

### Zusammenfassung.

Für die säurekatalysierten Substitutionen am C-Atom 1 von Pyranosen wird ein einheitlicher Mechanismus postuliert. Dieser erlaubt semiquantitative Aussagen über die Art von Isomeriegleichgewichten und über die Solvolysesestabilität von Pyranosederivaten. Als Zwischenzustände werden semisesselförmige Ionen angenommen, welche durch Ionenpaarbildung oder Solvatisierung stabilisiert sein können. Weiterhin wird der elektrostatische Abschirmungseffekt besprochen und sein Einfluss auf die Solvolysesegeschwindigkeit von Pyranosederivaten mit nucleophilen Gruppen diskutiert.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft* Basel,  
Pharmazeutische Abteilung.

### 142. Über Steroide.

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

#### Bildung von 18- und 19-Oxy-cortexon durch Einwirkung von Nebennieren-Homogenaten auf Cortexon

von F. W. Kahnt, R. Neher und A. Wettstein.

(14. III. 55.)

Die Umwandlung von Cortexon (= 11-Desoxy-corticosteron) unter dem Einfluss von Nebennieren-Homogenaten haben wir<sup>2)</sup> schon früher studiert, und zwar besonders die Bildung von Corticosteron, d.h. des 11 $\beta$ -Hydroxylierungsproduktes. Dieses stellt bei Verwendung von Vollhomogenaten mengenmäßig das Hauptprodukt dar; daneben wurden aber noch andere Verbindungen, z. B. das 6 $\beta$ -Oxy-cortexon<sup>3)</sup> erhalten. Versuche zur Biosynthese von Aldosteron *in vitro*<sup>4)</sup> zeigten dann, dass sein Gehalt in Vollhomogenaten von Rinder-Nebennieren durch aerobe Inkubation unter Zusatz geeigneter Aktivatoren stark gesteigert werden kann. Dieses so nachgewiesene Aldosteron liess sich später zu über 50% auch in kristalliner Form gewinnen. Offenbar sind also in den Rinder-Nebennieren enthaltene Vorstufen durch Aktivierung

<sup>1)</sup> Auszugsweise vorgetragen vor der Schweiz. Ges. f. Endokrinologie (Basel, 26. II. 55; s. Schw. med. Wschr. **27**, 660 (1955)) sowie vor der Schweiz. Chem. Ges. (Bern, 27. II. 55; s. Chimia, **9**, 119 (1955)); 128. Mitteilung, s. Acta endocrinol. **18**, 386 (1955).

<sup>2)</sup> F. W. Kahnt & A. Wettstein, Helv. **34**, 1790 (1951); F. W. Kahnt, Ch. Meystre, R. Neher, E. Vischer & A. Wettstein, Experientia **8**, 422 (1952).

<sup>3)</sup> W. J. Haines, Rec. Progr. Hormone Res. **7**, 255 (1952).

<sup>4)</sup> A. Wettstein, F. W. Kahnt & R. Neher, CIBA Found. Colloqu. Endocrinol. **8**, 170 (1955); s. a. A. Wettstein & G. Anner, Experientia **10**, 415 (1954).

der Enzymsysteme vermehrt in Aldosteron übergeführt worden. Bei der Suche nach solchen Vorstufen ergab sich dann u. a., dass ein Zusatz von Cortexon bei der aeroben Inkubation der Homogenate aus Rinder-Nebennieren die Aldosteron-Bildung verstärkte, ein solcher von Progesteron oder Corticosteron dieselbe verminderte. Daraus hatten wir die Versuchshypothese abgeleitet, nach der die zur Biosynthese des Aldosteron *in vitro* führenden Oxygenierungen in der Reihenfolge 21-, 18- und 11-Stellung eintreten.

Während die erste und die letzte dieser Stufen (21-Hydroxylierung<sup>1)</sup> und 11 $\beta$ -Hydroxylierung<sup>2)</sup>) an sich bekannte biochemische Reaktionen darstellen, wurde bisher eine Hydroxylierung der angulären Methylgruppe 18 der Steroidmolekel nicht beobachtet und kein entsprechendes Derivat isoliert, ausser auf indirekte Weise im oben erwähnten Fall des Aldosteron. Es gelang uns nun, das bisher unbekannte 18-Oxy-cortexon (I), das als potentieller Vorfänger des Aldosteron in Betracht kommende Hydroxylierungsprodukt des Cortexons, aus dem komplizierten Reaktionsgemisch der aeroben Inkubation von Cortexon mit Nebennieren-Homogenaten zu isolieren und zu identifizieren. Überraschenderweise konnte aus den gleichen Ansätzen auch die Stellungs-isomere Verbindung, das an sich bekannte 19-Oxy-cortexon (IV), welches die neue Oxygruppe an der andern angulären Methylgruppe trägt, gewonnen werden, und zwar in relativ grossen Mengen. Selbstverständlich entstanden neben den neu gewonnenen Hydroxylierungsprodukten auch die früher isolierten, wie Corticosteron (als Hauptprodukt bis zu 60% der eingesetzten Menge Cortexon) und 6 $\beta$ -Oxy-cortexon, ferner andere, deren Identifizierung noch aussteht. In der Folge beschränken wir uns auf die Beschreibung der Gewinnung von 18- und 19-Oxy-cortexon.

