

44. Mikrobiologische Hydroxylierungen von Cortexon in der 7 α -, 15 α - oder 15 β -Stellung¹⁾.

Mikrobiologische Reaktionen, 5. Mitteilung²⁾

von Ch. Meystre, E. Vischer und A. Wettstein.

(5. I. 55.)

Im Verlaufe unserer Untersuchung einer grösseren Anzahl von Mikroorganismen sind wir auf einige weitere interessante Schimmel-pilze³⁾ gestossen, die Steroide in neuen Stellen der Molekel zu hydroxylieren vermögen. So entstand durch Einwirkung von Curvularia-Arten, insbesondere Curvularia fallax *Boedijn*, *C. pallescens* *Boedijn*, *C. lunata* (*Wakker*) *Boedijn* und *C. falcata* (*Tehon.*) *Boedijn* (Dermatiaceae, Fungi imperfecti), sowie von Peziza-Arten (Pezizaceae, Ascomycetes) auf Cortexon (11-Desoxy-corticosteron) in mind. 50-proz. Ausbeute ein neues, nach seiner Analyse monohydroxyliertes Cortexon⁴⁾ vom Smp. 216—226° korrig.; $[\alpha]_D^{25} = +151^\circ$ (CHCl₃). Demgemäss reduzierte es noch alkalische Silberdiammin-Lösung und zeigte unverändert die für die α , β -ungesättigten Ketone typische UV.- und IR.-Absorption. Im Papierchromatogramm mit dem System Propylenglykol-Toluol⁵⁾ lief es etwas schneller als 11-epi-Corticosteron und zeigte mit Phosphorsäure⁶⁾ eine hellgrüne UV.-Fluoreszenz. In Substanz ergab es mit konz. Schwefelsäure eine hellgrüne Färbung.

Die Konstitution der neuen Verbindung konnte folgendermassen bewiesen werden: Mit Acetanhydrid und Pyridin in der Kälte entstand ein Diacetat, ein Monoacetat nur, wenn mit einem Unterschuss des Acetylierungsmittels behandelt wurde, so dass die neue Hydroxylgruppe nicht tertiar sein kann. Durch den negativen Ausfall der *Porter-Silber-Reaktion*⁷⁾ liessen sich weiter Stellung 16 und 17 für die Hydroxylgruppe ausschliessen. Stellung 2 kam wegen des negativen Verlaufes der Ferrichlorid-Reaktion nicht in Betracht⁸⁾. Wurde das

¹⁾ 127. Mitt., „Über Steroide“, wird vorgetragen am 27. II. 55 vor der Schweiz. Chem. Gesellschaft in Bern; 126. Mitt., siehe *J. A. Juetscher, jr., R. Neher & A. Wettstein, Experientia* **10**, 456 (1954).

²⁾ 4. Mitt., siehe *Helv.* **37**, 1548 (1954).

³⁾ Wir danken den Herren Prof. Dr. E. Gäumann und Dr. L. Ettlinger, Zürich, bestens für die Überlassung und Bestimmung dieser Stämme.

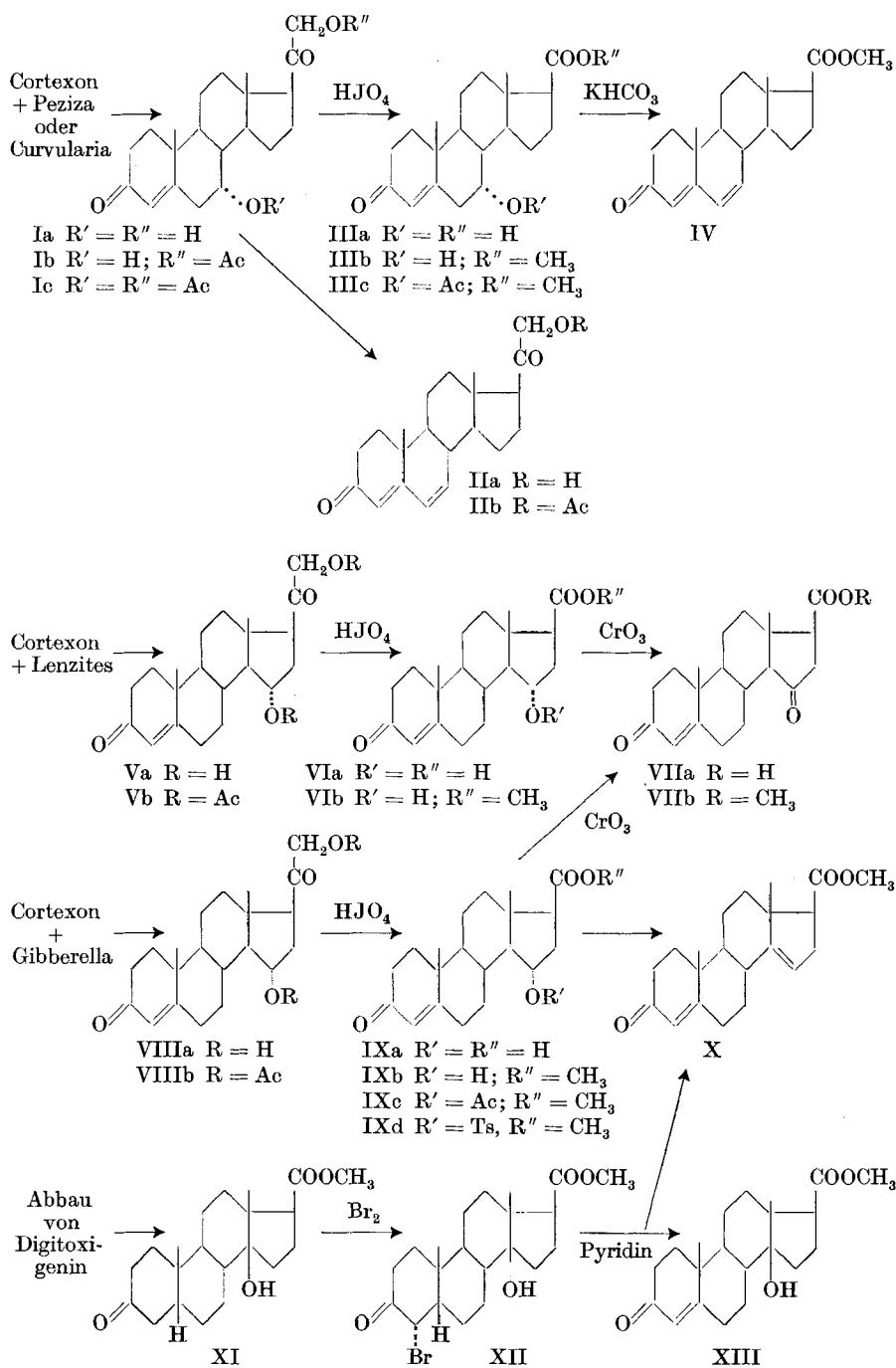
⁴⁾ Bisher sind unseres Wissens beschrieben die 6 α -, 6 β -, 11 α -, 11 β -, 12 α -, 16 α -, 17 α - und 19-Oxy-cortexone, das Diacetat von 2 α -Oxy-cortexon sowie das 21-Monoacetat von 14 β -Oxy-cortexon.

⁵⁾ R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann, *J. biol. Chemistry* **188**, 763 (1951).

