

den, worin  $n$  merklich grösser als 1 ist und  $K_2$  sehr klein bleibt. Auch bei der Mischisotherme  $N_2, CO_2$  von  $20^\circ$  konnte ein solcher Ansatz verwendet werden, im Gegensatz zu denselben Isothermen bei  $0^\circ$  und bei  $40^\circ$ , bei welchen  $n \sim 1$  wird und  $K_2$  viel grössere Werte als bei den vorerwähnten Kurven annimmt.

Zur Abklärung dieser Anomalie müssten wohl diese Isothermen erneut mit besonders sorgfältig entgaster Kohle aufgenommen werden, um festzustellen, ob das gefundene abweichende Verhalten nicht durch eine restliche Fremdgasschicht auf der Kohle verursacht worden ist.

Herr dipl. ing. chem. *W. Frech* ist in unserm Laboratorium mit der Untersuchung weiterer Beispiele von Mischadsorptionen mit  $CO_2$  als Vergleichsgas beschäftigt.

Herrn Laborant *H. Wirz* danken wir für die Ausführung der Zeichnungen.

### Zusammenfassung.

Es wurden Mischgasisothermen von  $O_2$ ,  $N_2$  und  $H_2$  mit  $CO_2$  bei  $0^\circ$ ,  $20^\circ$  und  $40^\circ$  an aktivierter Lindenhholzkohle von konstantem Adsorptionsvermögen aufgenommen, wobei der Gesamtdruck des Gasmisches auf 730 mm Hg gehalten wurde.

Für das begrenzte Druckgebiet von 670—730 mm Hg für die permanenten Gase konnte die starke Verdrängung derselben durch  $CO_2$  mit Hilfe der empirischen Gleichung:

$$A_a = K_1 [a_{CO_2} - K_2 \cdot p_{CO_2}^n]$$

gut dargestellt werden, in welcher  $K_1$ ,  $K_2$  und  $n > 1$  empirische Konstanten bedeuten.

Laboratorium für anorganische Chemie,  
Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

## 213. Über Steroide.

105. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Die 11-Oxydation von Desoxy-corticosteron und *Reichstein's* Substanz S mit Hilfe tierischer Organhomogenate. Bildung von Corticosteron und 17-Oxy-corticosteron

von **F. W. Kahnt** und **A. Wettstein**.

(30. VI. 51.)

Nach *Pincus* und Mitarbeitern<sup>2)</sup> können Steroide, wie beispielsweise Desoxy-corticosteron, mittels Perfusion durch intakte Rindernebenieren in die synthetisch schwer zugänglichen  $11\beta$ -Oxyderivate, insbesondere Corticosteron, übergeführt werden. Beeindruckt durch diese erfolgreichen Versuche haben wir entsprechende Oxydationen

<sup>1)</sup> 104. Mitt., *Helv.* **34**, 359 (1951).

<sup>2)</sup> *O. Hechter, R. P. Jacobsen, R. Jeanloz, H. Levy, C. W. Marshall, G. Pincus & V. Schenker, Am. Soc.* **71**, 3261 (1949).

mit Hilfe biologischer Systeme *in vitro* untersucht. Nach der Aufnahme unserer Arbeit ist von *Hayano, Dorfman & Prins*<sup>1)</sup> die Einführung von Sauerstoff in 11-Stellung des Steroidgerüsts auch unter der Einwirkung von Nebennieren-Schnitten oder -Homogenaten vermutet worden. Ihre biologischen Testierungen ergaben nämlich die Bildung von Substanzen, welche die Glycogensynthese *in vivo* steigerten. Ferner haben dann *McGinty, Smith, Wilson & Worrel*<sup>2)</sup> sowie *Savard, Green & Lewis*<sup>3)</sup> über Versuche mit Nebennieren-Homogenaten berichtet, wobei tatsächlich aus *Reichstein's* Substanz S (17-Oxy-11-desoxy-corticosteron) *Reichstein's* Substanz M<sup>4)</sup> (17-Oxy-corticosteron) gewonnen und, von den letzteren Autoren, auch die Überführung von Desoxy-corticosteron in Corticosteron papierchromatographisch nachgewiesen wurde. Von *Pincus* und Mitarbeitern<sup>5)</sup> sind inzwischen die verschiedenen Steroide in Blut oder Plasma ohne und mit Zusatz von ACTH<sup>6)</sup> durch ganze Nebennieren perfundiert und die dabei entstehenden Oxydationsprodukte kristallisiert erhalten worden. *Seneca* und Mitarb.<sup>7)</sup> haben schliesslich ausser Schnitten von Nebennieren solche einer Reihe anderer Organe verschiedenen Ursprungs verwendet, erfolgreich insbesondere auch Lebern, Nieren, Testes und Ovarien, ohne jedoch die bei der Reaktion entstehenden Oxydationsprodukte rein zu isolieren. Aus Desoxy-corticosteron soll nach den letztgenannten Autoren direkt Cortison (*Kendall's* Verbindung E), d. h. das 11-Oxo-17 $\alpha$ -oxy-Derivat entstehen und nicht Corticosteron oder eventuell 17-Oxy-corticosteron.

In unseren Versuchen erwiesen sich in der Tat auch Nebennieren-Homogenate verwendbar. Die allgemeine Methode bestand darin, die schlachtfrischen Organe mit einer üblichen Verdünnungslösung, gewissen „zusätzlichen Substanzen“ sowie den nicht acetylierten Steroiden in Lösung oder in Pulverform zu homogenisieren. Die Mischung behandelten wir bei 37° während 1–4½ Stunden mit Sauerstoff oder Wasserstoffsuperoxyd und Katalase, wobei das pH ungefähr konstant gehalten wurde. Bezüglich Nachweis der Oxydationsprodukte und unveränderten Ausgangsstoffe mit Farbreaktionen und Papierchromatographie sowie hinsichtlich der Aufarbeitung und Isolierung durch Extraktion, Silicagel-Chromatographie, Verteilung zwischen Lösungsmitteln usw. sei auf den experimentellen Teil verwiesen.

<sup>1)</sup> *M. Hayano, R. I. Dorfman & D. A. Prins*, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **72**, 700 (1949).

<sup>2)</sup> *D. A. McGinty, G. N. Smith, M. L. Wilson & C. S. Worrel*, Science **112**, 506 (1950).

<sup>3)</sup> *K. Savard, A. A. Green & L. A. Lewis*, J. of Endocrinology **47**, 418 (1950).

<sup>4)</sup> *Reichstein's* Substanz M ist bekanntlich identisch mit dem von *Kendall* später als „compound F“ bezeichneten 17-Oxy-corticosteron.

<sup>5)</sup> *O. Hechter, R. P. Jacobsen, R. Jeanloz, H. Levy, C. W. Marshall, G. Pincus & V. Schenker*, Arch. Biochemistry **25**, 457 (1950).

<sup>6)</sup> *A. Zaffaroni, O. Hechter & G. Pincus*, Am. Soc. **73**, 1390 (1951).

<sup>7)</sup> *H. Seneca, E. Ellenbogen, E. Henderson, A. Collins & J. Rockenbach*, Science **112**, 524 (1950).

Der Grossteil unserer Versuche betraf die Oxydation von Substanz S zu Substanz M, wobei wir unser Augenmerk auf die für die Oxydation in 11-Stellung mittels Organhomogenaten wesentlichen Milieubedingungen richteten, die auch für die biologische Aktivität des entstehenden sogenannten „Glucocorticoids“ von Bedeutung sein könnten. Aus den in Tabelle I (siehe experimenteller Teil) zusammengestellten Daten über den Einfluss des pH ergibt sich erst einmal, dass die Bildung von Substanz M aus Substanz S mit Hilfe von Nebennieren ein Optimum im Bereiche von pH 7–8 aufweist.