Für unsere Versuche dienten wiederum (vgl. <sup>3)</sup> und <sup>4)</sup>) Homogenate von Rinder-Nebennieren. In der Absicht, die 11 $\beta$ -Hydroxylierung zu vermindern, haben wir die in 0,2-m. Saccharose-Lösung<sup>5)</sup> hergestellten Homogenate bei ca. 5000 g zentrifugiert. Wir untersuchten dann aber, neben den überstehenden Lösungen, welche die 17- und 21-Hydroxylasen enthalten<sup>1)</sup>, auch die anfallenden 11-Hy-

<sup>1)</sup> J. E. Plager & L. T. Samuels, Arch. Biochem. Biophys. **42**, 477 (1953); **43**, 476 (1953); J. biol. Chemistry **211**, 21 (1954).

<sup>2)</sup> Siehe <sup>3)</sup>, ferner M. L. Sweat, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4056 (1951); M. Hayano, R. I. Dorfman & E. Y. Yamada, J. biol. Chemistry **193**, 175 (1951); **200**, 175 (1953); **201**, 175 (1953); **211**, 227 (1954).

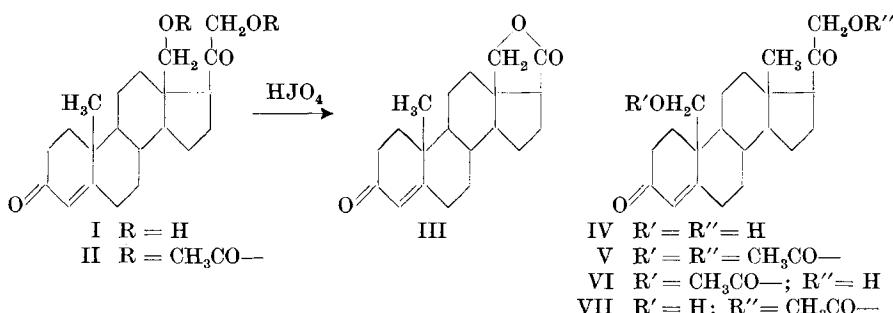
<sup>3)</sup> F. W. Kahnt & A. Wettstein, Helv. **34**, 1790 (1951); F. W. Kahnt, Ch. Meystre, R. Neher, E. Vischer & A. Wettstein, Experientia **8**, 422 (1952).

<sup>4)</sup> A. Wettstein, F. W. Kahnt & R. Neher, CIBA Found. Colloqu. Endocrinol. **8**, 170 (1955); s. a. A. Wettstein & G. Anner, Experientia **10**, 415 (1954).

<sup>5)</sup> L. T. Samuels, Privatmitteilung.

droxylase-reichen Rückstände<sup>1)</sup>. Diese Enzympräparate, verdünnt mit einer Fumaratlösung, wurden nach Zugabe von Cortexon (10-proz. in Äthanol gelöst) und von ATP, DPN und TPN drei Std. bei 35° inkubiert, unter Durchleiten von 3 l Sauerstoff pro Min. Da die Inkubation von Nebennieren allein, d. h. ohne Zugabe von Cortexon, wie gesagt schon eine starke Vermehrung der Corticosteroide zur Folge hat<sup>2)</sup>, waren zum Vergleich wieder solche Versuche anzusetzen. Es zeigte sich, dass die Reaktionsprodukte ohne Cortexon-Zusatz weder aus Vollhomogenat noch aus überstehender Lösung oder aus Rückstand vom Zentrifugieren 18-Oxy-cortexon enthielten, hingegen ganz wenig 19-Oxy-cortexon. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass wir bisher bei der tonnenweisen Extraktion von Rinder- oder Schweine-Nebennieren weder 18- noch 19-Oxy-cortexon auffinden konnten<sup>3)</sup>. Es ist somit naheliegend, diese Verbindungen als Hydroxylierungsprodukte des in den anderen Versuchen zugefügten Cortexons zu betrachten. Versuche mit radioaktivem Cortexon zur Sicherstellung dieser Annahme sind im Gange. Die Unterlagen über Herstellung, Inkubation und Aufarbeitung der Homogenate finden sich im experimentellen Teil. Hier sei lediglich erwähnt, dass mit Vollhomogenat, insbesondere unter Zusatz von 0,2% Cortexon und 0,05% DPN, die besten Ausbeuten an 18-Oxy-cortexon erhalten wurden. Bei den durch Zentrifugieren erhaltenen Fraktionen (überstehende Lösungen und Rückstände) ging die 18-Hydroxylierung eindeutig zugunsten derjenigen in 19-Stellung zurück. Was die 18-Hydroxylierung anbetrifft, so zeigten sich die überstehenden Lösungen den entsprechenden Rückständen überlegen.

Das durch präparative Papierchromatographie isolierte und durch Behandlung mit Hydrogencarbonat von 6β-Oxy-cortexon befreite neue 18-Oxy-cortexon (I) kristallisierte aus Äther-Aceton in farblosen



<sup>1)</sup> Siehe Fussnote 3, Seite 1238, ferner *M. L. Sweat*, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4056 (1951); *M. Hayano, R. I. Dorfman & E. Y. Yamada*, J. biol. Chemistry **193**, 175 (1951); **200**, 175 (1953); **201**, 175 (1953); **211**, 227 (1954).

<sup>2)</sup> Vgl. Fussnote 4, Seite 1238.

<sup>3)</sup> Zusatz bei der Korrektur: *V. R. Mattox*, Proc. Staff Meet. Mayo Clinic **30**, 192 (1955), gelang inzwischen die Isolierung von 19-Oxy-cortexon aus Rinder-Nebennierenextrakt.