⁶⁾ R. Neher & A. Wettstein, *Helv.* **34**, 2278 (1951).

⁷⁾ C. C. Porter & R. H. Silber, *J. biol. Chemistry* **185**, 201 (1950); **210**, 923 (1954).

⁸⁾ L. F. Fieser & M. A. Romero, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 4716 (1953).



Diacetat an Aluminiumoxyd chromatographiert, so spaltete sich Essigsäure ab und es entstand das bekannte 6-Dehydro-cortexon-acetat (IIb)¹), das nach Hydrolyse freies 6-Dehydro-cortexon (IIa) lieferte. Analog ergab das Oxycortexon nach Abbau der Seitenkette mit Perjodsäure, Überführung der entstandenen Ätiosäure in ihren Methylester, Acetylierung und Behandlung des Methylester-acetates mit Hydrogencarbonat den Δ^{4+6} -3-Ketoätiocholadiensäure-methylester (IV) mit der charakteristischen Absorption λ_{max} 283 m μ , $\log \epsilon_{\text{max}}$ 4,42. Die mikrobiologisch eingeführte neue Hydroxylgruppe muss sich demgemäß und in Anbetracht der Verschiedenheit der neuen Reihe von den 6 α - und 6 β -Oxy-Derivaten²) in 7-Stellung befunden haben. Ihre sterische Lage (7 α) ergab sich schliesslich aus ihrem molekularen Drehungsbeitrag im neuen Oxycortexon und der entsprechenden Ätiocholensäure im Vergleich mit den Werten bekannter 7 α - und 7 β -Oxy-sterioide³):

Dem neuen 7α -Oxy-cortexon und seinen Acetaten⁴⁾ kommen demnach Formeln Ia–Ic, der daraus erhaltenen Ätiosäure bzw. ihren Derivaten Formeln IIIa–IIIc zu. Bereits früher haben wir eine mikrobiologische Hydroxylierung in 7β -Stellung beschrieben⁵⁾.

Weitere neue Monooxy-cortexone erhielten wir in Ausbeuten zwischen 20 und 60 % einerseits bei der Einwirkung von Gibberella-Arten, z. B. von *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc. (Hypocreales, Ascomycetes), anderseits von Lenzites-Arten, z. B. *Lenzites abietina* Bull. (Polyporaceae, Basidiomycetes) auf Cortexon.

Im ersten Falle entstand eine Verbindung vom Smp. 216–222°, $[\alpha]_D^{23} = +196^\circ$ (Äthanol), im zweiten Falle eine solche vom Smp.

¹⁾ A. Wettstein, Helv. **23**, 388 (1940).

²⁾ *P. Th. Herzig & M. Ehrenstein*, J. org. Chemistry **16**, 1050 (1951); *S. H. Eppstein, P. D. Meister, D. H. Peterson, H. C. Murray, H. M. Leigh, D. A. Lytle, L. M. Reineke & A. Weintraub*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 408 (1953); *Ch. Meystre, E. Vischer & A. Wettstein*, Helv. **37**, 1548 (1954).

³⁾ Vgl. *Fieser & Fieser*, Natural Products Related to Phenanthrene, 3rd Edition, New York 1949, p. 214, 216. *R. J. W. Cremlyn & C. W. Shoppee*, J. chem. Soc. 1954, 3515. Drehwerte bestimmt in CHCl_3 .

4) Dass das Monoacetat tatsächlich das 21-Derivat Ib darstellt, ergibt sich aus der Tatsache, dass in seinem IR.-Spektrum von den beiden im Spektrum von Ia auftretenden Hydroxylbändern bei $2,76\text{ }\mu$ und $2,87\text{ }\mu$ nur noch die erstere vorkommt, die auch als einzige im Spektrum von IIIb gefunden wird.

⁵⁾ F. W. Kahnt, Ch. Meystre, R. Neher, E. Vischer & A. Wettstein, *Experientia* **8**, 422 (1952).

206–216°, $[\alpha]_D^{22} = +141,5^\circ$ (Chloroform). Beide Substanzen ergaben im Gemisch unter sich und mit Ia starke Smp.-Erniedrigungen. Im Papierchromatogramm mit Propylenglykol-Toluol wanderte die erstere zwischen Cortison und 11-epi-Corticosteron, die letztere etwas über 11-epi-Corticosteron hinaus. Auch die neuen Verbindungen ergaben bei der Phosphorsäure-Reaktion auf dem Papier eine schwache grünliche UV.-Fluoreszenz, in Substanz mit konz. Schwefelsäure eine hellgrüne bis grünelbe Färbung. Beide Substanzen zeigten ferner noch unverändertes Reduktionsvermögen gegen alkalische Silberdiammin-Lösung und die für α, β -ungesättigte Ketone typische UV.- und IR.-Absorption. In beiden Fällen wurde je ein Diacetat erhalten und damit das Vorliegen einer tertiären Hydroxylgruppe ausgeschlossen. Auch hier kamen infolge negativen Verlaufs der *Porter-Silber*-Reaktion und der Ferrichlorid-Reaktion die Stellungen 2, 16 und 17 für die neue Hydroxylgruppe nicht in Betracht.

Zum Konstitutionsbeweis wurden die beiden neuen Monoxy-cortexone mittels Perjodsäure zu den entsprechenden Ätiosäuren abgebaut, die je einen Methylester lieferten. Die beiden Methylester oxydierten wir mit Chromtrioxyd und erhielten in beiden Fällen denselben Diketo-ätiocholensäure-methylester (Smp., Misch-Smp. und IR.). Damit war bewiesen, dass in den beiden Monoxy-cortexonen, Ätiosäuren und ihren funktionellen Derivaten die neu eingeführten Hydroxyl- bzw. Acetoxygruppen sich nur durch ihre sterische Lage an ein und demselben Ring-Kohlenstoffatom unterscheiden.

Um welches Kohlenstoffatom es sich handelt, ergaben schon die IR.-Spektren der Diketo-ätiocholensäure bzw. ihres Methylesters. Das letztere wies neben den Banden für die $\Delta^{4,3}$ -Ketogruppierung eine sehr intensive Bande bei $5,75 \mu$ auf, die offensichtlich ausser von der Esterfunktion noch von einem 5-Ring-Keton herrührt. Das IR.-Spektrum der freien Säure zeigte die reine 5-Ring-Keton-Bande¹⁾ deutlich. Da die 16-Stellung, wie gesagt, nicht in Frage kommt, kann es sich nur um ein 15-Keton handeln. Zum gleichen Schlusse führten die folgenden Umsetzungen: Der aus Cortexon durch Einwirkung von Gibberella und anschliessenden Abbau erhaltene Oxy-3-keto-ätiocholensäure-methylester wurde ins Tosylat übergeführt, welches beim Erhitzen mit Collidin oder Erwärmen mit Natriumacetat in Eisessig eine Dehydro-Verbindung lieferte. Diese erwies sich nach Smp., Misch-Smp. und IR. als identisch mit dem $\Delta^{4,14,3}$ -Keto-ätiocholadien-säure-methylester (X)²⁾, den wir aus dem bekannten, vom Digitoxi-

¹⁾ R. N. Jones, P. Humphries & K. Dobriner, J. Amer. chem. Soc. **72**, 956 (1950).