Gewisse Bestandteile der normalen Verdünnungslösung, wie Glucose, Magnesiumsulfat und Phosphat, konnten ohne Nachteil weggelassen werden (s. Tabelle II). In Versuchen ohne Zugabe von Steroiden wurden hingegen, infolge der geringen verwendeten Mengen von Nebennieren, keine Corticoide aufgefunden, so dass die Herkunft derselben in den obigen Ansätzen eindeutig ist<sup>1)</sup>.

Zu besonders interessanten Befunden führte die Beobachtung, dass zwar gelegentlich ohne Zusatz von Fumarsäure Spuren von Substanz M nachgewiesen werden konnten, erhebliche, isolierbare Mengen des Oxydationsproduktes aber nur in Gegenwart dieser Säure entstanden. *Hayano* sowie *McGinty* und ihre Mitarbeiter (loc. cit.) erwähnen bereits beiläufig deren Verwendung in ihren Systemen, jedoch ohne auf die besondere Bedeutung dieser Substanz hinzuweisen.

In Kenntnis der Bedeutung der Fumarsäure, haben wir in der Folge nach Verbindungen gesucht, welche die Fumarsäure ersetzen können. Die Resultate mit solchen „zusätzlichen Substanzen“ gehen aus Tabelle III hervor. Tatsächlich sind eine ganze Reihe der untersuchten Carbonsäuren imstande, die Funktion der Fumarsäure in unserem System zu erfüllen. Besonders die Säuren des *Krebs'schen* Citronensäurecyclus der Kohlehydrat-Oxydation haben sich, soweit sie geprüft wurden, als aktiv erwiesen<sup>2)</sup>, ferner die diesen nahestehenden Verbindungen, Milchsäure und die Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin. Analog wirken auch einige Säuren, die nur bedingt in diesen Zusammenhang hineingehören, wie beispielsweise Malonsäure, Glykokoll, Tryptophan, Tyrosin und Prolin. Mehrere der genannten Verbindungen gehören nach *Green*<sup>3)</sup> zu den Sub-

<sup>1)</sup> Über die Bildung von Corticoiden in Nebennieren bzw. Homogenaten im allgemeinen und unter der Einwirkung von ACTH vgl. *H. Reich, D. H. Nelson & A. Zaffaroni*, J. Biol. Chem. **187**, 411 (1950); *O. Hechter*, Fed. Proc. **8**, 70 (1949); **9**, 58 (1950); *G. Pincus* loc. cit.; *G. Pincus, O. Hechter & A. Zaffaroni*, Proc. Second Clin. ACTH Conference **1**, 40 (1951), und *C. S. Vestling, G. F. Lata, Science* **113**, 582 (1951).

<sup>2)</sup> Sie wirken möglicherweise als sog. Cooxydantien im Sinne von *A. L. Graefflin & D. E. Green*, J. Biol. Chem. **176**, 95 (1948).

<sup>3)</sup> *D. E. Green* und Mitarbeiter, u. a. J. Biol. Chem. **172**, 389 (1948), Arch. Biochem. **27**, 428 (1950); *F. Leuthardt & J. Mauron*, Helv. Physiol. Acta **8**, 386 (1950); *H. L. Nakada & S. Weinhouse*, J. Biol. Chem. **187**, 663 (1950).

straten der Enzyme des Cyclophorasesystems. In dem von uns verwendeten Organmaterial ist dieses Enzymsystem offensichtlich ebenfalls enthalten; ob es für die Hydroxylierung in 11-Stellung direkt verantwortlich ist, müssten Versuche mit isolierten Enzymen ergeben<sup>1)</sup>. Zur Abgrenzung der Spezifität unseres Systems sei bemerkt, dass die Fumarsäure z.B. nicht durch Maleinsäure ersetzt werden kann und auch die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren sowie die Oxalsäure wirkungslos sind. Schliesslich muss die im Gegensatz zur Angabe von *Savard* und Mitarb. (loc. cit.), aber in Übereinstimmung mit *Seneca* und Mitarb. (loc. cit.) gefundene Wirksamkeit von Ascorbinsäure hervorgehoben werden.

In unserer Versuchsanordnung hat sich also der Zusatz u.a. von Verbindungen, die für den Kohlehydrat- und den damit zusammenhängenden Aminosäure-Metabolismus typisch sind, als notwendig erwiesen. Dieser Befund veranlasste die Prüfung der in diese Stoffwechsel eingreifenden Coenzyme, vorerst<sup>2)</sup> der Cozymase- bzw. Flavoprotein-Spaltstücke Nicotinsäure-amid, Adenin, Adenosin und seiner Phosphorylierungsprodukte. Bekanntlich bewähren sich die letzteren in fast allen oxydativen Homogenat-Systemen, deren Aktivität mit ihrer Hilfe oder auch mit Nicotinamid erhalten werden kann<sup>3)</sup>. Speziell auch der enzymatische Abbau von Sexualhormonen wird durch Cozymase stimuliert<sup>4)</sup>.

Die Ergebnisse mit den genannten Aktivatoren sind in der Tabelle IV zusammengestellt. Danach vermag die Verwendung von Nicotinsäure-amid zusätzlich zu Fumarsäure oder Citronensäure die Menge des entstehenden 11-Oxy-Produktes (der Substanz M und insbesondere des Corticosterons) um das 1–2fache zu steigern. Aber auch sonst verändert das Nicotinsäure-amid den Verlauf der Reaktion offensichtlich erheblich: So wird durch 0,1 Mol des Amids das pH innert der ersten zwei Stunden nach der alkalischen Seite verändert (vgl. Tabelle V). Höhere Konzentrationen (0,5- und 1,0-molar) verhindern dann die Steroid-Umwandlung vollständig, und das Ausgangsmaterial wird quantitativ zurückgewonnen. Auffallenderweise vermag das Nicotinsäure-amid die Fumarsäure nicht zu ersetzen; seine Wirksamkeit ist an die Anwesenheit der obgenannten Cooxydantien gebunden.

Die Frage nach der Bedeutung des Nicotinsäure-amids in unserem System lässt sich wohl dahin beantworten, dass auch hier eine Schutzwirkung auf die Cozymase ausgeübt wird<sup>3)</sup>. Die Phosphopyridin-

<sup>1)</sup> Bisher wurden ausschliesslich Gesamthomogenate und noch nicht die eventuell allein aktiven Mitochondrien untersucht.

<sup>2)</sup> Versuche mit Cytochromen sollen folgen.

<sup>3)</sup> Siehe z.B. *P. J. G. Mann & I. H. Quastel*, *Biochem. J.* **35**, 502 (1941); *Ph. Handler & J. R. Klein*, *J. Biol. Chem.* **143**, 49 (1942); **144**, 453 (1942).

<sup>4)</sup> *R. H. DeMeio, A. E. Rakoff, A. Cantarow & K. E. Paschkis*, *Endocrinology* **43**, 97 (1948); *R. L. Coppedge, A. Segaloff, H. P. Sarett & A. M. Altschul*, *J. Biol. Chem.* **173**, 431 (1948); *M. L. Sweat & L. T. Samuels*, *J. Biol. Chem.* **173**, 433 (1948); **175**, 1 (1948).

nucleotide wären damit ebenfalls für diese spezielle Steroid-Oxydation von besonderer Bedeutung.

