

2. Die chemischen und thermodynamischen Eigenschaften der festen Korrosionsprodukte und deren Rückwirkung auf das Potential des Metalls.

3. Die lokale Verschiebung der Konzentration der  $\text{OH}'$ -,  $\text{Cl}'$ - und  $\text{Cd}^{++}$ -Ionen an der Metalloberfläche infolge lokal verschiedener elektrochemischer und chemischer Reaktionen, infolge von Konvektion, Diffusion und elektrischer Überführung.

4. Die Schutzwirkung durch Deckschichten, die bei verschiedenen Verbindungen und deren verschiedener Ausbildung Unterschiede aufweisen kann.

Ganz allgemein gilt, dass die Erscheinungen der metallischen Korrosion das Ergebnis des Zusammenspiels der elektrochemischen Eigenschaften des Metalls, der chemischen und thermodynamischen Eigenschaften der Korrosionsprodukte und der Konzentrationsverschiebungen der Ionen in der Lösung, insbesondere an der Oberfläche des Metalles, sind.

Universität Bern, Institut für anorganische, analytische  
und physikalische Chemie.

---

## 281. Über Steroide.

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

### Farbreaktionen mit Steroiden, insbesondere Corticosteroiden, im Papierchromatogramm

von R. Neher und A. Wettstein.

(12. X. 51.)

Zur papierchromatographischen Untersuchung von Nebennierenrinden-Hormonen hat sich die Methode von Zaffaroni et al.<sup>2)</sup> mit Hilfe der Systeme Propylenglykol-Toluol oder Formamid-Benzol bestens bewährt. Hierbei benützt man zum Nachweis der reduzierenden Corticosteroide auf den Papierchromatogrammen normalerweise alkalische Lösungen von Silberdiammin<sup>2)</sup> oder von Triphenyl-tetrazoliumchlorid<sup>3)4)5)</sup>. Diese Indikatoren besitzen jedoch den Nachteil relativ geringer Empfindlichkeit einerseits und einer gewissen Unspezifität andererseits. Es werden mit ihnen nämlich nicht nur Steroide, sondern auch andere reduzierende Substanzen erfasst; abgesehen davon versagen sie natürlich bei den nichtreduzierenden Steroiden. Eine

<sup>1)</sup> 106. Mitt., Helv. **34**, 2053 (1951).

<sup>2)</sup> A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, Science **111**, 6 (1950).

<sup>3)</sup> R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann, J. Biol. Chem. **188**, 763 (1951).

<sup>4)</sup> G. T. Bassil & R. J. Boscott, Biochem. J. **48**, XLVIII (1951).

<sup>5)</sup> H. Hofmann & H. J. Staudinger, Naturwiss. **38**, 213 (1951).

mehr oder weniger spezifische blaue Farbreaktion<sup>1)2)3)</sup> ist lediglich für Cortison (17-Oxy-11-dehydro-corticosteron) bekannt, diejenige mit Jod-Kaliumjodid.

Insbesondere bei der papierchromatographischen Analyse von Corticosteroiden aus Organ- oder Harnextrakten hat es sich gezeigt, dass für eine einigermaßen sichere Identifizierung die zwei üblichen Kriterien, nämlich Stellung im Chromatogramm und Reduktionsvermögen, unzureichend sind und zu Fehlschlüssen führen können. Beispielsweise wiesen wir öfters in Harnextrakten von Patienten eine Substanz nach, die diesen Merkmalen zufolge 17-Oxy-corticosteron (*Reichstein's* Substanz M bzw. *Kendall's* Substanz F) sein sollte, sich aber nachträglich mit Sicherheit davon unterscheiden liess.

Im Zusammenhang mit den Arbeiten von *F. W. Kahnt & A. Wettstein*<sup>4)</sup> über die 11-Oxydation von Cortexon (11-Desoxy-corticosteron) und 17-Oxy-cortexon (17-Oxy-11-desoxy-corticosteron; *Reichstein's* Substanz S) mit Hilfe tierischer Organhomogenate war es unbedingt erforderlich, eine zuverlässigere und wegen der Notwendigkeit, Tausende von Papierchromatogrammen auszuführen, trotzdem schnelle Identifizierungsmethode auszuarbeiten.