Drusen vom Smp. 200—205°. In sämtlichen untersuchten papier-chromatographischen Systemen lief es zwischen 17 $\alpha$ -Oxy-cortexon (Substanz S) und 11-Epi-corticosteron, annähernd gleich wie 6 $\beta$ -Oxy-cortexon; lediglich im System Formamid/Cyclohexan-Benzol 1:1 besitzt I einen etwas kleineren Rf-Wert als 6 $\beta$ -Oxy-cortexon, ein Unterschied, der für die einwandfreie Trennung der beiden Substanzen jedoch zu gering ist. Die erhaltenen, auf dem Papier geprüften Eigenschaften des Reduktionsvermögens, der UV.-Absorption und der UV.-Fluoreszenz nach Einwirkung von Natronlauge liessen auf unveränderte Cortexon-Struktur schliessen. Die Laufgeschwindigkeit der freien Verbindung I wies auf ein Mono-oxy-cortexon hin. Da sein Acetylierungsprodukt einen ähnlichen Rf-Wert wie Cortexon-acetat besitzt, was die Anwesenheit einer freien Oxygruppe praktisch ausschliesst, muss in ihm das Diacetat II vorliegen. Die IR.-Spektren standen mit dieser Annahme in Übereinstimmung: Das Spektrum von I (Fig. 1) unterscheidet sich deutlich von demjenigen des 6 $\beta$ -Oxy-cortexon (Fig. 2). So zeigt Fig. 1, im Gegensatz zu Fig. 2, an Stelle einer scharfen Hydroxylbande eine scharfe und daneben eine breite Hydroxylbande, die auf eine Wasserstoffbrücke zwischen dem 18-Hydroxyl und dem 20-Carbonyl zurückzuführen ist. Dies kommt offenbar auch in der schwächeren Polarität von I gegenüber 19-Oxy-cortexon (IV) zum Ausdruck.

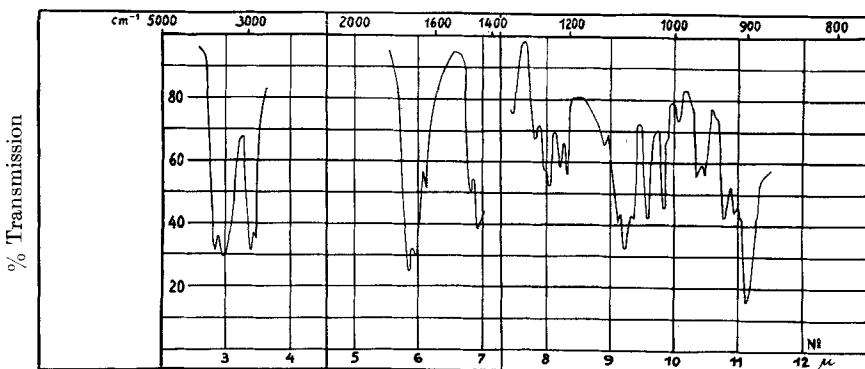


Fig. 1.  
Mikro-IR.-Spektrum<sup>1)</sup> von 18-Oxy-cortexon (I).

<sup>1)</sup> Aufgenommen in einem *Perkin-Elmer*-Spektrophotometer, Modell 12-C mit Mikroskop, mit NaCl-Prisma.

Die Substanz wurde durch Verdampfen der  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Lösung auf einer NaCl-Platte als glasige Schicht deponiert (vgl. *L. O. Plantin*, Acta endocrinol. **18**, 354 (1955)). Die Intensitäten der auf prozentuale Durchlässigkeit umgerechneten Kurve sind nur innerhalb der durch vertikale Linien getrennten Bereiche vergleichbar.

Für die Aufnahme dieser Mikro-IR.-Spektren sind wir Herrn Dr. *L. O. Plantin*, Stockholm, sehr dankbar.

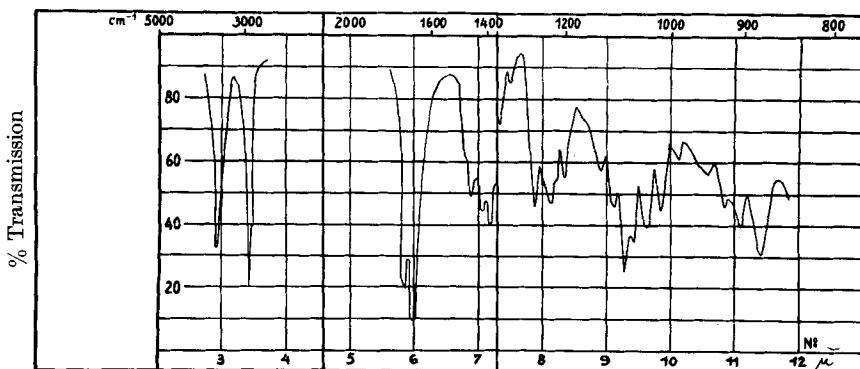


Fig. 2.

Mikro-IR.-Spektrum<sup>1)</sup> von  $6\beta$ -Oxy-cortexon.