²⁾ In Übereinstimmung mit dieser Formulierung steht die Tatsache, dass das 2,4-Dinitro-phenylhydrazon dieser Verbindung in CHCl_3 -Lösung im UV. drei Maxima bei 238, 258 und $395 \text{ m}\mu$ zeigte, hingegen kein Maximum bei $309 \text{ m}\mu$, wie es für $\Delta^{1,4}$ - und $\Delta^{4,6,3}$ -Ketone charakteristisch ist (C. Djerassi & E. Ryan, J. Amer. chem. Soc. **71**, 1000 (1949)).

genin zugänglichen 3-Keto-14 β -oxy-ätiocolansäure-methylester (XI) herstellten. XI ergab nämlich mit Brom in Eisessig das 4 α -Bromid XII, das mit Pyridin zum Teil in den bekannten Δ^4 -3-Keto-14 β -oxy-ätiocolansäure-methylester (XIII) und zum Teil in X überging. Der Diketo-ester besitzt also Formel VII b eines Δ^4 -3,15-Diketo-ätiocolansäure-methylesters¹⁾.

Die mikrobiologisch eingeführten Hydroxylgruppen müssen sich demnach in 15 β - bzw. 15 α -Stellung befinden²⁾. Den beiden neuen Monoxy-cortexonen und ihren Diacetaten kommen dann die Formeln VIII a und VIII b bzw. V a und V b zu, den Ätiosäuren und ihren funktionellen Derivaten Formeln IX a–IX d bzw. VI a–VI b.

Eine vorläufige sterische Zuordnung der beiden Verbindungsgruppen zur 15 α - bzw. 15 β -Reihe beruht auf folgender Überlegung: Während der 3-Keto-15-oxy-ätiocolansäure-methylester, der sich von der Gibberella-Kultur ableitet, wie beschrieben ein 15-Tosylat lieferte, das sehr leicht Toluolsulfonsäure abspaltete, trat mit dem epimeren 15-Oxy-ätiocolansäure-methylester von der Lenzites-Kultur diese Veresterung unter normalen Bedingungen nicht ein. Dies weist darauf hin, dass sich das Hydroxyl in der ersten Ätiocholensäure in trans-Stellung zum Wasserstoffatom in 14 α -Stellung, d. h. in 15 β -Stellung befindet. Das mit Gibberella erhaltene Oxydationsprodukt dürfte somit 15 β -Oxy-cortexon (VIII a) darstellen, das mit Lenzites erhaltene Oxydationsprodukt dann notwendigerweise 15 α -Oxy-cortexon (V a). Entsprechend sind ihre Acetate und die durch Seitenkettenabbau gewonnenen Ätiocholensäuren zu formulieren.

Ein wichtiges natürliches 15-Oxy-steroid stellt das Digitogenin dar (2,3,15-Trioxy-5 α ,22 α -spirostan³⁾). Unter der Voraussetzung, dass seine Hydroxylgruppen in 2- und 3-Stellung konfigurativ mit denjenigen im Gitogenin übereinstimmen (2 α ,3 β ⁴⁾) und unter Berücksichtigung der wahrscheinlich dem 15 α - bzw. 15 β -Oxycortexon zukommenden Drehwerte ergibt sich nach der Methode der molekularen Drehungsdifferenzen für Digitogenin eine 15 α -Hydroxylgruppe:

¹⁾ Der molekulare Drehungsbeitrag der 15-Ketogruppe in VII b beträgt +41 (in CHCl_3). D. H. R. Barton & G. F. Laws (J. chem. Soc. 1954, 57) berechnen für ihre 15-Oxo-14 α -sterioide +89 bis +106 (in CHCl_3).

²⁾ P. D. Meister, L. M. Reinecke, R. C. Meeks, H. C. Murray, S. H. Eppstein, H. M. Leigh Osborn, A. Weintraub & D. H. Peterson, J. Amer. chem. Soc. 76, 4050 (1954), erwähnen beiläufig eine mikrobiologische 15-Hydroxylierung ohne Angabe von Ausgangsmaterial, Mikroorganismus und Endstoff oder dessen Eigenschaften; ebenso J. Fried, zitiert durch D. H. R. Barton & G. F. Laws, J. chem. Soc. 1954, 56.

³⁾ R. E. Marker, D. L. Turner & P. R. Ulshafer, J. Amer. chem. Soc. 64, 1843 (1942); R. E. Marker, R. B. Wagner, P. R. Ulshafer, E. L. Wittbecker, D. P. J. Goldsmith & C. H. Ruof, ibid. 69, 2183 (1947); K. Dimroth & H. Jonsson, Ber. deutsch. chem. Ges. 74, 520 (1941); F. L. Warren & P. A. S. Canham, Chemistry & Ind. 1954, 727; C. Djerassi & Th. T. Grossnickle, ibid. 1954, 728.

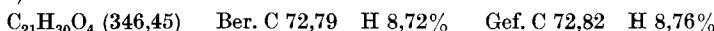
⁴⁾ J. Pataki, G. Rosenkranz & C. Djerassi, J. Amer. chem. Soc. 73, 5375 (1951).

	M_D	Drehungsbeitrag des 15-Hydroxyls
15 α -Oxy-cortexon	+ 490 (CHCl ₃)	- 123
15 β -Oxy-cortexon	+ 679 (C ₂ H ₅ OH)	+ 66
Cortexon	+ 613 (CHCl ₃)	
Digitogenin	- 363 (CHCl ₃)	- 91
Gitogenin	- 272 (CHCl ₃)	

Über die biologischen Eigenschaften der neuen Oxy-cortexone sowie über die analoge mikrobiologische Umwandlung anderer Steroide als Cortexon wird später berichtet.

Experimenteller Teil¹⁾.

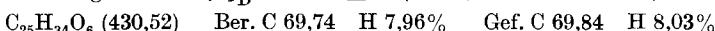
7 α -Oxy-cortexon (Ia): 4 1 70-proz. Bierwürze wurden in einem Schüttelgefäß sterilisiert (pH 5,3) und mit einer *Peziza* sp., ETH. M. 23, beimpft. Nach dreitägigem Schütteln bei 27° wurde zu der gut entwickelten Kultur unter sterilen Bedingungen 1 g Cortexon in 30 cm³ Aceton zugegeben, worauf man weitere 48 Std. bei der gleichen Temperatur schüttelte. Dann wurde das Mycel abgenutscht und mit Wasser und Essigester gewaschen. Das klare Filtrat vom pH 7,2 extrahierte man mit 3 l Essigester, wusch die Essigester-Lösungen mit Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Der Rückstand von 1,2 g wurde in 85-proz. Methanol gelöst, die methanolische Lösung dreimal mit Pentan ausgeschüttelt und im Vakuum eingedampft, wobei als Rückstand 1,03 g eines Kristallbreis zurückblieben. Die Pentanlösungen enthielten zur Hauptsache amorphe fettartige Produkte. Der gewonnene Kristallbrei, unter Zusatz von etwas Aktivkohle aus Aceton umkristallisiert, lieferte 380 mg 7 α -Oxy-cortexon (Ia) in Form von Nadeln vom Smp. 216—226°. Zur Analyse wurde 2 Std. im Hochvakuum bei 115° getrocknet. $[\alpha]_D^{25} = +158^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,855 in Chloroform). UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: λ_{max} 242 m μ ($\epsilon = 15\,600$).