Auf Grund von Vorversuchen mit verschiedenen Steroiden haben wir nun gefunden, dass man bei der Behandlung von Corticosteroiden auf Papier mit verdünnter Phosphorsäure und nachfolgendem Erhitzen verschiedenfarbige, charakteristische UV.-Fluoreszenz-Farben erhält.

Am besten wird so vorgegangen, dass man die getrockneten Chromatogramme rasch durch 15-proz. Phosphorsäure zieht, 20 Min. auf 90° erhitzt und dann unter der UV.-Lampe betrachtet. Analog kann man die Papiere auch mit 20-proz. Phosphorsäure besprühen, jedoch ziehen wir die erste Variante vor. Ohne Erhitzen fehlt die Fluoreszenz im UV.-Licht, nach kürzerem und längerem Erhitzen ist sie schwächer oder sogar ganz verschwunden. Die Fluoreszenz hält mehrere Std. an und beginnt dann allmählich zu verblassen. Da die Papiere aber an der Luft bald Feuchtigkeit aufnehmen und brüchig werden, betrachtet man sie im UV. vorteilhaft gleich nach der oben beschriebenen Behandlung. Mit Metaphosphorsäure, Unterphosphorsäure oder unterphosphoriger Säure erhält man weder im weissen noch im UV.-Licht sichtbare Farbreaktionen, hingegen ist mit phosphoriger Säure die Reaktion ähnlich wie mit Phosphorsäure, nur schwächer.

In Tabelle 1 sind die Fluoreszenzfarben von verschiedenen Nebennierenrinden-Hormonen bei der Phosphorsäure-Reaktion und ihre Empfindlichkeitsgrenzen im entwickelten Chromatogramm<sup>5)</sup> im Vergleich zur Reaktion mit alkalischer Silberdiammin-Lösung angegeben. Wie daraus ersichtlich, zeichnet sich die Phosphorsäure-Reaktion durch auffällige Unterschiede in diesen Farben und, abgesehen vom 11-Dehydro-corticosteron, durch eine bis 10fach erhöhte Empfind-

<sup>1)</sup> *A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Keutmann, Science* **111**, 6 (1950).

<sup>2)</sup> *R. B. Burton, A. Zaffaroni & F. H. Keutmann, J. Biol. Chem.* **188**, 763 (1951).

<sup>3)</sup> *G. T. Bassil & R. J. Boscott, J.* **48**, XLVIII (1951).

<sup>4)</sup> *Helv.* **34**, 1790 (1951).

<sup>5)</sup> Entwicklung der mit Propylenglykol imprägnierten Papiere während 2—12 Std. mittels Toluol.

lichkeit aus. Dabei weisen die geprüften 11-Oxy-steroiden eine gelbgrünliche, die 11-Keto-steroiden eine bläuliche und die 11-Desoxy-steroiden eine eher rötliche Fluoreszenz auf. Als einzige Verbindung gibt Substanz S eine bereits im weissen Licht sichtbare Farbe (blauviolett). Diese Unterschiede sind besonders dann wertvoll, wenn der Trenneffekt der Chromatographie infolge lösungsvermittelnder Verunreinigungen aus den Extrakten gering ist. Die 21-Acetate der genannten Corticosteroiden geben die gleichen Farbreaktionen, wenn auch meist schwächer, insbesondere im Falle des Acetates von 11-Dehydro-corticosteron.

Ausser den eigentlichen Nebennierenrinden-Hormonen sprechen auch andere, in den üblichen biologischen Testen inaktive Corticosteroiden<sup>1)</sup> gleichartig aber mehr oder weniger stark auf Phosphorsäure an, wie aus Tabelle 2 ersichtlich. Von den dort aufgeführten Verbindungen reduziert mit 25  $\gamma$  auf Papier lediglich Reichstein's Substanz D alkalische Silberdiammin- oder Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung. Ähnliche, aber viel schwächere UV.-Fluoreszenzen zeigen übrigens Steroiden aus der Nebennierenrinde statt auf Papier auch in vitro, wobei z. B. mit 85-proz. Phosphorsäure 1 Std. auf 90° erhitzt werden kann<sup>2)</sup>.