Die Konstitution von I ergab sich eindeutig aus dem Resultat seiner Behandlung mit Perjodsäure, die zur Bildung eines sublimierbaren  $\gamma$ -Lactons III vom Smp. 221–224° und der Formel  $C_{20}H_{26}O_3$  führte. III zeigte im IR. (Fig. 3) keine Hydroxylbande, jedoch die

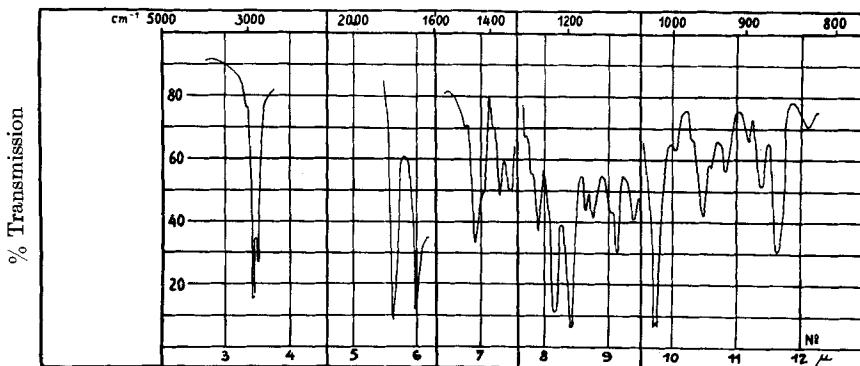


Fig. 3.

Mikro-IR.-Spektrum<sup>1)</sup> des  $14\alpha$ -Keto-18-oxy-ätiocholensäure-20 → 18-lactons III).

typische starke  $\gamma$ -Lacton-Bande bei 5,63  $\mu$ . Die biologisch eingeführte neue Hydroxylgruppe in I muss sich also in  $\gamma$ -Stellung zu dem durch Seitenketten-Abbau entstandenen 20-Carboxyl befinden, ähnlich wie bei dem aus Aldosteron mittels Perjodsäure entstehenden  $\gamma$ -Lacton<sup>2)</sup>, d. h. in 12-, 14-, 15- oder 18-Stellung. Stellung 12 kommt aus sterischen Gründen nicht in Frage (vgl. auch<sup>2</sup>), die tertiäre Stellung 14 lässt sich wegen Bildung des Diacetats II, das keine freie Hydroxylgruppe aufweist, ausschliessen und die  $15\alpha$ - und  $15\beta$ -Oxy-cortexone sind kürzlich von

<sup>1)</sup> Siehe Fussnote 1, Seite 1240.<sup>2)</sup> S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wetstein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler & T. Reichstein, Experientia **10**, 132 (1954); Helv. **37**, 1200 (1954).

uns beschrieben worden<sup>1)</sup>). Sie erwiesen sich als verschieden von I (sind übrigens im System Propylenglykol/Toluol merklich polarer) und bildeten mit Perjodsäure keine  $\gamma$ -Lactone. Für I bleibt demnach nur noch die Konstitution des 18-Oxy-cortexon.

Es liess sich somit erstmals eindeutig zeigen, dass Rinder-Nebennieren eine 18-Hydroxylase enthalten, die z. B. Cortexon in 18-Oxy-cortexon überzuführen vermag. Nach dieser Umsetzung ist nun nur noch Einwirkung einer Dehydrogenase in 18-Stellung sowie der bekannten  $11\beta$ -Hydroxylase erforderlich, um zum Aldosteron zu gelangen. Wir betrachten deshalb das neue Ergebnis als Stütze für unsere eingangs erwähnte Hypothese von der Biosynthese des Aldosteron *in vitro*. Dass das 18-Oxy-cortexon nicht in grösseren Mengen anfällt, lässt sich vielleicht damit erklären, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten bei seiner weiteren Umwandlung grösser sind als diejenigen bei seiner Entstehung. Bei der Testierung hinsichtlich Wirkung auf den Natrium-, Kalium- sowie Wasserhaushalt<sup>2)</sup> erwies sich I mit einer Dosis, in der Cortexon deutlich wirksam ist, noch als inaktiv.

Das isolierte 19-Oxy-cortexon (IV) sowie sein 19-Monoacetat (VI) erwiesen sich nach Smp., Misch-Smp., papierchromatographischem Verhalten (das ähnlich wie dasjenige von  $6\alpha$ -Oxy-cortexon ist) und im IR.-Spektrum (s. Fig. 4, im exp. Teil) als völlig identisch mit den Präparaten von Ehrenstein<sup>3)</sup>. Auch die Eigenschaften der übrigen Derivate, des Diacetates V sowie des 21-Mono-acetates VII stimmten mit den in der Literatur beschriebenen überein.

Zur Frage nach der biologischen Bedeutung in 19-Stellung hydroxylierter Steroide sei der Hinweis auf die Möglichkeit des Überganges in die bekanntlich hochaktiven 19-Nor-Verbindungen oder, durch Aromatisierung, in die in den Nebennieren vorkommenden Oestrogene gegeben. Soeben erwähnen übrigens Meyer und Mitarbeiter<sup>4)</sup> beiläufig die Entstehung von  $\Delta^4$ -19-Oxy-androstendion-(3,17) bei der Einwirkung von Zentrifugat-Rückständen aus Rinder-Nebennieren-Homogenaten auf  $\Delta^4$ -Androstendion-(3,17). Die Konstitution ihres Hydroxylierungsproduktes wurde durch Abbau zum bekannten  $\Delta^4$ -19-Nor-androstendion-(3,17) sichergestellt.

Zusatz bei der Korrektur: Inzwischen beschrieben Hayano & Dorfman<sup>5)</sup> die Entstehung von 19-Oxy-cortexon bei der Inkubation

<sup>1)</sup> Ch. Meystre, E. Vischer & A. Wettstein, Helv. **38**, 381 (1955).

<sup>2)</sup> P. Desaulles, J. Tripod & W. Schuler, Schweiz. med. Wschr. **83**, 1088 (1953). Hrn. Prof. R. Meier und diesen Autoren danken wir für die Ausführung der biologischen Prüfung.

