserregenden Stoffen das Crotonöl insofern eine besondere Stellung einnimmt, als dieses neben starker lokaler Reizwirkung und Entzündungserregung eine hochspezifische, chemotaktische und leukozytenwanderungsfördernde Wirkung *in vitro* besitzt¹. Es ist seit längerem von BERENBLUM² beschrieben worden, dass Crotonöl eine tumorrealisierende Wirkung hat. Diese Frage wurde in letzter Zeit von DANNEEL³ bearbeitet, der zeigen konnte, dass die entzündungserregenden Anteile nicht diejenigen sind, welche eine tumorrealisierende Wirkung besitzen. SICÉ und Mitarbeiter⁴ konnten weiterhin zeigen, dass unter anderem Alkoholextrakte zu Hauthyperplasie, aber nicht zu Hautschäden führen. Es schien bei dieser Situation interessant, den Versuch zu machen, die chemotaktisch wirksamen Stoffe mit den anderen Wirkungen in Zusammenhang zu bringen. Es war versprechend, die gleichen Fraktionen wie DANNEEL zu untersuchen. Auf unsern Wunsch war DANNEEL so freundlich, uns die entsprechenden Fraktionen zur Verfügung zu stellen. Diese konnten ebenfalls verglichen werden mit den in unserer chemischen Abteilung von A. MARXER hergestellten Fraktionen, über deren Untersuchungen wir im einzelnen später berichten werden. Wir haben die von DANNEEL uns zur Verfügung gestellten Fraktionen sowohl auf ihre Leukozytenwirkung wie auch auf ihre Reizwirkung an der Konjunktiva des Kaninchens untersucht. Es ergab sich, dass vor allen Dingen zwei Fraktionen eine Wirkung auf Leukozyten besitzen; die eine hat zudem eine ausgesprochene entzündungserregende bzw. Reizwirkung. Diese Fraktion findet sich im Chloroformextrakt 3a, 3b und 3c, wobei 3c die wirksamste Unterfraktion zu sein scheint. Die zweite Fraktion mit leukotaktischer Wirkung findet sich in der Alkoholfraktion, die keine oder nur eine sehr geringe Reizwirkung besitzt. Die vorstehenden Untersuchungen ergeben somit, dass die Reizwirkung und die Leukozytenwirkung in einer Fraktion gemeinsam vorhanden sind, in der Alkoholfraktion aber nur die Leukozytenwirkung vorliegt. Es ist noch nicht zu schliessen, dass die chemotaktischen Stoffe dieser beiden Fraktionen identisch sind. Auf Grund der Danneelschen und Sicéschen Untersuchungen im Vergleich zu unseren kann gesagt werden, dass die tumorrealisierende Wirkung mit grosser Wahrscheinlichkeit mit der auf Leukozyten wirksamen Substanz nicht identisch ist und dass die Leukozytenwirkung sich in gewissen Fraktionen abtrennen lässt von den reizenden und hautschädigenden Komponenten. Es bestätigen somit diese Befunde unsere eigenen früheren Feststellungen⁵, dass im Crotonöl hochwirksame, spezifisch

²¹ P. L. JULIAN *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 72, 5145 (1950). – L. B. BARKLEY, M. W. FARRAR, W. S. KNOWLES, and H. RAFFELSON, J. Amer. Chem. Soc. 76, 5017 (1953). – J. SCHMIDLIN and A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 36, 1241 (1953). – G. P. MUELLER, R. E. STOLBAUGH, and R. S. WINNIFORD, J. Amer. chem. Soc. 75, 4888 (1953). – J. W. CORNFORTH, J. M. OSBOND, and G. H. PHILLIPS, J. chem. Soc. 1954, 907.

²² L. F. FIESER and X. A. DOMINGUEZ, J. Amer. chem. Soc. 75, 1704 (1953).

²³ J. FRIED *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 75, 2273 (1953).