In der Tat konnten wir weiter feststellen (siehe ebenfalls Tabelle IV), dass einerseits die anderen untersuchten Bausteine der Cozymase, die Nicotinsäure, das Adenin und Adenosin, und andererseits die Hefe-Adenylsäure<sup>1)</sup>, ähnlich wirksam und sogar imstande sind, die Funktion der Fumarsäure zu übernehmen. Alle bisherigen Befunde sprechen also für einen engen Zusammenhang der Bildung der Glucocorticoide mit dem Kohlehydrat-Stoffwechsel, den sie umgekehrt wesentlich beeinflussen. Nun sind Phosphopyridin-nucleotide bekanntlich ausser für die Oxydo-Reduktions-Vorgänge auch für die gekoppelten Phosphorylierungen verantwortlich. Es darf deshalb vermutet werden, dass letztere in unserem System ebenfalls Wichtigkeit besitzen, sei es auch vielleicht nur durch Bildung phosphorylierter wasserlöslicher Derivate der, physiologisch betrachtet, in grossem Überschuss angewandten Steroide.

Versuche mit anderen Organen sollten die Organspezifität der Oxydationswirkung von Nebennieren abklären. Im Laufe der letzten Jahre sind eine ganze Anzahl von Steroiden mit Sauerstoff in 11-Stellung im Harn von normalen Personen und von Patienten festgestellt worden, so dass die Prüfung von Nieren und ferner von Lebern, die bekanntlich im Steroidmetabolismus eine wichtige Rolle spielen, interessant erschien. Da von *Green* (loc. cit.) das Cyclophorase-system auch in Herz und Hirn nachgewiesen wurde, bezogen wir auch diese Organe in die Prüfung mit ein. Wie u. a. aus Tabelle VI ersichtlich, vermag tatsächlich auch Leber (Kalb oder Kaninchen) sowie Niere (Kalb) in Anwesenheit von Fumar- oder Citronensäure in vitro Substanz S in Substanz M überzuführen, wahrscheinlich aber in geringerem Masse als die Nebennieren vom Rind oder Schwein. Die analoge Verwendung von schlachtfrischem Kalbsherz und Kalbs-hirn führte nicht zur Oxydation der Substanz S. Der grösste Teil des eingesetzten Ausgangsmaterials wurde unverändert zurückgewonnen. Es ist somit eine gewisse Organspezifität festzustellen, für die wohl die Eiweisskomponente der Holofermente verantwortlich ist.

Im experimentellen Teil sind ferner noch die Oxydation einer etwas grösseren Menge Substanz S und Desoxy-corticosteron mit Hilfe von Homogenat aus Rindernebennieren beschrieben, unter Isolierung von krist. Substanz M bzw. Corticosteron. Auch hier traten offensichtlich erhebliche Verluste bei der Aufarbeitung ein, da die aus den Nebennieren mitextrahierten Begleitstoffe mit stark lösungsvermittelnder Wirkung ein Vielfaches der eingesetzten Steroidmenge und insbesondere des zu isolierenden Oxydationsproduktes betrug. Durch weitere Ausarbeitung des Verfahrens lässt sich die Ausbeute deshalb zweifellos noch erhöhen. Schliesslich ist eine Variante der Oxydation von Desoxy-

<sup>1)</sup> Die höheren Phosphorylierungsprodukte ADP und ATP sowie die beiden Coenzyme DPN und TPN selbst sind noch in Prüfung.

corticosteron beschrieben, bei der man, statt Sauerstoff durch das Reaktionsgemisch zu leiten, eine Wasserstoffsuperoxyd-Lösung in Gegenwart von Katalase zum Homogenat zutropfte. Auch auf diese Weise liess sich die Oxydation in 11-Stellung bewerkstelligen und das aus Desoxy-corticosteron gebildete Corticosteron isolieren.

Unter den angegebenen Bedingungen sind beschränkte Mengen der klinisch interessanten<sup>1)</sup> Nebennierenrinden-Hormone Corticosteron und 17-Oxy-corticosteron verhältnismässig leicht darstellbar.

## Experimenteller Teil.

### A. Allgemeine Methode.

Als Organe verwendeten wir Nebennieren von Rindern (Kälbern, Kühen, Ochsen) und Schweinen, Lebern von Kälbern und Kaninchen sowie Nieren vom Kalb. Herz und Hirn von letzterem erwiesen sich als ungeeignet.

Die schlachtfrischen Organe wurden in einem Homogenisator<sup>2)</sup> während 2–3 Min. mit einer verdünnten Salzlösung vom pH 7,5 (in der Folge Verdünnungslösung genannt) homogenisiert, wobei man durch Zusatz von Natronlauge das pH meist zwischen 7 und 7,5 hielt. Die Verdünnungslösung enthielt normalerweise im Liter (Abänderungen vgl. bei den einzelnen Versuchen) 0,1 Mol Glucose, 0,062 Mol NaCl, 0,02 Mol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,025 Mol KCl und 0,004 Mol  $\text{MgSO}_4$ . Mit dieser Verdünnungslösung gab man gleichzeitig die zu prüfenden „zusätzlichen Substanzen“ zu. Die zu oxydierenden, in 21-Stellung nicht acetylierten Steroide<sup>3)</sup> wurden dem Homogenat in Lösung oder in Pulverform zugefügt. Die Reaktionsmischung homogenisierte man nochmals 2–3 Min. und brachte sie dann in einen mit Rührer und Gaseinleitungsrohr versehenen Kolben. Nun wurde in die Mischung bei 37° Sauerstoff eingeleitet oder eine Wasserstoffsuperoxyd-Lösung langsam zutropft. Im letzteren Falle fügte man noch etwas Katalase zu. Allzu starke Schaumentwicklung liess sich durch Drosselung des Sauerstoffstromes oder durch Zugabe weniger Tropfen Octanol verhindern. Das potentiometrisch mit einer Beckman-Glas-elektrode gemessene pH der Reaktionsmischung wurde während dem Versuch möglichst auf dem gewünschten Wert konstant gehalten.

Zur Isolierung der Oxydationsprodukte stellten wir am Ende der gewählten Reaktionsdauer das pH mit Salzsäure auf ca. 1,5–2,0, gossen das Ganze in das 10fache Volumen Aceton und liessen unter gelegentlichem Umrühren bei Zimmertemperatur stehen. Die gelbbraune Lösung wurde durch Abnutschen vom Unlöslichen getrennt und der unlösliche Teil dreimal mit heissem Aceton gewaschen. Durch Eindampfen der vereinigten Acetonlösungen im Wasserstrahlvakuum entfernte man das Aceton vollständig. Die zurückbleibende wässrige Lösung wurde mit Kochsalz gesättigt und zusammen mit den sich während dem Eindampfen ausgeschiedenen Ölen und Niederschlägen im Scheidetrichter so lange mit Essigester extrahiert, bis derselbe farblos war. Die organischen Auszüge wurden mit Wasser und anschliessend mit gesättigter Hydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrigen Phasen einmal mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterlösungen wusch man mit verdünnter Salzsäure und

<sup>1)</sup> J. W. Conn, S. S. Fajans, L. H. Louis & B. Johnson, J. Lab. a. Clin. Med. **36**, 813 (1950); Proc. Second Clin. ACTH Conference **1**, 221 (1951); P. Fourman, F. C. Bartter, F. Albright, E. Dempsey, E. Carroll & J. Alexander, J. Clin. Invest. **29**, 1462 (1950).

<sup>2)</sup> Wir verwendeten den von der Fa. Ed. Aerne S. A., Zürich, fabrizierten „Cuisto-Apparat“.