<sup>3)</sup> G. W. Barber & M. Ehrenstein, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2026 (1954); J. org. Chemistry **19**, 1758 (1954). Herrn Prof. Ehrenstein sind wir für die Überlassung von Vergleichsproben sehr zu Dank verpflichtet.

<sup>4)</sup> A. S. Meyer, M. Hayano, M. C. Lindberg, M. Gut & O. G. Rodgers, Acta endocrinol. **18**, 150 (1955). Zusatz bei der Korrektur: Ausführliche Mitteilung s. A. S. Meyer, Experientia **11**, 99 (1955).

<sup>5)</sup> M. Hayano & R. I. Dorfman, Arch. Biochem. Biophys. **55**, 289 (1955).

von Cortexon mit gewaschenen Homogenat-Rückständen von Rinder-Nebennieren, *Zaffaroni & Mitarb.*<sup>1)</sup> dieselbe Reaktion mit Vollhomogenaten und schliesslich *Levy & Kushinsky*<sup>2)</sup> die Entstehung von 19-Oxy- sowie 17 $\alpha$ ,19-Dioxy-cortexon bei der Perfusion von Progesteron durch isolierte Rinder-Nebennieren.

### Experimenteller Teil<sup>3)</sup>.

Es wird der in Tab. A aufgeführte Versuch Nr. 475/V beispielsweise beschrieben unter Angabe der Abweichungen bei den anderen Versuchen.

**Homogenisation:** 316 g schlachtfrische Rinder-Nebennieren wurden von anhaftendem Fett befreit, in kleine Stücke geschnitten und mit 320 cm<sup>3</sup> einer eiskalten wässrigen Saccharose-Lösung (s. unten) in einem vorgekühlten Homogenisator 10 Min. homogenisiert, wobei das pH durch Zusatz von 4,5 cm<sup>3</sup> 2-n. Natronlauge bei ca. 7,5 gehalten wurde. Die genannte Lösung enthielt im 168,4 g Saccharose, 3,62 g NaCl, 3,56 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,86 g KCl, 1,16 g Fumarsäure und 3 g Nicotinsäureamid und war auf pH 7,6 eingestellt.

**Inkubation:** Der entstehende Brei wurde in diesem Vollhomogenatversuch mit 250 cm<sup>3</sup> der Saccharose-Lösung versetzt und in einen mit Rührer und Gaseinleitungsrohr versehenen Rundkolben im Thermostaten (35°) gebracht. Diese Lösung wurde mit 550 cm<sup>3</sup> einer Fumaratlösung vom pH 7,5 verdünnt, welche im 1 3,62 g NaCl, 3,56 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,86 g KCl und 4,68 g Fumarsäure enthielt. Dann versetzte man mit 110 cm<sup>3</sup> einer 0,04-m. Magnesiumsulfat-Lösung sowie, langsam unter Rühren, mit 6,4 cm<sup>3</sup> einer 10-proz. Cortexonlösung in 95-proz. Äthanol. Zum Reaktionsgemisch wurden 316 mg ATP, 31,6 mg DPN und 3,2 mg TPN zugegeben. Das pH wurde auf 7,4 eingestellt und unter Rühren während 3 Std. Sauerstoff (3 l/Min.) durch das Gemisch geleitet. Das pH wurde durch Zugabe von Salzsäure bzw. Natronlauge zwischen 7,3–7,5 gehalten.

**Zentrifugation:** In den entsprechenden Ansätzen wurde der mit der Saccharose-Lösung erhaltene Brei 1 Std. in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abgeleert und bei 0° aufbewahrt. Der Rückstand wurde mit 200 cm<sup>3</sup> frischer, eiskalter Saccharose-Lösung nochmals 1 Min. homogenisiert und nochmals 1 Std. zentrifugiert. Die überstehenden Lösungen wurden zusammen noch viermal in gleicher Weise zentrifugiert, so dass zum Schluss einerseits alle Lösungen (ohne das letzte Waschwasser), andererseits die gesamten Rückstände vereinigt vorlagen und bei 0° aufbewahrt wurden.

**L-Versuche:** Die Zentrifugen-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Fumaratlösung in Inkubationskolben verdünnt und mit 1/10 des nunmehrigen Gesamtvolumens an 0,04-m. Magnesiumsulfat-Lösung versetzt. Weitere Zusätze sowie Inkubation wie beim Vollhomogenat.

**R-Versuche:** Der Zentrifugen-Rückstand wurde mit der gleichen Menge Saccharose-Lösung wie in den L-Versuchen enthalten versetzt, ferner dann ebenso mit Fumarat- und Magnesiumsulfat-Lösung, so dass die Reaktionsvolumina der L- und R-Versuche und die Konzentrationen an ATP, DPN, TPN und Cortexon identisch waren.

**Bemerkungen zu den verschiedenen Inkubations-Ansätzen (vgl. Tab. A und theoret. Teil):** Ohne Zusatz von Fumarat war eine Bildung von 18- und 19-Oxy-cortexon in unseren Versuchen nur im Vollhomogenat und dort nur in Spuren nachweisbar (Versuch Nr. 476/V gegenüber den Versuchen 467, 468, 469, 470).

Bei einer Cortexon-Konzentration von 0,05 bis 0,1% der angewendeten Nebenrinnen-Menge war in den L- und R-Versuchen deutlich ein Optimum der Ausbeute an 18-Oxy-cortexon nachweisbar (Versuche 489, 490). Die Bildung von 6 $\beta$ -Oxy-cortexon scheint mit zunehmender Konzentration von Cortexon zuzunehmen.