Die Fluoreszenz-Reaktion mit Phosphorsäure auf Papier beschränkt sich jedoch nicht auf Corticosteroiden, sondern ist auch bei vielen anderen Steroiden brauchbar, wie Tabelle 3 zeigt. Dagegen ergibt Phosphorsäure unter den gewählten Bedingungen keine reine Fluoreszenz-Reaktion mit Zuckern, Ascorbinsäure, Glucosamin, Aminosäuren, Adrenalin usw., so dass bei der Papier-Chromatographie von Steroid-Extrakten derartige Verunreinigungen gar nicht erfasst oder aber leicht als solche erkannt werden können. Von 23 geprüften Aminosäuren zeigte lediglich DL-Tryptophan eine violette Farbreaktion<sup>3)</sup> mit schwach blauvioletter UV.-Fluoreszenz, von 7 Zuckern nur Rhamnose einen gelben Farbfleck mit gelber UV.-Fluoreszenz. Ascorbinsäure ergab nur einen schwachen grauen Fleck im UV.

Im Hinblick auf eine ganze Reihe bekannter Farbreaktionen von Steroiden mit Säuren haben wir im weiteren deren Anwendungsmöglichkeit in der Papierchromatographie und besonders im beschriebenen UV.-Fluoreszenz-Test geprüft. In der Tat ergeben die Corticosteroiden mit stark verdünnter Schwefelsäure auf Papier qualitativ ähnliche Effekte wie mit 15-proz. Phosphorsäure, wobei aber die Empfindlichkeit letzterer Reaktion bei weitem nicht erreicht wird.

<sup>1)</sup> Für die Überlassung von Proben einer ganzen Anzahl von Corticosteroiden sind wir Herrn Prof. Dr. T. Reichstein sehr zu Dank verpflichtet.

<sup>2)</sup> Über Phosphorsäure-Fluoreszenz-Reaktionen mit phenolischen Steroiden in vitro vgl. M. Finkelstein, S. Hestrin & W. Koch, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **64**, 64 (1947); mit Herzglukosiden P. Bellet, Ann. pharm. franç. **8**, 471 (1950).

<sup>3)</sup> Über eine entsprechende in vitro-Farbreaktion vgl. auch S. Hestrin & J. Mager, Nature **158**, 95 (1946).

**Tabelle 1.**

Nebennierenrinden-Hormon <sup>1)</sup>		15-proz. Phosphorsäure			alkal. Silberdiammin		Antimontrichlorid
	Bezeichnung nach Reichstein		Farbe im UV.	Empfindlichkeit $\gamma$	Farbe im weissen Licht	Empfindlichkeit $\gamma$	Farbe im UV. mit je 20 $\gamma$
		Kendall					
17-Oxy-corticosteron . . . . .	M	F	gelb-grünlich	0,5	braun	2—5	grün
Cortison (17-Oxy-11-dehydro-corticosteron) . . . . .	Fa	E	blau	0,5—2	braun	5	schwach graublau
17-Oxy-cortexon (17-Oxy-11-desoxy-corticosteron) . . . . .	S	—	orange, in höheren Konz. rötlich (blauviolett <sup>2)</sup> )	0,5	braun	5—10	orange
Corticosteron . . . . .	—	—	grün	2—5	braun	5—10	schwach graublau
11-Dehydro-corticosteron . . . . .	—	A	blau	25	braun	10	schwach graublau
Cortexon . . . . .	Q	—	violett-rötlich	5	braun	10	orange
(11-Desoxy-corticosteron)							

<sup>1)</sup> In der Reihenfolge zunehmender Wanderungsgeschwindigkeit im absteigenden Chromatogramm.

<sup>2)</sup> Farbe im weissen Licht.