<sup>3)</sup> Insbesondere Desoxycorticosteron und Substanz S. Letztere ist von Dr. J. Schmidlin (vgl. J. Schmidlin, K. Miescher, Helv. **33**, 1840 (1950)) hergestellt worden, wofür wir bestens danken. Bei Verwendung des 21-Acetats wurde nur solches, ferner die freie Verbindung und freie Substanz M, kein Acetat derselben erhalten. Die Reaktion scheint also über die freien Verbindungen abzulaufen.

schliesslich nochmals mit Wasser. Diese Ausschüttelungen haben rasch zu erfolgen, so dass die Essigesterlösungen nur kurze Zeit der alkalischen und sauren Reaktion ausgesetzt sind. Schliesslich wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand löste man in Chloroform und untersuchte eine Probe papierchromatographisch, um festzustellen, ob sich die Oxydationsprodukte in genügender Menge gebildet hatten. Gegebenenfalls wurden die Essigesterextrakte aus verschiedenen Ansätzen vereinigt und mit Petroläther 1 Stunde am Rückfluss gekocht. Die nachher auf Zimmertemperatur abgekühlte Lösung wurde filtriert oder abgenutscht. Im Petroläther lösten sich braun gefärbte Substanzen und als unlöslicher Rückstand blieben die noch unreinen Steroide (Ausgangsmaterial und Oxydationsprodukt) zurück. Die Rückstände der in Petroläther löslichen Anteile zeigten bei der papierchromatographischen Analyse in den Versuchen mit Substanz S keine Steroide, in den Versuchen mit Desoxy-corticosteron waren manchmal noch gewisse Mengen dieses Ausgangsstoffes nachzuweisen.

Bei der Oxydation von Substanz S konnten die petrolätherunlöslichen Rückstände aus Chloroform umkristallisiert werden, wobei die in diesem Lösungsmittel schwerlöslichen Fraktionen fast reine Substanz M und die in Chloroform leichter löslichen mit Substanz M verunreinigtes Ausgangsmaterial (Substanz S) darstellten. Für die Entfernung der Substanz S in den letzteren Fraktionen wurde nach dem von *Pincus* und Mitarbeitern (loc. cit.) angegebenen Verfahren an Silicagel (*Davison*) chromatographiert und das isolierte 11-Oxysteroid nach Umkristallisation durch Mischschmelzpunkt und Bestimmung der optischen Drehung identifiziert.

Die Essigesterextrakte, welche bei den Versuchen mit Desoxy-corticosteron gewonnen wurden, liessen bei der Behandlung mit Petroläther das Oxydationsprodukt ungelöst zurück. Es stellte ein dunkel gefärbtes Pulver vor, welches zur Trennung in die Komponenten an Silicagel chromatographiert werden musste.

Zur ersten Orientierung besonders über die aus den Silicagelchromatogrammen eluierten Steroide bedienten wir uns der bekannten Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure. Corticosteron und Substanz M zeigen nach *Wintersteiner & Pfiffner*<sup>1)</sup> sowie *Reichstein*<sup>2)</sup> eine gelbgrüne, vorübergehende Fluoreszenz, während Substanz S nach einer gewissen Zeit eine karminrote Färbung ergibt (*Miescher & Schmidlin*<sup>3)</sup>). Dadurch war es möglich, in Gemischen von Substanz S und M die letztere an ihrer gelbgrünen Fluoreszenz zu erkennen, bevor die karminrote Färbung von S eintrat.

Der Nachweis der 11-Oxysteroiden in den verschiedenen Fraktionen erfolgte primär jeweils mittels Papierchromatographie<sup>4)</sup>. Durch Auftropfen verschiedener Volumina von Lösungen der erhaltenen Verbindungen parallel mit Verdünnungsreihen der Testsubstanzen (11-Desoxy-corticosteron, 11-Dehydro-corticosteron<sup>5)</sup>, Corticosteron<sup>6)</sup>, Substanz S, Substanz E, Substanz M<sup>6)</sup> sowie deren Monoacetate), in Chloroform oder Methanol gelöst, liessen sich die Mengen der in den verschiedenen Fraktionen enthaltenen Substanzen verhältnismässig leicht abschätzen.

<sup>1)</sup> O. Wintersteiner & J. J. Pfiffner, J. Biol. Chem. **116**, 292 (1936).

<sup>2)</sup> T. Reichstein, Helv. **19**, 1113 (1936); **20**, 953 (1937).

<sup>3)</sup> K. Miescher & J. Schmidlin, Helv. **33**, 1840, 1847 (1950).

<sup>4)</sup> Vgl. z. B. A. Zaffaroni, Am. Soc. **72**, 3828 (1950); mit R. B. Burton & E. H. Keutmann, J. Biol. Chem. **177**, 109 (1949); **188**, 763 (1951), Science **111**, 6 (1950); ferner Savard und Mitarbeiter, loc. cit.

Dr. R. Neher sei für die Durchführung der mehreren Tausend papierchromatographischen Analysen und die Entwicklung entsprechend verbesserter Methoden bestens gedankt, ebenso Herrn E. von Arx. Es ist beabsichtigt, in grösserem Zusammenhang über die Steroidbestimmung mit Papierchromatogrammen demnächst zu berichten, so dass hier auf eine Beschreibung der angewandten Methode verzichtet werden kann.

<sup>5)</sup> Von Dr. Hugo Frey vor längerer Zeit nach T. Reichstein & A. Lardon (Helv. **26**, 747 (1943)) in unserem Laboratorium hergestellt.

<sup>6)</sup> Prof. T. Reichstein sind wir für die Überlassung von Proben von Corticosteron und Substanz M sehr zu Dank verpflichtet.

## B. Verschiedene Reaktionsbedingungen.

In den folgenden Tabellen sind die wichtigeren Versuchsdaten zusammengestellt. Die Diskussion der Resultate im Hinblick auf die verschiedenen Versuchsvariablen findet sich im theoretischen Teil. Die Bildung des Oxydationsproduktes und der Gehalt unverbrauchten Ausgangsmaterials wurden jeweils durch Papierchromatographie des Essigesterextraktes nachgewiesen.

a) Einfluss des pH: Ansatz: je 51 g Homogenat aus Rindernebnieren in 100 cm<sup>3</sup> Verdünnungslösung mit 232 mg Fumarsäure. Steroid: je 100 mg Substanz S in 50 cm<sup>3</sup> Propylenglykol. Temperatur 37°. Durchleiten von Sauerstoff. Versuchsdauer 3 Std.

**Tabelle I.**  
Einfluss des pH.

pH des Reaktionsgemisches:				Gehalt an 17-Oxy- corticosteron
Zu Beginn	Nach 15 Min.	Korrigiert mit HCl bzw. NaOH	Nach 3 Std.	
6,03	6,40	6,01	6,00	0
6,57	6,58	—	6,55	+
7,02	7,10	—	7,10	++
7,45	7,45	—	7,41	+++
7,98	7,70	7,99	7,85	++
9,01	8,40	9,20	8,93	+

b) Einfluss von Fumarsäure und gewisser Bestandteile der Verdünnungslösung. Ansatz: Menge Homogenat von Rindernebnieren in je 100 cm<sup>3</sup> Verdünnungslösung vgl. Tabelle II; Versuche Nr. 3—9 mit je 232 mg Fumarsäure (0,02-molar). Steroid: je 100 mg Substanz S in 50 cm<sup>3</sup> Propylenglykol. Temperatur 37°. Durchleiten von Sauerstoff.