Die Verbindung reduzierte alkalische Silberdiammin-Lösung rasch und stark und zeigte eine negative *Porter-Silber*-Reaktion. IR.-Absorptionsspektrum²⁾ (Methylenchlorid-Lösung): Banden u. a. bei 2,76 μ , 2,87 μ (Hydroxylgruppen), 5,85 μ (stark), 5,97 μ (stark), 6,16 μ (mittelstark) und bei 7,22 μ , 8,45 μ , 9,02 μ , 9,34 μ , 10,59 μ und 12,25 μ im „Fingerprintbereich“.

Die Mutterlaugen des 7 α -Oxy-cortexons chromatographierte man an 20 g Silicagel, wobei mit Chloroform-Aceton-Gemischen steigenden Acetongehalts eluiert wurde. Die ersten Fraktionen (Chloroform-Aceton 19:1 und 12:1) enthielten zur Hauptsache Cortexon neben Verunreinigungen, die weiteren Fraktionen (10:1) zusätzliche 250 mg 7 α -Oxy-cortexon, von dem also total 630 mg erhalten wurden.

7 α -Oxy-cortexon-diacetat (Ic): 40 mg 7 α -Oxy-cortexon versetzte man mit 0,5 cm³ Pyridin und 1 cm³ Acetanhydrid, liess die entsprechende Lösung 20 Std. bei 20° stehen und dampfte sie hierauf unter Wasserzusatz im Vakuum ein. Die durch Umkristallisieren aus Aceton-Isopropyläther-Gemischen erhaltenen Nadeln des 7 α -Oxy-cortexon-diacetats (Ic) schmolzen bei 189—192°. Zur Analyse wurde 1 Std. im Hochvakuum bei 120° getrocknet. $[\alpha]_D^{25} = +83^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,278 in Chloroform).



IR.-Absorptionsspektrum (in Methylenchlorid): charakteristische Banden u. a. bei 5,77 μ (stark), 5,96 μ (stark), 6,16 μ (mittelstark) und bei 7,29 μ , 8,36 μ , 9,05 μ , 9,35 μ und 10,62 μ im „Fingerprintbereich“.

¹⁾ Die Smp. sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und somit korrigiert.

²⁾ Alle IR.-Spektren wurden mit einem *Perkin-Elmer*-double-beam-Instrument, Modell 21, aufgenommen.

7 α -Oxy-cortexon-21-monoacetat (Ib): 600 mg 7 α -Oxy-cortexon wurden 1 Std. im Hochvakuum bei 110° getrocknet, in 2 cm³ trockenem Pyridin gelöst und mit 170 cm³ Acetanhydrid versetzt. Die Lösung liess man 20 Std. bei 20° stehen und dampfte sie hierauf unter Zusatz von Wasser im Vakuum ein. Der Rückstand (660 mg) wurde in Äther-Chloroform-Gemisch (4 : 1) gelöst, die Lösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Zur Reinigung chromatographierte man das Acetylierungsprodukt an 30 g alkalifreiem Aluminiumoxyd nach der Durchlaufmethode, unter Eluieren mit Benzol, Äther, Äther-Essigester-Gemischen und Essigester. Die einzelnen Eluate (100 cm³) wurden papierchromatographisch untersucht. Aus den ersten Äther-Eluaten erhielt man 95 mg des beschriebenen 7 α -Oxy-cortexon-diacetates (Ic). Das 7 α -Oxy-cortexon-21-monoacetat (Ib) fand sich in den Äther- und Äther-Essigester-Eluaten (480 mg). Aus Aceton-Petroläther-Gemischen rhombische Platten vom Smp. 217—219°; Misch-Smp. mit Ausgangsmaterial stark erniedrigt. Zur Analyse wurde 2 Std. im Hochvakuum bei 100° getrocknet. $[\alpha]_D^{22} = +162^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,784 in Äthanol), UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\text{max}} 242 \text{ m}\mu$ (ε = 15850).

$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (388,48) Ber. C 71,10 H 8,30% Gef. C 70,67 H 8,42%

IR.-Spektrum (in Methylchlorid): Banden u. a. bei 2,75 μ (Hydroxylgruppe), 5,70 μ (mittelstark), 5,78 μ (mittelstark), 5,97 μ (stark) und 6,16 μ (mittelstark) und bei 7,29 μ , 8,14 μ , 9,02 μ , 9,35 μ und 10,58 μ im „Fingerprintbereich“.

6-Dehydro-cortexon (IIa): 200 mg 7 α -Oxy-cortexon-diacetat (Ic) chromatographierte man an 6 g alkalifreiem Aluminiumoxyd. Der Rückstand der Benzol-Eluate wurde aus Isopropyläther umkristallisiert. Man erhielt Nadeln vom Smp. 111—114°; Misch-Smp. mit 6-Dehydro-cortexon-acetat (IIb)¹) ohne Erniedrigung. Zur Analyse wurde 4 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{23} = +159,5^\circ \pm 4^\circ$ (c = 1,220 in Äthanol).

$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_4$ (370,47) Ber. C 74,55 H 8,17% Gef. C 74,32 H 8,20%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\text{max}} 284 \text{ m}\mu$ (ε 27300).

IR.-Absorptionsspektrum (in Methylchlorid): Banden u. a. bei 5,71 μ , 5,78 μ , 6,00 μ und 6,16 μ (stark) sowie im „Fingerprintbereich“ bei 7,28 μ , 9,36 μ , 11,40 μ (stark). Dieses Spektrum zeigte vollständige Identität mit dem Spektrum des authentischen Materials.

Zur Hydrolyse liess man 200 mg des reinen IIb mit 200 mg Kaliumhydrogen-carbonat in wässrig-methanolischer Lösung 15 Std. bei 20° stehen. Die im Vakuum eingegangte Lösung wurde mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Lösungen wusch man mit Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Die durch Umlenkung des Rückstandes aus Aceton-Äther-Gemischen erhaltenen kurzen Prismen von 6-Dehydro-cortexon (IIa) schmolzen bei 134—135°. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 95° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{23} = +139,5^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,884 in Äthanol).

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_3$ (328,33) Ber. C 76,79 H 8,59% Gef. C 76,61 H 8,58%

IR.-Spektrum (in Methylchlorid): Banden u. a. bei 2,86 μ (Hydroxylgruppe), 5,84 μ , 6,00 μ und 6,16 μ (stark) sowie im „Fingerprintbereich“ bei 9,34 μ , 11,40 μ (mittelstark).

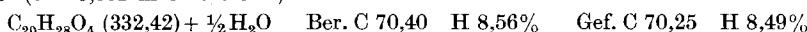
Δ^4 -3-Keto-7 α -oxy-äthiocholensäure (IIIa): Eine Lösung von 740 mg 7 α -Oxy-cortexon (Ia) in 20 cm³ Dioxan liess man 15 Std. mit einer Lösung von 1,8 g Perjodsäure in 20 cm³ Wasser bei 20° stehen. Die Lösung wurde dann im Vakuum bei 30° eingegengt und der Rückstand mit Essigester ausgeschüttet. Die Essigester-Lösungen wusch man mit Wasser, extrahierte sie mit verd. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung, wusch sie mit Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Der neutrale Rückstand betrug 170 mg.