**Tabelle 2.**

Corticosteroid, je 25 $\gamma$ <sup>1)</sup>		Bezeichnung nach Reichstein	Phosphorsäure Farbe im UV.	Antimon-trichlorid Farbe im UV.
$\Delta^4$ -Pregnen-3-on-11 $\beta$ ,17,20,21-tetrol-20,21-diacetat . . . . .	E	gelb	schwach blauviolett	rot (rotviolett <sup>2)</sup> )
$\Delta^4$ -Pregnen-3,11-dion-17,20,21-triol-20,21-diacetat . . . . .	U	schwach blau	blau	—
Allopregnan-11,20-dion-3 $\beta$ ,17,21-triol-3,21-diacetat . . . . .	D	schwach rötlich	schwach rötlich	gelb (gelb <sup>2)</sup> )
Allopregnan-20-on-3 $\beta$ ,17,21-triol-3,21-diacetat . . . . .	P	schwach violett	schwach violett	—
Allopregnan-3 $\beta$ ,17,20,21-tetrol-3,20,21-triacetat . . . . .	K			

<sup>1)</sup> In der Reihenfolge zunehmender Wanderungsgeschwindigkeit im absteigenden Chromatogramm.

<sup>2)</sup> Farbe im weissen Licht.

Tabelle 3.

Steroide, je 100 $\gamma^1$ )	Phosphorsäure Farbe im UV.	Antimon-trichlorid		Anisaldehyd-Schwefelsäure	
		Farbe im weissen Licht	Farbe im UV.	Farbe im weissen Licht	Farbe im UV.
3 $\beta$ -Dehydro-androsteron-acetat . . . . .	violett	rot	rotbraun	—	schwach blau
Androsteron-acetat . . . . .	blau	—	gelb-orange	—	—
$\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion . . . . .	orange	—	violett	braun	dunkelbraun
$\Delta^{3,5}$ -Androstadien-7,17-dion . . . . .	gelb-grün (braun <sup>2</sup> )	grünbraun	gelb	grün	grünbraun
Androstan-3,17-dion . . . . .	violett	—	violett	gelb	blau
Testosteron . . . . .	gelb	—	schwach rot	braun	braun
Testosteron-propionat . . . . .	grün	—	rötlich	hellbraun	braun
Testosteron-benzoat . . . . .	grün	—	violett	hellbraun	hellbraun
17 $\alpha$ -Testosteron . . . . .	rot (violett <sup>2</sup> )	blau	rot	blau	rot
$\Delta^5$ -Pregnen-3 $\beta$ -ol-20-on . . . . .	violett	rot	rot	grün	blau
$\Delta^4,17$ -3-Keto-21-oxy-pregnadien . . . . .	rotorange	braun	rot	grün	gelb
Progesteron . . . . .	grün	—	schwach viol.	braun	braun
Anhydro-oxy-progesteron . . . . .	orange	grau	orange	hellblau	blau
$\Delta^5$ -Norcholesten-3 $\beta$ -ol-25-on-acetat . . . . .	grün	violett	violett-braun	hellbraun	blau
17 $\beta$ -Östradiol . . . . .	grün	gelb	grün	hellgrün	hellblau
17 $\alpha$ -Östradiol . . . . .	gelb (rot <sup>2</sup> )	orange	grün	hellgelb	blau
DL-trans-Bisdehydro-doisyolsäure . . . . .	blau	—	grau	orange	violett
DL-trans-Bisdehydro-doisyolsäure-methylester-methyläther . . . . .	blau	rötlich	grau	gelb	hellblau
DL-cis-Bisdehydro-doisyolsäure-methylester-methyläther . . . . .	blau	rötlich	grau	hellgelb	blau
Cholesterylacetat . . . . .	schwach violett	rotviolett	rotviolett	—	hellblau
Cholesterylacetat-dibromid . . . . .	grün	rot	orange	—	—
Ergosterin . . . . .	grün (grün <sup>2</sup> )	dunkelgrau	dunkelgrau	grau	dunkelviolett
Cholsäure . . . . .	violett (rot <sup>2</sup> )	gelb	blau	blau	blau
Desoxy-cholsäure . . . . .	rotviolett (rot <sup>2</sup> )	rötlich	violett	hellblau	rosa
$\Delta^5$ -3-Acetoxy-norcholensäure-methylester . . . . .	grün	rot	rot	—	hellblau

<sup>1</sup>) Durch Änderung der Konzentration oder Überführung der freien Verbindungen in ihre Ester tritt bei einigen Steroiden Farbverschiebung ein.