**Tabelle II.**  
Einfluss von Fumarsäure und gewisser Bestandteile der Verdünnungslösung.

Versuch Nr.	Nebenniere g	Verdünnungslösung	pH des Reaktionsgemisches			Totale Reaktionszeit, Stunden	17-Oxy- corticosteron
			zu Beginn	nach 30'	beim Ende		
1	51	ohne Fumarsäure	6,98	6,78	6,57	3	0
2	51	ohne Fumarsäure	7,32	7,28	7,25	2½	0
3	51	ohne Glucose	6,78	6,78	6,78	4½	+
4	53	ohne Glucose	7,35	7,25	7,48	2½	++
5	34	ohne Glucose	7,32	7,54	7,54	1	++
6	53	{ ohne Glucose ohne MgSO <sub>4</sub> }	7,38	7,56	7,49	2½	++
7	46	ohne Phosphat	7,42	7,42	7,25	2½	++
8	51	normal	7,45	7,38	7,38	2½	++
9	51	ohne Nebenniere	7,29	7,29	7,25	3	0

c) Einfluss „zusätzlicher Substanzen“: Tabelle III fasst die Ergebnisse derjenigen Versuche zusammen, in denen die als notwendig erkannte Fumarsäure durch entsprechende Mengen<sup>1)</sup> anderer Säuren ersetzt wurde.

<sup>1)</sup> Konzentrationen ca. 0,02—0,04-molar. Höhere Konzentrationen (z. B. 0,5—2,0-molar) erwiesen sich als ungünstig. Wahrscheinlich schadet die in diesen Fällen zu hohe Ionenstärke den Organbestandteilen.



**Tabelle III.**  
Zusätzliche Substanzen.

Ver- such Nr.	Zusätzliche Substanz		Neben- niere g	Lö- sungs- mittel für Subst. S	pH des Reaktionsgemisches				Totale Reak- tions- zeit, Std.	Su b- stanz M
	Art	g			nach 10'	nach 30'	erhöht auf	beim Ende		
1	Citronensäure . . .	0,420	47	P	6,58	6,81	6,85	7,00	3	++
2	cis-Aconitsäure . .	0,348	47,5	—	7,38	7,13	7,46	7,22	3	+
3	$\alpha$ -Ketoglutarsäure .	0,292	47,5	—	7,48	7,28	7,45	7,27	3	++
4	Bernsteinsäure . .	0,236	51	P	6,58	6,90	—	6,71	2½	+
5	DL-Äpfelsäure . .	0,356	51	P	6,50	6,52	—	6,57	4½	++
6	Oxalelessigsäure . .	0,528	50	—	7,35	7,30	7,50	7,30	4	+
7	Brenztraubensäure	0,166	47	P	6,49	6,69	—	6,63	3	+
8	Brenztraubensäure	0,166	50	P	7,37	7,15	7,20	7,10	3	++
9	Milchsäure . . . .	0,180	50	P	7,17	7,12	—	7,01	3½	++
10	Malonsäure . . . .	0,208	50	P	7,20	7,20	—	7,10	3½	+
11	Glutarsäure . . . .	0,264	50	P	7,04	7,19	—	7,09	3½	++
12	Adipinsäure . . . .	0,292	50	P	7,20	7,15	—	7,05	3½	+
13	Dioxyweinsäure . .	0,364	51	P	7,04	7,02	—	6,96	3½	+
14	DL-Glutaminsäure .	0,584	54	P	7,14	7,01	—	6,91	3	++
15	D-Glutaminsäure . .	0,584	35	P	7,28	7,12	7,18	7,18	2½	+
16	DL-Asparaginsäure	0,532	54	P	7,18	7,05	—	6,90	3	++
17	DL-Asparagin . . .	0,528	54	P	7,22	7,11	—	6,95	3	++
18	DL-Alanin . . . . .	0,356	54	P	6,92	6,58	7,09	6,99	3	++
19	DL-Serin . . . . .	0,210	47,5	—	7,42	7,05	7,42	7,28	2½	++
20	Glykokoll . . . . .	0,124	47,5	—	7,42	7,18	7,52	7,25	2½	++
21	L-Tryptophan . . .	0,408	41	—	7,50	7,17	7,52	7,30	2	+
22	L-Tyrosin . . . . .	0,362	41	—	7,62	7,23	7,60	7,35	2	+
23	DL-Prolin . . . . .	0,460	53	—	7,59	7,20	7,28	7,12	2	+
24	L-Ascorbinsäure . .	0,352	50	P	7,03	7,06	—	6,91	3½	++
25	Ameisensäure . . .	0,092	35	P	7,45	7,32	7,45	7,23	3	0
26	Essigsäure . . . . .	0,120	54	P	7,28	7,13	—	7,03	3	0
27	Essigsäure . . . . .	0,240	59	P	7,28	7,12	7,25	7,12	3	0
28	Propionsäure . . .	0,144	54	P	7,12	7,10	—	7,07	3	0
29	Propionsäure . . .	0,288	59	P	7,44	7,18	7,30	7,19	3	0
30	Buttersäure . . . .	0,176	54	P	7,07	7,07	—	6,95	3	0
31	Buttersäure . . . .	0,352	59	P	7,28	7,15	7,30	7,20	3	0
32	Valeriansäure . . .	0,204	54	P	7,11	7,08	7,12	7,01	3	0
33	Oxalsäure . . . . .	0,252	35	P	7,37	7,22	7,34	7,17	3	0
34	Weinsäure . . . . .	0,600	57	P	6,71	6,50	6,81	6,70	3	0
35	Maleinsäure . . . .	0,232	51	P	6,88	7,01	7,10	6,89	3	0
36	Dioxymaleinsäure	0,264	51	P	7,19	7,29	—	7,43	3½	0?
37	Mesoxalsäure . . .	0,336	47	P	6,54	6,60	7,01	6,85	3	0
38	Ölsäure . . . . .	0,564	51	P	6,95	6,97	—	6,93	3½	0
39	Linolsäure . . . . .	0,560	51	P	7,03	7,04	—	7,02	3½	0
40	Formaldehyd . . .	0,060	35	P	7,34	7,25	7,35	7,11	3	0
41	Fumarsäure . . . .	0,232	53	Ät	7,52	7,32	7,50	7,45	3	++

**Tabelle IV.**  
Einfluss von Nicotinsäure, Adenin und deren Derivaten.

Ver- such Nr.	Zusätze	Molarität in der Ver- dünnungs- lösung	Neben- niere g	Verdünnungslösung cm <sup>3</sup>	Steroid Art mg	Totale Reak- tionszeit, Std.	17-Oxy- corticosteron bzw. Corticosteron
1	Nicotinsäureamid	0,04	50	200 mit NaCl	S	3 ½	0
2	Nicotinsäureamid	0,1	97,5	300 mit NaCl	S	4 ½	0
3	Fumarsäure . . . . .	0,04	65	200 mit NaCl	S	3 ½	++
4	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,1 0,04 }	97,5	300 mit NaCl	S	4 ½	++
5	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,5 0,04 }	97,5	300 mit NaCl	S	4 ½	+
6	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 1,0 0,04 }	97,5	300 mit NaCl	S	4 ½	0
7	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,04 0,04 }	50	200 mit NaCl	S	3 ½	++
8	Nicotinsäureamid	0,1	50	200 ohne NaCl	S	4	0
9	Fumarsäure . . . . .	0,1	50	200 ohne NaCl	S	3 ½	++
10	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,1 0,1 }	50	200 ohne NaCl	S	3 ½	++
11	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,1 0,04 }	67	200 ohne NaCl	S	4 ½	++
12	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,1 0,1 }	95	500 ohne NaCl	S	4 ½	++
13	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,1 0,1 }	74	400 ohne NaCl	S	5 ½	++
14	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,1 0,04 }	67	200 ohne NaCl	S	4 ½	++
15	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,1 0,04 }	67	200 ohne NaCl	S	4 ½	++
16	Nicotinsäure . . . . .	0,1	67	200 ohne NaCl	S	4 ½	++
17	Fumarsäure . . . . .	0,1	50	250 mit NaCl	Des.	4	+
18	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . . . }	{ 0,1 0,1 }	137	500 mit NaCl	Des.	4	++