Aus den mit Salzsäure angesäuerten Kaliumhydrogencarbonat-Auszügen wurde eine kristalline Säure erhalten. Diese extrahierte man mit Essigester, wusch die Essigester-Lösungen mit Wasser, trocknete sie und dampfte sie im Vakuum ein. Der Rückstand

¹⁾ A. Wettstein, Helv. 23, 388 (1940): Smp. 115—116°; $[\alpha]_D^{18} = +151,5^\circ$ in Äthanol.

(540 mg), aus Aceton umkristallisiert, gab mikrokristalline Kugelchen der Δ^4 -3-Keto-7 α -oxy-äthiocholensäure (IIIa), die bei 242–244° u. Z. schmolzen, dann langsam wieder vollständig zu Nadeln kristallisierten und definitiv bei 268–274° schmolzen.

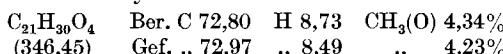
Die freie Säure konnte nicht ohne Zersetzung wasserfrei erhalten werden. Eine bei 120° im Hochvakuum getrocknete Probe gab folgende Analysenwerte. $[\alpha]_D^{22} = +126,5^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,391 in Chloroform).



UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\text{max}} 243 \text{ m}\mu$ (ε = 15100).

IR.-Spektrum der Suspension in Nujol: Banden u. a. bei 2,96 μ (Hydroxylgruppe), 5,88 μ , 6,05 μ (stark) und bei 7,85 μ , 8,12 μ , 8,97 μ , 9,37 μ , 9,56 μ , 9,92 μ , 10,57 μ , 11,75 μ und 12,20 μ im „Fingerprintbereich“.

Methylester IIIb: 200 mg Δ^4 -3-Keto-7 α -oxy-äthiocholensäure (IIIa) wurden in Essigester gelöst und mit ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt. Nach 15 Min. wusch man die Lösung mit verdünnter Salzsäure, Wasser, verd. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete sie und dampfte sie im Vakuum ein. Der aus Aceton umkristallisierte Rückstand gab feine Nadeln des Δ^4 -3-Keto-7 α -oxy-äthiocholensäure-methylesters (IIIb) vom Smp. 228–232°. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.



UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\text{max}} 243 \text{ m}\mu$ (ε = 15550).

IR.-Spektrum (in Methylenchlorid): Banden u. a. bei 2,76 μ (Hydroxylgruppe); 5,78 μ (stark), 5,98 μ (stark), 6,17 μ (mittelstark) sowie bei 7,42 μ , 8,42 μ , 9,02 μ , 9,54 μ , 9,72 μ , 10,60 μ , 11,61 μ , 12,25 μ im „Fingerprintbereich“.

Δ^4 : 6 -3-Keto-äthiocholadiensäure-methylester (IV): 1 g Δ^4 -3-Keto-7 α -oxy-äthiocholensäure-methylester (IIIb) liess man mit 10 cm³ Pyridin und 20 cm³ Acetanhydrid 20 Std. bei 20° stehen. Hierauf wurde auf Eis gegossen und mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wusch man mit verdünnter Salzsäure und Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Das so erhaltene rohe Acetat des Δ^4 -3-Keto-7 α -oxy-äthiocholensäure-methylesters (IIIc), das nicht gut kristallisierte, wurde direkt weiter umgesetzt.

Das rohe Acetat ergab beim Umkristallisieren aus Äther-Pentan-Gemisch eine kristalline Verbindung vom Smp. 145–149°, deren Analyse (nach zweistündigem Trocknen im Hochvakuum bei 100°) auf ein Enolacetat des Δ^4 -3-Keto-7 α -acetoxy-äthiocholensäure-methylesters hinwies. $[\alpha]_D^{25} = +51^\circ \pm 2^\circ$ (c = 0,977 in Chloroform).



UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\text{max}} 238 \text{ m}\mu$ (ε = 15900).

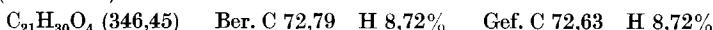
900 mg des erhaltenen rohen Acetats IIIc wurden in wässrigem Methanol 1½ Std. mit 2 g Kaliumhydrogencarbonat am Rückfluss gekocht. Hierauf engte man die Lösung im Vakuum ein, schüttelte den angesäuerten Rückstand mit Äther aus, wusch die ätherische Lösung mit Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Zur Reinigung chromatographierte man den Rückstand an 30 g Aluminiumoxyd. Die Benzol-Eluate gaben insgesamt 580 mg Rückstand. Diesen Rückstand löste man zweimal aus Aceton-Äther-Gemisch um, wobei der Δ^4 : 6 -3-Keto-äthiocholadiensäure-methylester (IV) vom Smp. 163–165° erhalten wurde. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{23} = +137,5^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,950 in Chloroform).



UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\text{max}} 283 \text{ m}\mu$ (ε = 26900).

15α -Oxy-cortexon (Va): Zu 4 l einer gut entwickelten Schüttelkultur von *Lenzites abietina* in 70-proz. Bierwürze mit Zusatz von 0,2% Antischaum-Mittel (Spermöl) gab man unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 1 g Cortexon in 25 cm³ Aceton und schüttelte 3 Tage weiter bei 27°. Hierauf wurde die Suspension aufgearbeitet und ergab 1,5 g Rohextrakt. Diesen chromatographierte man an 27 g Silicagel, wobei mit Chloroform-Aceton-Gemischen von steigendem Aceton-Gehalt eluiert wurde. Die Eluate 9:1

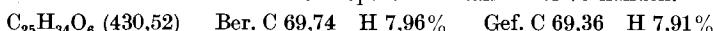
lieferten unverändertes Cortixon. Bei der weiteren Elution mit Chloroform-Aceton-Gemisch (7:1) wurden zuerst 50 mg 6β -Oxy-cortexon¹⁾ (Smp.; Mischprobe; IR.-Spektrum) erhalten. Dann gewann man mit dem gleichen Gemisch 400 mg eines Rückstandes, der mit Äther gewaschen und aus Aceton-Benzol kristallisiert wurde. Nach Umkristallisieren aus Aceton blieben 200 mg reines 15α -Oxy-cortexon (Va) vom Smp. 206–216°. Zur Analyse wurde 1 Std. im Hochvakuum bei 100° getrocknet. $[\alpha]_D^{22} = +141,5^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,780 in Chloroform). UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol λ_{max} 242 m μ ($\epsilon = 16700$).



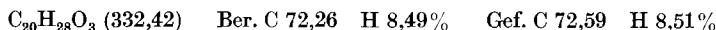
Das 15α -Oxy-cortexon reduziert alkalische Silberdiammin-Lösung und ergibt eine negative *Porter-Silber*-Reaktion.

Im IR.-Spektrum in Methylenchlorid-Lösung wurden Banden bei 2,76 μ , 2,87 μ (Hydroxylgruppen), 5,84 μ , 5,98 μ (stark), 6,17 μ (mittelstark) sowie u. a. bei 9,26 μ (mittelstark) im „Fingerprintbereich“ beobachtet.