<sup>2</sup>) Schwache Farbe im weissen Licht.

In Anlehnung an die in vitro-Reaktion von *Liebermann-Burchard* haben wir die Chromatogramme in eine Lösung von 1 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure und 20 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid in 50 cm<sup>3</sup> Chloroform getaucht und anschliessend 6 Min. auf 90° erhitzt. Bei allen geprüften Corticosteroiden werden danach bereits im weissen Licht schwach rötlich-violette Färbungen sichtbar; die UV.-Fluoreszenzen sind praktisch gleich wie mit verd. Phosphorsäure. Die Anwendung von wässriger oder konz. Schwefelsäure hat sich nicht bewährt, da die Festigkeit des Papiers dadurch zu sehr leidet<sup>1)</sup>. Mit n.-Salzsäure erhielt man bestenfalls nur äusserst schwache UV.-Fluoreszenzen von gleicher Farbe wie mit verd. Phosphorsäure, mit 25-proz. Trichloressigsäure in Chloroform<sup>2)</sup> keinen Effekt.

Mit Phenylhydrazin und verdünnter wässriger Schwefelsäure erzielten *C. C. Porter & R. H. Silber*<sup>3)</sup> eine hellgelbe Farbreaktion, die für 17,21-Dioxy-20-ketopregnane, wie z. B. Cortison, spezifisch sein soll. Auf Papierchromatogramme übertragen, hat sie sich aus dem oben genannten Grunde nicht bewährt. Ausser der im weissen Licht sichtbaren Gelbfärbung erhält man hierbei im Prinzip dieselben UV.-Fluoreszenzen wie mit Schwefelsäure in organischen Lösungsmitteln. Nach unserer Beobachtung ist die gelbe Farbreaktion aber nicht charakteristisch für 17,21-Dioxy-20-ketopregnane, da sie mit Corticosteron und 11-Dehydro-corticosteron nahezu ebenso intensiv auftritt wie mit 17-Oxy-corticosteron.

Von *L. Laszt & B. Neyman*<sup>4)</sup> ist eine empfindliche Bestimmungsmethode für gewisse Nebennierenrinden-Steroide in vitro auf Grund der Fluoreszenz mit Dimethylsulfat angegeben worden. Eine Übertragung dieser Reaktion auf Papierchromatogramme war zwar möglich, indem wir die letzteren in reines Dimethylsulfat tauchten und anschliessend 5 Min. auf 100° erhitzen. Auch hierbei traten im UV. ähnliche Farben wie bei der Phosphorsäure-Reaktion auf, die Empfindlichkeit war aber bedeutend geringer und die Anwendung von Dimethylsulfat nachteilig.

Ebenfalls wenig empfindlich ist die Reaktion von Nebennierenrinden-Hormonen auf Papier mit m-Dinitrobenzol und Alkali<sup>5)</sup>.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Corticosteroiden auf Papier fanden wir bei der Einwirkung einer Antimontrichlorid-Lösung, wie sie beispielsweise für die *Carr-Price-Reaktion*<sup>6)</sup> Verwendung findet.

Die getrockneten Chromatogramme wurden rasch durch eine klare gesättigte Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform gezogen oder damit besprüht und hierauf 4 Min. im Trockenschrank mit schwachem Abzug auf 90° erhitzt. Die danach im UV. auftretenden Fluoreszenzen sind in Tabelle 1 und 2 angegeben.