²⁴ J. FRIED *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 75, 2273 (1953). – G. H. OTT and T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 26, 1799 (1943).

²⁵ G. I. POOS, G. E. ARTH, R. E. BEYLER, and L. H. SARETT, J. Amer. chem. Soc. 75, 422 (1953).

¹ R. MEIER, P. DESAULLES und B. SCHÄR, Arch. exp. Path. und Pharm. 224, 104 (1955).

² J. BERENBLUM und P. SHUBIK, Brit. J. Canc. 1, 379 (1947).

³ R. DANNEEL und N. WEISSENFELS, Naturwissenschaften 42, 128 (1955).

⁴ 3. Internationaler Biochemie-Kongress Brüssel.

⁵ Zusammen mit A. MARXER, unpubliziert.

Wirkung von Crotonölextrakten auf die Auswanderung von Hühnerleukozyten *in vitro*.

		10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Petroläther	1a-1c	Ø	Ø	Ø
Benzol	2a-2c	Ø	Ø	Ø
Chloroform	3a	+	+	Ø
	3b	+	+	Ø
	3c	+	+	+
Äther	4a-4c	(+)	Ø	Ø
Aceton	5a-5c	Ø	Ø	Ø
Alkohol	6a	+	+	+
	6b	+	Ø	Ø
	6c	+	Ø	Ø

+ = Förderung der Auswanderung 16 h
Ø = Keine Wirkung

leukozytotaktische Substanzen vorhanden sind, deren Natur vorläufig noch nicht abgeklärt ist, und weiterhin im Vergleich mit den Untersuchungen von DANNEEL, dass im Crotonöl mehrere offenbar chemisch verschiedene Substanzen mit hochspezifischer biologischer Wirkung vorliegen.

B. SCHÄR und R. MEIER

Wissenschaftliche Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel, den 15. August 1955.

Summary

Various croton oil fractions were studied with regard to their *in vitro* effect on leucocytes and their irritative action. It was discovered that there exist fractions exerting a stimulating effect on leucytic migration and an irritative action and other fractions having a leucocytic stimulating effect without pronounced irritative action. The co-carcinogenic fractions of DANNEEL have no promotory effect on the migration of leucocytes.

Identificazione della 5-OH-Triptamina nei trombociti degli uccelli

Il fattore vasocostrittore¹ nelle piastrine dei mammiferi è stato identificato da BRACCO e CURTI² e susseguentemente da ZUCKER, RAPPORT e FRIEDMAN³ con la 5-OH-triptamina, sostanza scoperta da RAPPORT⁴ nel siero di bue. La 5-OH-triptamina non è presente in altri elementi del sangue al di fuori delle piastrine, e compare nel siero quando avviene la coagulazione⁵.

Nel sangue degli uccelli le funzioni piastriniche si suppone siano svolte dai cosiddetti trombociti, cellule nucleate morfologicamente differenti dalle piastrine dei mammiferi. Lo scopo di questa ricerca è quello di dimostrare la presenza di 5-OH-triptamina nei trombociti del sangue degli uccelli.

¹ M. B. ZUCKER, Amer. J. Physiol. 148, 275 (1947).
² M. BRACCO e P. C. CURTI, Haematologica 37, 721 (1953); Exper. 10, 71 (1954).
³ M. B. ZUCKER, B. K. FRIEDMAN e M. RAPPORT, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 85, 282 (1954).
⁴ M. RAPPORT, J. biol. Chem. 180, 961 (1949).
⁵ M. BRACCO e P. C. CURTI, Ann. Villaggio Sanat. Sondalo 1, 180 (1953). – M. B. ZUCKER e J. BORRELLI, J. appl. Physiol. 7, 425, 432 (1955).