Diacetat Vb: 20 mg 15α -Oxy-cortexon (Va) liess man mit 0,25 cm³ Pyridin und 0,5 cm³ Acetanhydrid 15 Std. bei 20° stehen, gab Eis zu und extrahierte mit Äther. Der ätherische Auszug wurde mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Den Rückstand kristallisierte man aus einem Äther-Pentan-Gemisch um, wobei 15 mg Prismen des 15α -Oxy-cortexon-diacetats (Vb) erhalten wurden. Diese schmolzen zuerst bei 167°, erstarrten wieder zum Teil und waren endlich bei 184° vollständig geschmolzen. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet. Trotzdem waren danach anscheinend noch Spuren Kristallwasser vorhanden.

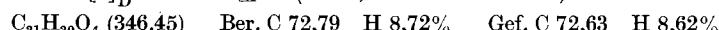


Δ^4 -3-Keto- 15α -oxy-äthiocholensäure (VIa): 200 mg 15α -Oxy-cortexon (Va), gelöst in 5 cm³ Dioxan, liess man 5 Std. mit einer Lösung von 600 mg Perjodsäure in 5 cm³ Wasser bei 20° stehen. Hierauf dampfte man das Dioxan im Vakuum ab, nutzte die ausgefallenen Kristalle ab, wusch sie mit Wasser, nahm sie in verdünnter Soda-Lösung auf und filtrierte die erhaltene Lösung. Hierauf wurde mit Salzsäure gefällt. Die kristalline Säure nutzte man ab, wusch sie mit Wasser und kristallisierte sie aus Dioxan um. Die Δ^4 -3-Keto- 15α -oxy-äthiocholensäure (VIa) schmolz bei 300–320° u. Z. und liess sich unzersetzt im Hochvakuum bei ca. 260° sublimieren, wobei der Smp. auf 310–320° u. Z. stieg.



IR.-Spektrum der Suspension in Nujol: Banden u. a. bei 2,82 μ (Hydroxylgruppe), 5,80 μ , 6,10 μ (stark) und 6,20 μ (mittelstark) sowie bei 7,50 μ , 7,78 μ , 8,12 μ , 8,27 μ , 8,86 μ , 8,97 μ , 10,96 μ und 13,75 μ im „Fingerprintbereich“.

Methylester VIb: 100 mg Δ^4 -3-Keto- 15α -oxy-äthiocholensäure (VIa) löste man in wenig Methanol, versetzte die Lösung mit überschüssiger ätherischer Diazomethan-Lösung, liess sie 15 Min. stehen und dampfte sie im Vakuum ein. Den Rückstand löste man in Äther, wusch die ätherische Lösung mit verdünnter Salzsäure, verd. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Der Rückstand (110 mg) kristallisierte aus Äther-Pentan-Gemisch. Der Δ^4 -3-Keto- 15α -oxy-äthiocholensäure-methylester (VIb) schmolz bei 176–182°. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 100° getrocknet. $[\alpha]_D^{23} = +115^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,6638 in Chloroform).



Δ^4 -3,15-Diketo-äthiocholensäure-methylester (VIIb) aus VIb: 16 mg Δ^4 -3-Keto- 15α -oxy-äthiocholensäure-methylester (VIb) löste man in 0,5 cm³ 90-proz. Essigsäure, versetzte die Lösung mit 5 mg Chromtrioxyd in 0,5 cm³ 90-proz. Essigsäure und liess sie 15 Std. bei 20° stehen. Hierauf wurde der Chromtrioxyd-Überschuss mit etwas Natriumhydrogensulfit zersetzt und die Lösung unter Wasserzusatz im Vakuum

¹⁾ Ch. Meystre, E. Vischer & A. Wettstein, Helv. **37**, 1548 (1954); weitere Literatur daselbst.

eingeengt. Die zurückbleibende wässrige Suspension schüttelte man mit Äther aus, wusch die ätherische Lösung mit Wasser, verd. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Der neutrale Rückstand von 11,9 mg kristallisierte aus Äther in Nadeln, welche zuerst bei 168° schmolzen; diese erstarrten wieder zu Rhomben, die bei 176° endgültig schmolzen. Misch-Smp. des so gewonnenen Δ^4 -3,15-Diketo-äthiocholensäure-methylesters (VIIb) mit dem gleich schmelzenden, unten beschriebenen Diketon aus Δ^4 -3-Keto-15 β -oxy-äthiocholensäure-methylester (IXb) ohne Erniedrigung. Auch die IR.-Spektren beider Diketone waren vollständig identisch; in Methylchlorid-Lösung u. a. Banden bei 5,75 μ , 5,97 μ (stark) und 6,16 μ (mittelstark) sowie bei 8,35 μ , 9,04 μ und 9,64 μ im „Fingerprintbereich“.

Δ^4 -3,15-Diketo-äthiocholensäure (VIIa): 120 mg Δ^4 -3,15-Diketo-äthiocholensäure-methylester (VIIb) wurden 1 Std. in wässrigem Methanol mit 200 mg Kaliumhydroxyd am Rückfluss gekocht. Hierauf dampfte man das Methanol unter Wasser-Zusatz im Vakuum ab und schüttelte die zurückbleibende alkalische Lösung mit Äther aus. Die ätherische Lösung wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft, wobei 30 mg unveränderter Methylester VIIb erhalten wurden. Die alkalische Lösung säuerte man, zusammen mit den Waschwässern, mit Salzsäure an und extrahierte die Suspension mit Äther-Chloroform 4 : 1. Den organischen Auszug wusch man mit Wasser, trocknete ihn und dampfte ihn ein. Die 80 mg Rückstand wurden aus Aceton umkristallisiert. Die Δ^4 -3,15-Diketo-äthiocholensäure (VIIa) schmolz bei 270—290° u. Z. Zur Analyse wurde 1 1/2 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{20}H_{28}O_4$ (330,40) Ber. C 72,70 H 7,93% Gef. C 72,66 H 7,86%

IR.-Spektrum der Suspension in Nujol: Banden u. a. bei 5,74 μ (stark, 5-Ring-Keton), 5,85 μ , (mittelstark, Säure-carbonyl), 5,96 μ und 6,17 μ sowie bei 8,42 μ , 8,62 μ und 11,68 μ im „Fingerprintbereich“.

15β -Oxy-cortexon (VIIa): 32 l einer *Czapek-Dox*-Nährösung wurden in mehreren Schüttelgefäßen verteilt, sterilisiert (pH 6,5) und mit insgesamt 1,2 l einer 3 Tage alten Kultur von *Gibberella baccata* beimpft, die in der gleichen Nährösung gezüchtet worden war. Die Gefäße liess man bei 26° schütteln, wobei sich der Pilz innerhalb 4 Tagen gut entwickelte. Nun gab man unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 8 g Cortexon in 240 cm³ Aceton zu und schüttelte weiter bei 26°. Nach 6 Tagen wurde das Mycel abgetrennt und das Kulturfiltrat mit Essigester erschöpfend ausgezogen. Der Extrakt wurde mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Die erhaltenen 8,99 g Rückstand ergaben aus Aceton 5,4 g Rohkristallisat. Dieses wurde weiter aus Methanol umkristallisiert, wobei man 15β -Oxy-cortexon (VIIa) vom Smp. 216—222° erhielt. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{23} = +196^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,904 in Äthanol). UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: λ_{max} 242 m μ (ϵ = 16950).