**Tabelle IV (Fortsetzung).**  
Einfluss von Nicotinsäure, Adenin und deren Derivaten.

Ver- such Nr.	Zusätze	Molarität in der Ver- dünnungs- lösung	Neben- niere g	Verdünnungslösung cm <sup>3</sup>	Steroid Art	Totale Reak- tionszeit, Std.	17-Oxy- corticosteron
19	{ Nicotinsäureamid . . . . . Fumarsäure . . . . .	{ 1,0 0,1 }	50	250 mit NaCl	Des.	4	0
20	{ Nicotinsäureamid . . . . . Fumarsäure . . . . .	{ 0,1 0,1 }	95	500 ohne NaCl	Des.	4½	+ (+)
21	{ Nicotinsäureamid . . . . . Fumarsäure . . . . .	{ 0,1 0,1 }	97	500 ohne NaCl	Des.	4	+ + (+)
22	{ Nicotinsäureamid . . . . . Fumarsäure . . . . .	{ 0,1 0,04 }	174	750 ohne NaCl	Des.	4½	+ + +
23	{ Adenin . . . . .	{ 0,01	50	250 ohne NaCl	S	4	+ +
24	{ Adenin . . . . .	{ 0,1	56	250 ohne NaCl	S	4½	+ +
25	{ Adenin . . . . . Fumarsäure . . . . .	{ 0,02 0,02 }	50	250 ohne NaCl	S	4	+ + +
26	{ Adenin . . . . . Nicotinsäureamid . . . . .	{ 0,1 0,1 }	56	250 ohne NaCl	S	4½	+ + +
27	{ Adenin . . . . . Nicotinsäureamid . . . . . Fumarsäure . . . . .	{ 0,1 0,1 0,04 }	56	250 ohne NaCl	S	4½	+ + +
28	{ Adenosin . . . . .	{ 0,01	50	250 ohne NaCl	S	4	+ + +
29	{ Adenosin-3-phosphorsäure . . . . .	{ 0,0075	50	250 mit NaCl	S	4	+ + +
30	{ Adenosin . . . . . Fumarsäure . . . . .	{ 0,01 0,02 }	50	250 ohne NaCl	S	4	+ + +
31	{ Adenosin-3-phosphorsäure . . . . . Fumarsäure . . . . .	{ 0,007 0,04 }	65	200 mit NaCl	S	5	+ + +
32	{ Adenosin-3-phosphorsäure . . . . . Fumarsäure . . . . . Nicotinsäureamid . . . . .	{ 0,0072 0,04 0,1 }	65	200 mit NaCl	S	5	+ + +
33	{ Adenosin-3-phosphorsäure . . . . . Fumarsäure . . . . . Natriumpyrophosphat . . . . .	{ 0,02 0,02 0,2 }	76	400 ohne NaCl ohne Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Des.	4	+ + + +

Ansätze: Menge Homogenat aus Rindernebennieren vgl. Tabelle III. Je 100 cm<sup>3</sup> normale Verdünnungslösung, in den Versuchen Nr. 2, 3, 6, 19 und 20—23 aber je 150 cm<sup>3</sup>. Steroid: je 100 mg Substanz S in 50 cm<sup>3</sup> Propylenglykol (P) oder Äthylenglykol (Ät). In einigen Versuchen (mit — bezeichnet) wurde die Substanz S ohne Lösungsmittel zum Homogenat gegeben. In allen diesen Ansätzen ist das fertige Reaktionsgemisch vor Beginn nochmals homogenisiert worden. Temperatur 37°. Durchleiten von Sauerstoff.

d) Einfluss von Nicotinsäure, Adenin und deren Derivaten: Die Versuche haben wir in ähnlicher Weise wie vorne unter A beschrieben durchgeführt (Durchleiten von O<sub>2</sub>, 37°C). In Tabelle IV sind die Mengen- und Volumenverhältnisse der einzelnen Komponenten des Reaktionsgemisches angegeben. Bisher wurde lediglich Hefe-, nicht Muskel-Adenylsäure angewandt. Auf die Verwendung eines Lösungsmittels (Propylen- oder Äthylenglykol) für die Steroide wurde verzichtet. Um die Ionenstärke zu erniedrigen, ist der Verdünnungslösung bei gewissen Versuchen kein Natriumchlorid zugesetzt worden.

In der Tabelle V sind die charakteristischen pH-Werte von einigen Versuchen der Tabelle IV wiedergegeben. Das Nicotinsäureamid bewirkt in Gegenwart von Fumarsäure einen gegenüber den anderen Versuchsanordnungen abweichenden pH-Verlauf, welcher mit einer sichtbaren Verfärbung des Reaktionsgemisches einhergeht. Bei den Versuchen mit Nicotinsäure, Adenin, Adenosin und Adenylsäure ohne Nicotinsäureamid ist der pH-Verlauf dagegen der übliche. Auch in diesen Fällen wurde das pH während der Reaktion durch Zugabe von Natronlauge möglichst in der Nähe des Ausgangswertes gehalten.

Tabelle V.

Einfluss von Nicotinsäureamid auf das pH im Laufe der Reaktion.

Ver- such Nr. *)	Zusätze	Be- ginn	nach 10'	nach 30'	korr. auf	nach 60'	korr. auf	nach 100'	nach 165'	korr. auf	nach 195'
8	Nicotinsäureamid	7,45	7,50	7,38	7,55	7,45	—	7,41	7,30	7,61	7,20
9	Fumarsäure . . . .	7,48	7,50	7,50	—	7,50	—	7,40	7,35	7,50	7,33
10	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . }	7,50	7,55	7,57	—	7,90	7,50	7,63	7,80	—	7,50
16	Nicotinsäure . . . .	7,40	7,39	7,32	—	7,43	—	—	—	—	7,18
21	{ Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . }	7,50	7,52	7,60	—	7,81	—	7,90	7,67	—	7,70
27	{ Adenin . . . . . Nicotinsäureamid Fumarsäure . . . }	7,51	—	7,93	7,49	—	—	7,63	—	—	7,39

\*) Versuchsnummer identisch mit Versuchsnummer der Tabelle IV.

e) Nebennieren von Schweinen: Bei der Verwendung von Schweine- an Stelle von Rindernebennieren ergaben sich in sonst normalen Ansätzen keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den bereits ausführlich beschriebenen Resultaten, so dass auf die Angabe von Einzelheiten verzichtet sei.

f) Verschiedene Organe: Je 121 g schlachtfrische Kalbsleber wurden mit 100 cm<sup>3</sup> Verdünnungslösung in der bereits erwähnten Weise homogenisiert und nach Einstellung des pH auf 7,38 bei 37° mit Sauerstoff durchströmt. Im ersten Versuch waren lediglich 232 mg Fumarsäure, im zweiten Versuch ausserdem noch 100 mg Substanz S als festes Pulver mithomogenisiert worden, während im dritten Versuch statt Fumarsäure 420 mg Citronensäure sowie 100 mg Substanz S Verwendung fanden.

Analoge positive Ergebnisse (Substanz M aus S) lieferten 3 Versuche, in denen je 55 g Homogenat aus Kaninchenleber, 150 cm<sup>3</sup> normale Verdünnungslösung, 100 mg Substanz S sowie 348 mg Fumarsäure, 479 mg Ascorbinsäure oder 584 mg DL-Glutaminsäure angesetzt wurden. Auch hier war in einem Leerversuch ohne Substanz S keines der in Frage stehenden Steroide festzustellen.