<sup>1)</sup> *A. Zaffaroni, V. Troncoso & M. Garcia, Chem. Ind.* 1955, 534.

<sup>2)</sup> *H. Levy & S. Kushinsky, Arch. Biochem. Biophys.* 55, 290 (1955).

<sup>3)</sup> Alle Smp. wurden auf dem *Kofler-Block* bestimmt und korrigiert.

Tabelle A.

Versuch Nr. 1)	NN g 2)	ATP mg 3)	DPN mg 4)	TPN mg 5)	Fuma- rat molar	Cortexon mg 6)	18-Oxy- cortexon	19-Oxy- cortexon
458/V	288	365	75	7,5	0,025	0	0	Spur
477/L	286	285	28,5	2,9	0,025	0	0	Spur
/R	286	285	28,5	2,9	0,025	0	0	Spur
476/V	328	328	32,8	3,3	0	660	0,2	Spur
475/V	316	316	31,6	3,2	0,025	640	0,2	+++
468/L	306	306	30,6	3,0	0	340	0,1	0
/R	306	306	30,6	3,0	0	300	0,1	0
467/L	280	280	28,0	2,8	0	140	0,05	0
/R	280	280	28,0	2,8	0	140	0,05	0
469/L	314	314	31,4	3,2	0	160	0,05	0
470/L	354	354	35,4	3,6	0	180	0,05	0
475/V	316	316	31,6	3,2	0,025	640	0,2	+++
490/L	325	325	32,5	3,3	0,025	325	0,1	++
/R	325	325	32,5	3,3	0,025	325	0,1	+++
489/L	280	280	28,0	2,8	0,025	140	0,05	++
/R	280	280	28,0	2,8	0,025	140	0,05	(+)
486/L	323	323	32,3	3,2	0,025	650	0,2	+
/R	323	323	32,3	3,2	0,025	650	0,2	(+)
488/L	305	305	30,5	3,0	0,025	610	0,2	+
/R	305	305	30,5	3,0	0,025	610	0,2	(+)
507/V	251	251	125	2,5	0,025	502	0,2	+++

Extraktion: Die Reaktionslösungen wurden in das 9fache Volumen Aceton eingeführt, unter Umrühen in der Kälte einige Std. stehengelassen und dann abgenutscht. Der unlösliche Rückstand wurde dreimal mit je 1 l Aceton bei 40° gut durchgerührt und abgenutscht. Die vereinigten Acetonextrakte dampfte man im Vakuum unter Stickstoff bei 40° auf 250–300 cm<sup>3</sup> ein. Dem wässrigen Rückstand wurden mit Petroläther die Fette, dann mit frisch destilliertem Äthylenchlorid die Corticosteroide entzogen.

Nachweis und Isolierung: Die Äthylenchloridextrakte (z. B. 250 mg) wurden zur Vorreinigung in wenig Chloroform an 5 g Silicagel adsorbiert. Man wusch die Säule zunächst mit 80 cm<sup>3</sup> CHCl<sub>3</sub>-Aceton-Gemisch 99:1 und eluierte die Corticosteroide hierauf mit 150 cm<sup>3</sup> CHCl<sub>3</sub>-Aceton-Gemisch 1:1. Das Eluat (135 mg) wurde präparativ papierchromatographiert, wobei sich zur Trennung und Isolierung von 18- und 19-Oxy-cortexon das System Formamid/Benzol-CHCl<sub>3</sub> (1:1) als vorteilhaft erwies. Es wurde so lange chromatographiert, bis das Lösungsmittel die Papierfront erreicht hatte. Hierauf wurden die getrockneten Chromatogramme im UV. photokopiert und nach Lage der absorbierenden Banden normalerweise in 6 Fraktionen a–f zerschnitten. Diese enthielten (mit zunehmender Wanderungsgeschwindigkeit):

1) V = Vollhomogenat, L = Zentrifugat: überstehende Lösung, R = Zentrifugat: Rückstand.

2) Rinder-Nebennieren, schlachtfrisch, homogenisiert bei 0–8°.

3) Na-Salz der Fa. SIGMA.

4) Cozymase „90“ der Fa. SIGMA.

5) TPN: Fa. SIGMA.

6) % der angewandten Nebennieren-Menge.

- a) Cortison, Hydrocortison, Aldosteron und weitere polare Substanzen.
- b) 19-Oxy-cortexon und evtl.  $6\alpha$ -Oxy-cortexon.
- c) 18-Oxy-cortexon und  $6\beta$ -Oxy-cortexon.
- d) Corticosteron.
- e) 11-Dehydro-corticosteron und wenig von anderen schwach polaren Substanzen.
- f) Cortexon und schwach polare Verunreinigungen.

Die zerschnittenen Papierstreifen wurden mit 20-proz. Methanol zu einer Pulpe zermahlen, abgenutscht, gut abgepresst und noch zweimal mit reinem Methanol langsam nachgewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeengt und mit Chloroform extrahiert. Die so gewonnenen Eluate, die z. T. bereits kristallisiert anfielen, wurden analytisch papierchromatographiert und mit Hilfe von UV.-Photokopie, Blautetrazolium-Reaktion, Natronlauge-Fluoreszenz-Test und Phosphorsäurerereagens charakterisiert.