Obschon diese Farbreaktion für Corticosteroide bei weitem nicht so empfindlich ist wie diejenige mit Phosphorsäure, so erwies sie sich als besonders geeignet für gewisse andere, z. B. 5,6-ungesättigte Ste-

<sup>1)</sup> *H. Reich, D. H. Nelson & A. Zaffaroni*, J. Biol. Chem. **187**, 414 (1950), helfen sich so, dass sie die konz. Schwefelsäure und das Papier auf eine Glasplatte bringen und dabei z. B. die im weissen Licht sichtbare grüne Farbe der 11-Oxy-steroide beobachten können. Wir bedienten uns der Reaktion mit konz. Schwefelsäure nur insofern mit Vorteil, als es beim Auflegen der mit verd. Phosphorsäure behandelten Papiere auf eine mit konz. Schwefelsäure benetzte Glasplatte gelang, die schwache, blaue UV.-Fluoreszenz von 11-Dehydro-corticosteron wesentlich zu verstärken. Die intensiveren Fluoreszenzen der anderen Nebennierenrinden-Hormone erfuhren dadurch keine Steigerung.

<sup>2)</sup> Vgl. *A. B. Svendsen & K. B. Jensen*, Pharm. acta Helv. **25**, 241 (1950).

<sup>3)</sup> J. Biol. Chem. **185**, 201 (1950).

<sup>4)</sup> Helv. physiol. et pharmacol. Acta **9**, C 8 (1951); C. r. **224**, 681 (1947).

<sup>5)</sup> *O. Schindler & T. Reichstein*, Helv. **34**, 109, Fussnote <sup>7)</sup> (1951).

<sup>6)</sup> *V. E. Levine & E. Richman*, J. Biol. Chem. **101**, 373 (1933).

roide, wie 3 $\beta$ -Dehydro-androsteron und Pregnenolon (vgl. Tab. 3). In diesen Fällen treten schon im weissen Licht sichtbare, lebhaft gefärbte Flecken auf, die zum Teil im UV.-Licht charakteristisch fluoreszieren und sich innerhalb einiger Std. verfärben.

Schliesslich haben wir speziell für solche Verbindungen, die wie *Reichstein's* Substanz U<sup>1)</sup> nicht reduzierend wirken und sich auch mit Phosphorsäure oder Antimontrichlorid nicht oder nur schlecht im Papierchromatogramm nachweisen lassen, mit Erfolg die „modifizierte“ Farbreaktion nach *Kägi-Miescher*<sup>2)</sup> herangezogen.

Für ihre Anwendung in der Chromatographie wurde das Papier mit einer frisch bereiteten, farblosen Lösung von 0,5 cm<sup>3</sup> Anisaldehyd in 50 cm<sup>3</sup> Eisessig und 1 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure besprüht und danach 2 bis 5 Min. auf 90° erhitzt. *Reichstein's* Substanzen U und E, sowie die in Tabelle 1 aufgeführten Nebennierenrinden-Hormone ergeben so im sichtbaren Licht eine mehr oder weniger starke violettbraune Färbung mit rotbrauner Fluoreszenz im UV. Am empfindlichsten erwies sich diese Farbreaktion beim 11-Dehydro-corticosteron, welches mit Phosphorsäure die schwächste Fluoreszenz zeigte. Trotz mangelnder Differenzierung der Farben ist die *Kägi-Miescher*-Reaktion für die genannten speziellen Fälle sehr geeignet. Die letztere Feststellung trifft auch auf viele andere Steroide zu, mit denen überdies oft verschiedenartige Farbtöne erhalten werden (siehe Tab. 3).

Über weitere Farbreaktionen und über die Papierchromatographie von Sterinen und nur schwach polaren Steroiden unter Verwendung eines neuen Lösungsmittelgemisches zur Entwicklung, wobei sich im Gegensatz zum System Propylenglykol-Toluol sehr gute Trenneffekte erzielen lassen, soll in anderem Zusammenhang noch berichtet werden.

Zum Schluss seien noch einige allgemeine Bemerkungen über die papierchromatographische Analyse von Corticosteroiden gemacht.