**Tabelle VI.**  
Wirkung von Leberhomogenaten.

Versuch	pH des Reaktionsgemisches					17-Oxy- corti- costeron
	nach 10'	nach 30'	erhöht auf	nach 120'	nach 150'	
1	7,38	7,09	7,12	7,10	7,16	0
2	7,42	7,10	7,26	7,20	7,20	+
3	7,45	7,17	7,28	7,19	7,22	+

Auch in zwei Ansätzen mit je 83 g Kalbsniere, 100 cm<sup>3</sup> Verdünnungslösung, 100 mg Substanz S sowie 232 mg Fumarsäure bzw. 420 mg Citronensäure liess sich in gleicher Weise Substanz M neben unverbrauchter Substanz S nachweisen, während in einem Versuch ohne Zugabe der letzteren keine solchen Corticoide aufgefunden wurden.

#### C. Reindarstellung von Substanz F.

Ansatz: Während dem Homogenisieren von 210 g Rindernebennieren mit 1 l Verdünnungslösung, enthaltend 2,32 g Fumarsäure, und 1 g Verbindung S in Substanz wurde das pH auf 7,53 eingestellt. Dann liess man bei 37° Sauerstoff durchströmen, wobei nach 10 Minuten das pH auf 7,37 sank und wieder auf 7,56 gebracht wurde; nach 2 Std. betrug das pH 7,65. Nun gab man nochmals 250 cm<sup>3</sup> Verdünnungslösung mit 0,580 g Fumarsäure sowie 3 g Glykokoll zu, titrierte auf pH 7,55 zurück und erhöhte das im Laufe der dritten Stunde auf 7,35 gesunkene pH danach wieder auf 7,49. Nach 4½ Std. wurde das Reaktionsgemisch mit 35 cm<sup>3</sup> 25-proz. Salzsäure vom pH 7,48 auf 1,65 gestellt, wobei eine starke Fällung eintrat, in 10 Liter Aceton gegossen und unter gelegentlichem Rühren bei Zimmertemperatur 20 Std. stehengelassen. Die gelbbraune Lösung nutschte man vom Niederschlag ab, kochte letzteren dreimal mit je 250 cm<sup>3</sup> Aceton aus und entfernte das Aceton der vereinigten Lösungen im Vakuum. Die zurückbleibende wässrige Lösung wurde mit Kochsalz gesättigt und 14 mal mit insges. 3,4 l Essigester extrahiert und die Essigesterlösung mit 160 cm<sup>3</sup> gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dann mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser behandelt. Die Hydrogencarbonatlösung und das Waschwasser schüttelte man mit 150 cm<sup>3</sup> Essigester aus, vereinigte alle Essigesterlösungen, wusch sie mit 100 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Salzsäure und anschliessend zweimal mit je 100 cm<sup>3</sup> Wasser, trocknete sie über Natriumsulfat und dampfte sie im Vakuum zur Trockne ein. So wurden 7,21 g eines dunkelbraunen Kristallbreies erhalten, in dem papierchromatographisch neben unveränderter Substanz S auch Substanz M nachweisbar war.

Man nahm in 40 cm<sup>3</sup> Benzol-Äther-Gemisch (9:1) auf, wobei 250 mg eines hellbraunen Pulvers ungelöst blieben, welches mit konz. Schwefelsäure die für Substanz S und M typischen Farbreaktionen ergab. Durch mehrfaches Umkristallisieren aus Chloroform sowie Äther-Aceton wurden daraus 160 mg farblose Prismen erhalten vom F. 214—219° und der spezifischen Drehung  $[\alpha]_D = +168^\circ \pm 4^\circ$  (in Äthanol).

Ber. für C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>: C 69,58; H 8,34%. Gef. C 69,58; H 8,44%.

Aus diesen Werten sowie dem geprüften Verhalten im Mischschmelzpunkt und im Papierchromatogramm ergibt sich die Identität der Verbindung mit Substanz F.

Die Mutterlaugen wurden zur Trockne verdampft, zur Benzol-Äther-Lösung gegeben, letztere mit Äther auf ein Volumenverhältnis Benzol-Äther 1:1 verdünnt und an 60 g Silicagel (Davison) chromatographiert.

Die Fraktionen Nr. 2—4 sowie 8—10 (550 mg) wurden in 6 Stufen zwischen je 50 cm<sup>3</sup> Benzol-Methanol (9:1) und 200 cm<sup>3</sup> Wasser entmischt, so dass man den wässrigen Auszug jeweils zu frischer organischer Lösung gab (vgl. Mason & Sprague<sup>1</sup>). Nach dem Ergebnis papierchromatographischer Untersuchung wurde schliesslich der Inhalt von Scheidetrichter 4 (Benzol Nr. 4 + Wasser Nr. 3), von Scheidetrichter 5 (Benzol Nr. 5 + Wasser

<sup>1</sup>) H. L. Mason & R. G. Sprague, J. Biol. Chem. **175**, 451 (1948).

Nr. 2) sowie von Scheidetrichter Nr. 6 (Benzol Nr. 6 + Wasser Nr. 1) vereinigt, eingedampft und der Rückstand mehrfach aus Chloroform und Aceton-Äther-Gemisch umkristallisiert.

Nr.	Eluierungsmittel	cm <sup>3</sup>	mg Rückstand	Papierchromatogramm zeigt	
				Substanz S	Substanz M
1	Benzol-Äther 1:1 . . . . .	120	4160	0	0
2	Benzol-Äther 1:1 . . . . .	350	218	0	Spur
3	Benzol-Äther 1:1 . . . . .	270	64	0	Spur
4	Äther . . . . .	200	59	Spur	Spur
5	Äther . . . . .	150	1063	++ +	0
6	Äther . . . . .	250	114	++ +	0
7	Chloroform-Essigester 1:1 .	250	328	++ +	++
8	Chloroform-Essigester 1:1 .	100	50	0	++
9	Essigester . . . . .	250	137	0	++ +
10	Essigester . . . . .	150	21	0	++ +

Dabei erhielt man noch weitere 120 mg reines 17-Oxy-corticosteron mit obigen Eigenschaften. Insgesamt konnten je nach Reaktionsbedingungen bis zu 40% des eingesetzten S als in 11-Stellung oxydiertes Produkt isoliert werden. Aus einem Teil der unter B vorne beschriebenen Ansätze wurde in ähnlicher Weise Substanz M rein isoliert.

#### D. Reindarstellung von Corticosteron.

a) Zunächst sei der im theoretischen Teil angeführte Versuch zur Oxydation von Desoxy-corticosteron mittels Wasserstoffsuperoxyd und Katalase näher beschrieben. Ansatz: 159 g frische Rindernebenennieren wurden mit 1 l einer wässrigen Lösung, enthaltend 0,2 Mol Glucose, 0,124 Mol NaCl, 0,04 Mol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 Mol KCl, 0,008 Mol MgSO<sub>4</sub> und 0,02 Mol Natriumfumarat, zusammen mit 1 g Desoxy-corticosteron homogenisiert. Zu diesem Homogenat gab man 50 mg Katalase<sup>1)</sup> und liess im Laufe von 2 ½ Std. unter Rühren 150 cm<sup>3</sup> einer 15-proz. Wasserstoffsuperoxyd-Lösung zutropfen. Eine Stunde später wurden noch 15 cm<sup>3</sup> 30-proz. Wasserstoffsuperoxyd-Lösung und 50 mg Katalase zugegeben.