Das Hauptprodukt bestand normalerweise immer aus Corticosteron. Dann folgte mengenmäßig 19-Oxy-cortexon; nur einen Bruchteil von letzterem (ca.  $\frac{1}{10}$ ) betrug, ausser in den besten Ansätzen, das 18-Oxy-cortexon. Ferner liessen sich nachweisen oder isolieren: Hydrocortison, Cortison, Aldosteron,  $6\beta$ -Oxy-cortexon, 11-Dehydro-corticosteron, Cortexon sowie mindestens sieben weitere unidentifizierte Substanzen in kleiner Menge.

Eluat b) kristallisierte häufig ohne weitere Reinigung. Sonst wurde im System *Bush C* oder Propylenglykol/Toluol nochmals chromatographiert. Die aus Äther-Aceton umkristallisierte Verbindung vom Smp. 162–164° erwies sich als identisch mit 19-Oxy-cortexon (s. unten).

Im Eluat c) kristallisierte das  $6\beta$ -Oxy-cortexon meist leicht, aber nicht vollständig aus. Es war in allen Ansätzen unter Variation der Versuchsbedingungen in mehrfacher Menge des 18-Oxy-cortexon enthalten, was die Isolierung des letzteren erheblich erschwerte. Ob und wieviel 18-Oxy-cortexon vorlag, liess sich dadurch nachweisen, dass man einen aliquoten Teil des Eluates c) mit Perjodsäure in Dioxan-Wasser oxydierte und den Neutralteil einerseits papierchromatographisch, anderseits im IR. auf den  $\gamma$ -Lactongehalt untersuchte (charakteristische 5-Ring-Lacton-Bande in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bei  $5,65 \mu$ ). Die halbquantitative Bestimmung im System Formamid/Cyclohexan-Benzol 1:1 oder *Bush B<sub>3</sub>* mit Adrenosteron oder Cortexon als Vergleichssubstanz lieferte Werte, die gut mit den aus den IR.-Spektren berechneten übereinstimmten.

Zur präparativen Gewinnung von 18-Oxy-cortexon wurden Ansätze von Vollhomogenaten unter Zusatz von 0,2% Cortexon und einer erhöhten Menge von DPN (s. Versuch 507/V) verwendet. Aus den Eluaten c) entfernte man zunächst durch Kristallisation einen Teil des  $6\beta$ -Oxy-cortexon, das sicherheitshalber auf Abwesenheit von 18-Oxy-cortexon (fehlendes Vermögen zur Lactonbildung) geprüft wurde. Die Mutterlaugen (mit starkem Lactonbildungs-Vermögen) wurden auf übliche Weise mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert. Das Acetatgemisch trennte man zunächst präparativ-papierchromatographisch im System *Bush B<sub>3</sub>* und eluierte nach UV.-Photokopie die den Diacetaten entsprechende Bande. Da sich die Diacetate von 18-Oxy- und  $6\beta$ -Oxy-cortexon ebenso wie die freien Verbindungen auf chromatographischem Wege nicht trennen liessen, wurde ihr Gemisch in methanolischer Lösung 2 Std. mit n-KHCO<sub>3</sub> unter Rückfluss gekocht. Neben der allgemeinen Hydrolyse trat dabei Umlagerung des  $6\beta$ -Oxy-cortexon zum 3,6,20-Triket-21-oxy-allo-pregnant<sup>1)</sup> ein. Letzteres liess sich als Monooxy-Verbindung im System Methanol-Wasser-Benzol-Petroläther 5:5:7:3 sehr gut vom 18-Oxy-cortexon, einer Dioxy-Verbindung, abtrennen. Die 18-Oxy-cortexon-Fraktion besass nach wie vor Vermögen zur Lactonbildung, UV.-Absorption, Reduktion und zu gelber Fluoreszenz mit Natronlauge, während das Allopregnant-Derivat nur noch Reduktionsvermögen und die gelbe Natronlauge-Fluoreszenz zeigte (diese offenbar deshalb, weil sich die 3,6-Diketogruppierung bei der Behandlung mit alkalischer Blautetrazoliumlösung teilweise wieder zum  $\Delta^4$ -3-Keton umlagert). Da die Umlagerung des  $6\beta$ -Oxy-cortexons mit Hydrogencarbonat nicht quantitativ erfolgte, wurde die chromatographisch gewonnene 18-Oxy-corte-

<sup>1)</sup> P. Th. Herzig & M. Ehrenstein, J. org. Chem. 16, 1050 (1951).

xon-Fraktion nochmals auf gleiche Weise mit Hydrogencarbonat behandelt und wiederum präparativ papierchromatographiert, wobei nur noch wenig der Allo pregnan-Verbindung anfiel. Diese Behandlung erlaubte zwar praktisch alles  $6\beta$ -Oxy-cortexon zu entfernen, zerstörte aber auch einen Teil des 18-Oxy-cortexon. Ein Versuch zur Umlagerung des  $6\beta$ -Oxy-corteceton-diacetats in das  $6\alpha$ -Derivat<sup>1)</sup> mit HCl in Chloroform ergab in bezug auf die Ausbeute an 18-Oxy-cortexon kein vorteilhafteres Resultat.