Die Angaben von *Zaffaroni et al.*<sup>3)</sup> betreffend die relativen Wanderungsgeschwindigkeiten und die sie beeinflussenden Faktoren, wie Menge des Imprägnierungsmittels, Füllhöhe der Tröge usw. stimmen gut mit unseren Erfahrungen überein. Zum Imprägnieren der Papiere (Whatman Nr. 1) haben wir das Eintauchen in eine 20-proz. Lösung von Propylenglykol in Aceton als vorteilhaft befunden, ähnlich wie dies soeben auch *Baker* und Mitarb.<sup>4)</sup> beschrieben. Dadurch werden nun viel gleichmässiger und geringere Mengen des Imprägnierungsmittels auf das Papier gebracht, was zu verminderten Schwankungen in der Wanderungsgeschwindigkeit und insbesondere zu einer stark abgekürzten Entwicklungszeit von nur noch 2 bis 12 Std. führt.

Bei der Untersuchung von Organ- oder Harn-Extrakten haben wir stets zwei 35 cm lange Chromatogramme so lange absteigend mit Toluol entwickelt, bis das Lösungsmittel den unteren Rand erreicht hatte, was ungefähr 2 Std. benötigte, und zwei weitere Chromatogramme 8–12 Std. lang entwickelt. Dann wurde je ein 2- und ein 8–12stündiges Chromatogramm mit alkalischer Silberdiammin-Lösung bzw. mit verdünnter Phosphorsäure behandelt.

<sup>1)</sup> S. Tabelle 2.

<sup>2)</sup> *K. Miescher*, *Helv.* **29**, 743 (1946).

<sup>3)</sup> *R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann*, *J. Biol. Chem.* **188**, 763 (1951).

<sup>4)</sup> *P. B. Baker, F. Dobson & S. W. Stroud*, *Nature* **168**, 114 (1951).

Auf diese Art stehen uns 3 Kriterien über die Natur der enthaltenen Steroide zur Verfügung:

- a) Stellung im 2- bzw. 8—12stündigen Chromatogramm,
- b) Reduktionsvermögen,
- c) Farbreaktionen mit Phosphorsäure, eventuell Antimontrichlorid oder Anisaldehyd-Schwefelsäure.

Dadurch erreicht man eine bedeutend grössere Sicherheit der Identifizierung als durch die ersten beiden Kriterien allein und erfasst auch nichtreduzierende Corticosteroide. Als praktisches Beispiel erwähnten wir bereits das an der Stelle von 17-Oxy-corticosteron im Chromatogramm beobachtete Vorkommen einer Substanz, welche reduzierend wirkte. Da sie mit Phosphorsäure aber keine gelbe Fluoreszenz zeigte, liess sich die Anwesenheit von 17-Oxy-corticosteron eindeutig ausschliessen. Im fernereren wurden z. B. in der Lage von Cortison oder Corticosteron Verbindungen gefunden, die mit Phosphorsäure blau bzw. grün fluoreszierten, nicht aber reduzierend wirkten. Dadurch konnten wir auch hier die Abwesenheit der betreffenden Substanzen sicherstellen.

Infolge der im allgemeinen sehr hohen Empfindlichkeit der Phosphorsäure-Reaktion lassen sich die einzelnen Nebennierenrinden-Hormone meist mit einem Bruchteil der durch eine Person täglich im Urin ausgeschiedenen Menge nachweisen.

Herrn *E. von Arx* danken wir für die technische Mithilfe bei der Ausführung der Versuche bestens.

### Zusammenfassung.

Zum Nachweis von Steroiden, insbesondere Corticosteroiden auf Papierchromatogrammen, wird eine neue, sehr empfindliche Farbreaktion mit verdünnter Phosphorsäure beschrieben. Die sich ergebenden charakteristischen, verschiedenfarbigen UV.-Fluoreszenzen bedeuten, neben der Stellung der Steroide im Chromatogramm und ihrem Reduktionsvermögen, einen äusserst wertvollen Hinweis auf ihre Natur. In gewissen Fällen haben sich uns zu diesem Zweck auch die Reaktionen mit Antimon-trichlorid oder Anisaldehyd-Schwefelsäure gut bewährt, die meist im weissen und UV.-Licht sichtbare Farben ergeben.

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

---