$C_{21}H_{30}O_4$ (346,45) Ber. C 72,79 H 8,72% Gef. C 72,66 H 8,77%

IR.-Spektrum der Suspension in Nujol: Banden u. a. bei 2,80 μ , 2,87 μ (Hydroxylgruppen), 5,82 μ , 6,05 μ und 6,20 μ (stark) sowie bei 8,15 μ , 8,97 μ , 9,35 μ und 11,52 μ im „Fingerprintbereich“.

Das 15β -Oxy-cortexon reduzierte alkalische Silberdiammin-Lösung rasch und stark; *Porter-Silber*- und *Ferrichlorid*-Reaktionen negativ.

Diacetat VIIb: Eine Lösung von 30 mg 15β -Oxy-cortexon (VIIa) in 1 cm³ abs. Pyridin wurde mit 2 cm³ Essigsäureanhydrid über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde auf Eis gegossen und mit Äther-Chloroform (4 : 1) ausgeschüttelt. Der Extrakt wurde unter Eiskühlung mit 0,1-n. Salzsäure, 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Man löste den Rückstand (31 mg) in wenig Äther, woraus unter Zugabe von Petroläther das Diacetat VIIb in feinen Nadeln kristallisierte. Smp. 160—161°. Zur Analyse wurde nochmals aus Aceton-Petroläther umkristallisiert und 4 Std. bei 70° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{24} = +159^\circ \pm 4^\circ$ (c = 0,502 in Äthanol).

$C_{25}H_{34}O_6$ (430,52) Ber. C 69,74 H 7,96% Gef. C 69,56 H 8,06%

Enolacetat des 15β -Oxy-cortexon-diacetats: 300 mg 15β -Oxy-cortexon und 600 mg Kaliumcarbonat versetzte man mit 20 cm³ Acetanhydrid und kochte 5 Std. am Rückfluss. Hierauf wurde unter Wasserzusatz im Vakuum eingeengt. Die wässrige Suspension extrahierte man mit Äther, wusch die ätherische Lösung mit Wasser, verdünnter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Der Rückstand, dreimal aus Äther umkristallisiert, gab Prismen des Enolacetats des 15β -Oxy-cortexon-diacetats vom Smp. 180–190°. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{27}H_{36}O_7$ (472,55) Ber. C 68,82 H 7,68% Gef. C 68,85 H 7,81%

Δ^4 -3-Keto- 15β -oxy-äthiocholensäure (IXa): 280 mg 15β -Oxy-cortexon (VIIIa) löste man in 5 cm³ Dioxan, versetzte die Lösung mit 700 mg Perjodsäure in 5 cm³ Wasser und liess das Gemisch 15 Std. bei 20° stehen. Das Dioxan wurde hierauf im Vakuum abgedampft und die erhaltene Suspension abgenutscht. Die Kristalle wusch man mit Wasser, löste sie in verdünnter Soda-Lösung, filtrierte diese Lösung, säuerte sie mit Salzsäure an und nutzte die Kristalle der Δ^4 -3-Keto- 15β -oxy-äthiocholensäure (IXa) ab. Sie wurden mit Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet und aus Aceton umgelöst. Smp. 292–304°. Zur Analyse wurde 1 Std. bei 130° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{20}H_{28}O_4$ (332,22) Ber. C 72,26 H 8,49% Gef. C 72,31 H 8,50%

IR.-Spektrum der Suspension in Nujol: Banden u. a. bei 2,85 μ (Hydroxylgruppe), 5,81 μ , 6,10 μ (stark) und 6,20 μ (mittelstark) sowie bei 8,28 μ , 8,97 μ und 9,26 μ (mittelstark) im „Fingerprintbereich“.

Methylester IXb: 200 mg Δ^4 -3-Keto- 15β -oxy-äthiocholensäure (IXa) wurden analog wie die 15α -Oxy-ätiösäure (VIb) methyliert. Nach der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches kristallisierte man den Δ^4 -3-Keto- 15β -oxy-äthiocholensäure-methylester (IXb) aus Aceton-Isopropyläther-Gemisch um, wobei Kristalle vom Smp. 183–185° erhalten wurden. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{24} = +179^0 \pm 4^0$ (c = 1,092 in Chloroform). UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: λ_{max} 241 m μ (ϵ = 16900).

$C_{21}H_{30}O_4$ (346,45) Ber. C 72,80 H 8,73% Gef. C 72,68 H 8,91%

Methylester-acetat IXc: 100 mg des Methylesters IXb liess man 15 Std. in 0,5 cm³ Pyridin und 1 cm³ Acetanhydrid bei 20° stehen. Die mit Wasser versetzte Lösung wurde im Vakuum eingeengt. Die erhaltene wässrige Suspension zog man mit Äther aus, wusch die ätherische Lösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Der Rückstand wurde aus Äther-Pentan-Gemisch umkristallisiert, wobei dicke Prismen des Δ^4 -3-Keto- 15β -acetoxy-äthiocholensäure-methylesters (IXc) vom Smp. 149–150° anfielen. Zur Analyse wurde 2 Std. im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$C_{22}H_{32}O_5$ (388,58) Ber. C 71,10 H 8,30% Gef. C 71,32 H 8,43%

Δ^4 -3-Keto- 15β -tosyloxy-äthiocholensäure-methylester (IXd): 86 mg des Methylesters IXb wurden mit 100 mg p-Toluolsulfosäurechlorid versetzt und 15 Std. bei 20° stehengelassen. Die Lösung versetzte man dann mit Wasser, schüttelte sie mit Äther-Chloroform 4:1 aus, wusch die organische Lösung mit verdünnter Salzsäure, Wasser, verdünnter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Der Rückstand lieferte aus Methanol den Δ^4 -3-Keto- 15β -tosyloxy-äthiocholensäure-methylester (IXd) in Form kurzer Prismen vom Smp. 117–120°. Für die Analyse wurde 3 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{28}H_{38}O_6S$ (500,62) Ber. C 67,17 H 7,25% Gef. C 67,13 H 7,45%

Δ^4 -3, 15-Diketo-äthiocholensäure-methylester (VIIb) aus IXb: 100 mg Δ^4 -3-Keto- 15β -oxy-äthiocholensäure-methylester (IXb) wurden in 2 cm³ Pyridin gelöst. Dazu gab man eine Lösung von 1 g Chromtrioxyd in 1 cm³ Wasser und 10 cm³ Pyridin und liess 15 Std. bei 20° stehen. Hierauf wurde die überschüssige Chromsäure mit etwas Hydrogensulfit-Lösung zersetzt. Die Lösung zog man mit Essigester aus, wusch die Essigester-Lösung mit verdünnter Salzsäure, Wasser, verdünnter Soda-Lösung und

Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Der Rückstand wurde aus Äther umkristallisiert, wobei Nadeln erhalten wurden, die den gleichen doppelten Smp. (168° bzw. 178°) wie das Diketon VIIb aus dem 15 α -Oxy-methylester VIIb zeigten und im Gemisch mit diesem keine Smp.-Erniedrigung aufwiesen. Auch die IR.-Spektren waren identisch. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{22} = +160,5^\circ \pm 4^\circ$ (c = 1,181 in Chloroform).