Gli esperimenti sono stati condotti usando sangue di pollo e di oca. Il sangue prelevato dalla vena dopo iniezione di eparina con ago e siringa siliconati, veniva diluito in 3 volumi di una soluzione preparata mescolando 5 parti di NaH₂PO₄ 0,2 M, 5 parti di Na₂HPO₄ 0,2 M e 2 parti di ossalato di sodio al 4%, mantenuta a bassa temperatura (4–6°C). I trombociti venivano separati per centrifugazione frazionata in una centrifuga refrigerata e lavati 2 volte con 3 volumi di soluzione fisiologica.

Era così possibile ottenere una sospensione di trombociti ben conservati e praticamente purificati da altri elementi (Fig. 1).

Estratti di trombociti venivano preparati per le determinazioni chimiche e farmacologiche nel seguente modo. 30–60 mg di trombociti freschi venivano sospesi in 5 volumi di etanolo e lasciati in frigorifero per 12 h. Dopo agitazione per 10 min la miscela veniva centrifugata e il sopranatante limpido veniva prelevato e tirato a secco sotto vuoto. Il residuo veniva ripreso con 0,5 ml di acqua, di cloroformio e di etanolo e trasferito su carta Whatman N° 4 in 5 distinte macchie. Sulla stessa carta veniva posta una macchia di controllo di 15 µg di 5-OH-triptamina. La separazione cromatografica veniva eseguita a mezzo di irrigazione ascendente con una miscela di cloroformio, etanolo e acqua nel rapporto 80:50:20. Dopo una corsa del fronte del solvente di 20 cm, la carta veniva asciugata in aria ambiente. La striscia del controllo e una striscia dell'estratto venivano spruzzate con acido sulfanilico diazotato ed esposte a vapori di ammoniaca: in ambedue compariva una macchia rossa con Rf = 0,43, cangiante al violetto dopo esposizione a vapori di HCl. Una seconda striscia dell'estratto, spruzzata con *p*-dimetilaminobenzaldeide e seccata a 80°C, mostrava una macchia violetta con lo stesso Rf della 5-OH-triptamina. Una macchia blu nella stessa posizione veniva dimostrata in una terza striscia dell'estratto con il reattivo di Folin-Ciocalteu (Fig. 2). Le porzioni corrispondenti della quarta e quinta striscia dell'estratto venivano eluite in 4 ml di HCl N/500 con agitazione per ½ h. Lo spettro di assorbimento nell'ultravioletto di questo eluito risultò del tutto simile a quello riportato nella Figura 4. Con una piccola quantità dell'eluito si saggiava l'attività sull'utero di ratta, isolato 24–30 h dopo iniezione di 10

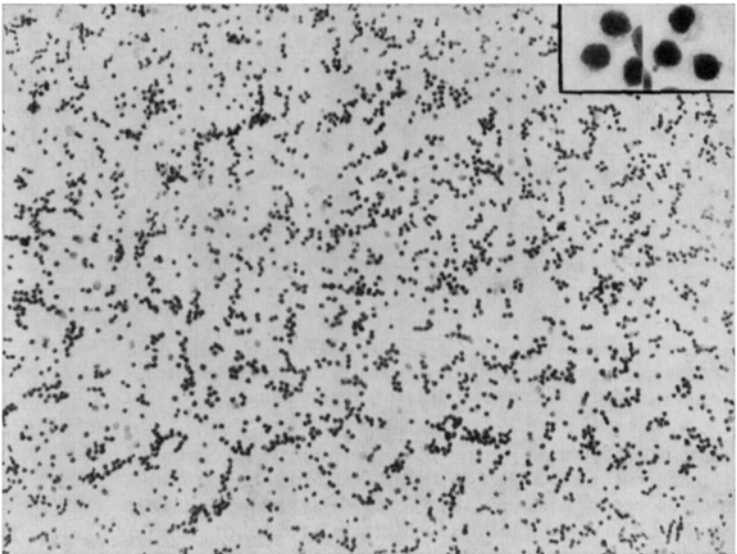


Fig. 1.—Trombociti separati dal sangue di pollo, colorati con May-Grünwald-Giemsa, × 90. All'angolo superiore destro gli stessi elementi, × 900.