Nach vierstündiger Reaktion wurde die Mischung mit Salzsäure angesäuert, mit 800 cm<sup>3</sup> Essigester versetzt, 1 Std. bei 37° weitergerührt und dann zentrifugiert. Die gelbe Essigesterschicht heberte man ab und rührte die wässrige Phase mit dem Niederschlag bei Zimmertemperatur über Nacht mit frischem Essigester aus. In ähnlicher Weise wurde noch dreimal mit Essigester extrahiert und dann die gesamte Essigesterlösung über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Die erhaltenen 6 g dunkelbraune dickflüssige Masse verteilte man in 6 Stufen zwischen Methanol-Heptan. Die Methanolfractionen enthielten gemäss papierchromatographischer Analyse neben etwas unverändertem Desoxy-corticosteron insbes. das Corticosteron. Sie wurden aus Benzol-Hexan-Gemisch 9:1 an Silicagel chromatographiert. Mit Äther und Äther-Chloroformgemischen gewann man das unveränderte Desoxy-corticosteron zurück, während das Corticosteron mit Essigester eluiert wurde. Letzteres fiel als eine mit Kristallen durchsetzte, schmierige Masse (330 mg) an. Durch weitere Chromatographie lässt sich hieraus reines Corticosteron erhalten; zur Gewinnung eines solchen Präparates ist aber das Verfahren nach b) vorteilhafter.

b) Aufarbeitung des Versuches Nr. 21, Tabelle IV: Nach den bereits beschriebenen Methoden wurden 4,70 g Essigesterextrakt gewonnen und mit 100 cm<sup>3</sup> Petroläther (Kp. 30–60°) am Rückfluss 1 Std. gekocht. Den abgenutzten Rückstand der auf Zimmertemperatur abgekühlten Lösung behandelte man nochmals in gleicher Weise mit 50 cm<sup>3</sup>

<sup>1)</sup> Präparat der Firma Vita-Zyme Laboratories, Chicago.

Petroläther. Es wurden 1,07 g petrolätherunlösliche und 3,63 g petrolätherlösliche Fraktion erhalten. Die papierchromatographische Analyse der ersteren zeigte Desoxy-corticosteron und Corticosteron an. Der petrolätherlösliche Anteil enthielt lediglich Spuren von Desoxy-corticosteron, jedoch kein Corticosteron.

Die in Petroläther unlösliche Fraktion (1,07 g) wurde in 25 cm<sup>3</sup> Benzol gelöst und an 25 g Silicagel (*Davison*) chromatographiert. Die folgende Zusammenstellung orientiert über die Eluate und die papierchromatographische Analyse der einzelnen Fraktionen.

Nr.	Eluierungsmittel	cm <sup>3</sup>	Rückstand mg	nach papierchromatogr. Analyse enthaltend
1	Benzol . . . . .	50	242,4	Desoxy-corticosteron
	Benzol + Äther 3:1 . . . .	100		
2	Benzol + Äther 1:1 . . . .	200	278,8	Desoxy-corticosteron
3	Benzol + Äther 1:1 . . . .	100	46,8	Corticosteron + Spur Desoxy-corticosteron
4	Benzol + Äther 1:1 . . . .	100	94,1	Corticosteron
5	Benzol + Äther 1:3 . . . .	100	114,3	Corticosteron
6	Äther . . . . .	100	41,7	Corticosteron
7	Äther + Chloroform 3:1 . .	100	8,4	Corticosteron
8	Äther + Chloroform 1:1 . .	50	5,3	Corticosteron
9	Chloroform . . . . .	50	2,4	Corticosteron, wenig
10	Chloroform + Essigester 9:1	100	8,5	Corticosteron, Spur
11	Chloroform + Essigester 1:1	100	10,0	Corticosteron, Spur
12	Chloroform + Essigester 1:1	100	2,8	Corticosteron, Spur
13	Chloroform + Essigester 1:1	50	6,0	Corticosteron, Spur
14	Essigester . . . . .	100	9,0	Corticosteron, Spur
15	Essigester + Methanol 1:1 .	200	17,0	Corticosteron, Spur

In den hauptsächlichsten Rohfraktionen werden also aus der eingesetzten Menge von 1 g Desoxy-corticosteron ca. 52% Desoxy-corticosteron und 30% Corticosteron erhalten. Zur Reindarstellung des letzteren wurde z. B. die Fraktion Nr. 5 in wenig Aceton aufgenommen und die Lösung mit Toluol und Pentan versetzt. Es resultierten Kristalle vom Smp. 160—180°. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther schmolzen sie bei 182—186°. Auch aus dem geprüften Verhalten im Mischschmelzpunkt und im Papierchromatogramm ergibt sich die Identität der Verbindung mit Corticosteron.

### Zusammenfassung.

Die Reaktionsbedingungen der Oxydation in 11-Stellung von 17-Oxy-11-desoxy-corticosteron (*Reichstein's* Substanz S) zu 17-Oxy-corticosteron (*Reichstein's* Substanz M) mit Hilfe von Homogenaten der Nebenniere (Rind und Schwein) und die Isolierung der entstandenen Verbindung werden beschrieben. In ähnlicher Weise lässt sich Desoxy-corticosteron in Corticosteron überführen. Die Reaktion verläuft optimal bei pH 7—8; Zugabe von Glucose, Phosphat und Magnesiumsalzen ist nicht notwendig. Zur Erzielung erheblicher Ausbeuten erweist sich der Zusatz von dem Kohlehydrat-Stoffwechsel angehörenden oder ihm nahestehenden Verbindungen als notwendig.

Von Bedeutung sind insbesondere die Säuren des *Krebs*'schen Citronensäure-Cyclus, deren Wirkung durch weitere Zugabe von Nicotinsäureamid noch verbessert werden kann. Den gleichen Effekt, wie mit dieser Kombination, erzielt man auch durch Verwendung von Adenin, Adenosin, Adenylsäure und Nicotinsäure.

Ausser Homogenaten von Nebennieren sind auch solche von Lebern (Kalb, Kaninchen) oder Nieren (Kalb) wirksam. Herz- und Hirn-Homogenate erwiesen sich unter den geprüften Versuchsbedingungen als wirkungslos.

Unsere Versuche zur Einführung von Sauerstoff in 11-Stellung von Steroiden mit Hilfe tierischer Organe legen nahe, eine entscheidende Beteiligung der Codehydrasen, des *Green*'schen Cyclophorase-systems und phosphorylierender Adenin-Verbindungen zusammen mit organspezifischen Proteinen der Nebenniere, Niere und Leber bei dieser Oxydation anzunehmen.

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

---

## 214. Carotinoidsynthesen VIII. Synthese des Dodecapreno- $\beta$ -carotins

von P. Karrer und C. H. Eugster.

(3. VII. 51.)

Die relative Beständigkeit des Decapreno- $\beta$ -carotins<sup>1)</sup> und des Decapreno- $\epsilon_1$ -carotins<sup>2)</sup> liess erwarten, dass sich noch höhere Homologe des  $\beta$ -Carotins aufbauen lassen würden. Solche Verbindungen könnten für Betrachtungen über die Beziehung zwischen Konstitution und Farbe bei Carotinoiden einige Bedeutung besitzen.

Die Synthese eines neuen, 19 konjugierte Doppelbindungen enthaltenden Carotinoidfarbstoffes ist uns, wenn auch in sehr kleiner Ausbeute, gelungen. Die dafür benützte Methode ist prinzipiell die gleiche, mit welcher wir schon mehrere andere Carotinoide künstlich aufgebaut haben ( $\beta$ -Carotin,  $\alpha$ -Carotin,  $\epsilon_1$ -Carotin, Lycopin, Decapreno- $\beta$ -carotin, Decapreno- $\epsilon_1$ -carotin). Der Weg wird durch das beiliegende Formelschema veranschaulicht.

Ausgehend von kristallisiertem Vitamin-A-acetat, kondensierten wir den durch Verseifen gewonnenen Vitamin-A-Alkohol (I) mit Aceton und Aluminium-*t*-butylat nach *Oppenauer* zum C<sub>23</sub>-Keton (II).

---

<sup>1)</sup> P. Karrer & C. H. Eugster, *Helv.* **34**, 28 (1951).

<sup>2)</sup> P. Karrer, C. H. Eugster & M. Faust, *Helv.* **34**, 823 (1951).