$C_{21}H_{28}O_4$ (344,43) Ber. C 73,22 H 8,19% Gef. C 73,38 H 8,29%

$\Delta^{4,14,3}$ -Keto-äthiocholadiensäure-methylester (X): 155 mg $\Delta^{4,3}$ -Keto-15 β -tosyloxy-äthiocholansäure-methylester (IXd) und 500 mg wasserfreies Natriumacetat erwärmte man 2 Std. mit 10 cm³ Eisessig auf dem kochenden Wasserbad. Hierauf wurde unter Wasserzusatz im Vakuum eingeengt. Die wässrige Suspension schüttelte man mit Äther aus, wusch die ätherische Lösung mit verd. Soda-Lösung und Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Den Rückstand von 140 mg chromatographierte man an 3 g Aluminiumoxyd. Aus den eingedampften Benzol-Eluaten wurde der $\Delta^{4,14,3}$ -Keto-äthiocholadiensäure-methylester (X) erhalten, der, aus Äther-Pentan-Gemisch umkristallisiert, 45 mg Prismen vom Smp. 149–151° gab. Zur Analyse wurde 2 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{22} = +126,5^\circ \pm 3^\circ$ (c = 1,208 in Chloroform).

$C_{21}H_{28}O_3$ (328,43) Ber. C 76,79 H 8,59% Gef. C 76,78 H 8,74%

IR.-Spektrum (in Methylenechlorid): Banden bei 5,75 μ , 5,96 μ (stark) und 6,16 μ (mittelstark) sowie bei 7,37 μ , 8,32 μ und 8,65 μ im „Fingerprintbereich“.

Das so erhaltene Dien X war hinsichtlich Smp., Misch-Smp. und IR.-Spektrum identisch mit dem aus Digitoxigenin erhaltenen $\Delta^{4,14,3}$ -Keto-äthiocholadiensäure-methylester (siehe unten).

Das gleiche Dien X wurde ebenfalls aus dem Tosylat IX d bei fünfständigem Kochen mit Collidin erhalten.

$\Delta^{4,14,3}$ -Keto-äthiocholadiensäure-methylester (X) aus Digitoxigenin: 200 mg des bekannten 3-Keto-14 β -oxy-äthiocholansäure-methylesters (XI), die aus 1 g Digitoxigenin hergestellt wurden¹⁾, löste man in 3 cm³ Eisessig, versetzte die Lösung mit einem Tropfen Bromwasserstoff in Eisessig und liess langsam eine Lösung von 33 mm³ Brom in 1 cm³ Eisessig zutropfen, wobei sofortige Entfärbung eintrat. Hierauf wurde die Lösung im Vakuum bei 30–35° eingedampft und der zurückbleibende amorphe Rückstand des 3-Keto-4 α -brom-14 β -oxy-äthiocholansäure-methylesters (XII) ohne weitere Reinigung in Pyridin gelöst. Die Lösung kochte man 5 Std. am Rückfluss, verdünnte sie hierauf mit Äther, wusch die ätherische Lösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Die erhaltenen 140 mg Rückstand wurden an 4,5 g Aluminiumoxyd chromatographiert, wobei die Benzol-Eluate 75 mg und die Äther-Eluate 30 mg Rückstand gaben. Der Rückstand der Äther-Eluate gab aus Äther-Pentan 5 mg des bekannten $\Delta^{4,3}$ -Keto-14 β -oxy-äthiocholansäure-methylesters (XIII) vom Smp. 170–174°.

Der Rückstand der Benzol-Eluate ergab aus Isopropyläther 9 mg $\Delta^{4,14,3}$ -Keto-äthiocholadiensäure-methylester (X) vom Smp. 146–149°. Für die Analyse wurde 2 Std. bei 90° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{21}H_{28}O_3$ (328,43) Ber. C 76,79 H 8,59% Gef. C 76,63 H 8,31%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\text{max}} 240 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 16950$).

Diese Verbindung zeigte sich in Smp. und Mischprobe sowie im IR.-Spektrum als identisch mit der durch Abspaltung der Tosyloxy-Gruppe aus dem $\Delta^{4,3}$ -Keto-15 β -tosyloxy-äthiocholansäure-methylester erhaltenen Verbindung.

2,4-Dinitrophenylhydrazone: 60 mg $\Delta^{4,14,3}$ -Keto-äthiocholadiensäure-methylester (X) versetzte man mit einer Lösung von 60 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 cm³ Äthanol. Die Lösung wurde unter Zusatz von etwas Salzsäure 3 Min. gekocht und hierauf abgekühlt. Das ausgefallene Hydrazon nutzte man ab, wusch es mit Äthanol und kristallisierte.

¹⁾ K. Meyer & T. Reichstein, Helv. 30, 1518 (1947).

sierte es aus Chloroform-Äthanol, wobei Kristalle vom Smp. 216-224° erhalten wurden. Zur Analyse wurde 1 Std. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{27}H_{32}O_8N_4$ Ber. C 63,76 H 6,34 N 11,02%
(508,55) Gef. „ 63,98 „ 6,26 „ 11,25%

UV.-Absorptionsspektrum in Chloroform: λ_{max} 238 m μ (ϵ = 16300), 258 m μ (ϵ = 16500), 395 m μ (ϵ = 32400).

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Dr. H. Gysel durchgeführt. Die IR.-Spektren verdanken wir Herrn Dr. E. Ganz, die papierechromatographischen Untersuchungen den Herren Dr. R. Neher und E. v. Arx.

SUMMARY.

In continuation of our earlier work certain fungi were detected which are capable of hydroxylating steroids at further carbon atoms of the nucleus. These microbiological procedures have made possible the preparation of new cortexone derivatives with an additional hydroxyl group in 7α -, 15α - or 15β -position. The elucidation of the constitution of these compounds by degradation and chemical connection with known steroids has been accomplished. From the molecular rotation differences observed the configuration of 2α , 3β , 15α -trihydroxy- 5α , 22 α -spirostane is suggested for digitogenin.

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

45. Fluorènacènes et fluorènaphènes.

Synthèses dans la série des indéno-fluorènes IV¹⁾.

Cis-fluorènacène (indéno-(2',1':2,3)-fluorène)
et trans-fluorènaphène (indéno-(1',2':1,2)-fluorène)

par Louis Chardonnens et René Ritter.

(11 I 55)

Dans la 1^{re} communication de cette série, *W. Deusel*²⁾ a donné une élégante synthèse du cis-fluorènacène (VII).

En condensant la chalcone (I) avec l'ester diéthylique de l'acide acétone-dicarboxylique (II), on obtient l'ester diéthylique de l'acide diphenyl-3,5-cyclohexène-2-one-1-dicarboxylique-2,6 (III); celui-ci est aromatisé par le brome en ester diéthylique de l'acide diphenyl-4,6-hydroxy-2-isophtalique (IV), dont la saponification accompagnée de cyclisation fournit l'hydroxy-10-cis-fluorènacène-dione (V)³⁾; cette dernière est finalement réduite, d'abord en hydroxy-10-cis-fluorènacène (VI), puis en cis-fluorènacène (VII).

Nous avons trouvé que l'on pouvait aussi synthétiser ce composé à partir du m-xylène. Par bromation du m-xylène (VIII) on obtient

¹⁾ III^e communication: *W. Deusel*, *Helv.* **35**, 1774 (1952).

²⁾ *Helv.* **34**, 168 (1951).

³⁾ Au sujet de la nomenclature et du numérotage, voir: *Helv.* **34**, 168 (1951).