$18\text{-Oxy-cortexon}$  (I) in obiger Weise gereinigt und zweimal aus Äther-Aceton umkristallisiert, schmolz bei 200—205°. Das IR.-Spektrum (s. Figur 1, im theoretischen Teil) zeigte Banden bei 2,85  $\mu$  (Hydroxyl), 3,00  $\mu$  (Hydroxyl, assoziiert), 5,86  $\mu$  (20-Keton), 5,97  $\mu$  und 6,13  $\mu$  ( $\Delta^4$ -3-Keton), ferner bei 6,82  $\mu$ , 6,93  $\mu$ , 7,49  $\mu$ , 7,83  $\mu$ , 8,04  $\mu$ , 8,20  $\mu$ , 8,32  $\mu$ , 8,89  $\mu$ , 9,11  $\mu$ , 9,23  $\mu$ , 9,34  $\mu$ , 9,57  $\mu$ , 9,84  $\mu$ , 10,04  $\mu$ , 10,35  $\mu$ , 10,45  $\mu$ , 10,76  $\mu$ , 10,93  $\mu$  und 11,10  $\mu$ . UV.-Absorption (240 m $\mu$ ) und Reduktionsvermögen positiv; Natronlauge-Fluoreszenz gelb, keine Fluoreszenz mit Phosphorsäure. Wandert bei der Papierchromatographie zwischen 17 $\alpha$ -Oxy-cortexon und 11-Epi-corticosteron und praktisch gleich wie  $6\beta$ -Oxy-cortexon in den Systemen Propylenglykol/Toluol, Formamid/Benzol, Formamid/Benzol-Chloroform (1:1), Bush B<sub>5</sub>, C und B<sub>1</sub> sowie in Methanol-Wasser-Benzol-Leichtpetrol 5:5:7:3, in Formamid/Cyclohexan-Benzol (1:1) etwas langsamer.

$18\text{-Oxy-cortexon-diacetat}$  (II): Bei der Acetylierung von I mit überschüssigem Acetanhydrid in Pyridin erhielt man ein amorphes Produkt, das bisher infolge der kleinen Menge noch nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Der Rf-Wert in Formamid/Cyclohexan-Benzol (2:1) liegt ganz nahe bei Cortexon-acetat, was die Anwesenheit einer freien Oxygruppe ausschliesst.

$\Delta^4$ -3-Keto-18-oxy-ätiocholensäure-20 → 18-lacton (III): 10,0 mg rohes I in 1 cm<sup>3</sup> Dioxan wurden mit 20 mg HJO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O in 1 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und 8 Std. bei 20° stehengelassen. Nach Einengen im Vakuum nahm man in Äther-Chloroform 3:1 auf und wusch mit 2-n. Sodalösung und Wasser neutral. Der bereits kristalline Neutralteil wurde im System Formamid/Cyclohexan-Benzol 1:1 präparativ papierchromatographiert und die zwischen Cortexon und Adrenosteron liegende, dem Lacton III entsprechende Bande eluiert. Das Eluat wurde eingedampft, bei 150—200° unter 0,05 mm Druck sublimiert und ein zweites Mal, nun im System Bush B<sub>3</sub> chromatographiert. Man erhielt so das reine Lacton III, welches, aus Äther-Aceton umkristallisiert, den Smp. 221—224° aufwies. III zeigte erwartungsgemäss starke UV.-Absorption bei 240 m $\mu$ , nach Behandlung mit Natronlauge gelbe Fluoreszenz im UV., hingegen kein Reduktionsvermögen.

C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub> Ber. C 76,40 H 8,34% Gef. C 75,48 H 8,07% (Einwage nur 1,110 mg!)

Das IR-Spektrum (s. Fig. 3, im theoretischen Teil) weist keine Hydroxylbande, jedoch eine starke Bande bei 5,63  $\mu$  auf ( $\gamma$ -Lacton), ferner Banden bei 5,98  $\mu$  ( $\Delta^4$ -3-Keton), sowie bei 6,90  $\mu$ , 7,28  $\mu$ , 7,45  $\mu$ , 7,66  $\mu$ , 7,77  $\mu$ , 7,88  $\mu$ , 8,13  $\mu$ , 8,37  $\mu$ , 8,65  $\mu$ , 8,75  $\mu$ , 9,03  $\mu$ , 9,12  $\mu$ , 9,39  $\mu$ , 9,68  $\mu$ , 9,74  $\mu$ , 10,03  $\mu$ , 10,45  $\mu$ , 10,60  $\mu$ , 10,80  $\mu$ , 11,17  $\mu$ , 11,36  $\mu$ , 11,63  $\mu$  und 12,11  $\mu$ .

$19\text{-Oxy-cortexon}$  (IV): Smp. 162—164° (zweimal aus Äther-Aceton umkristallisiert); keine Depression im Misch-Smp. mit 19-Oxy-cortexon (Smp. 159—162°) von Ehrenstein<sup>2)</sup>. Die beiden Präparate verhielten sich auch völlig identisch bei der Papierchromatographie in Propylenglykol/Toluol, Formamid/Benzol-Chloroform (1:1) und im System Bush C. Besonders charakteristisch erweist sich die Natronlauge-Fluoreszenz, die blaugrün ist und nicht gelb; letztere Farbe geben nach J. E. Bush<sup>3)</sup> sonst alle einfachen  $\Delta^4$ -3-Ketosteroide, was an vielen Verbindungen bestätigt werden konnte. Die Ausnahme beim 19-Oxy-cortexon und seinen Acetaten ist durch die Nachbarschaft von 19-Oxy- und  $\Delta^4$ -3-Ketogruppe bedingt.

Auch im IR.-Spektrum erwies sich das 19-Oxy-cortexon aus Nebennieren-Homogenen als identisch mit authentischem Material (Fig. 4).

<sup>1)</sup> P. Th. Herzig & M. Ehrenstein, J. org. Chemistry **16**, 1050 (1951).

<sup>2)</sup> G. W. Barber & M. Ehrenstein, J. org. Chemistry **19**, 1758 (1954).

<sup>3)</sup> Recent Progr. Hormone Res. **9**, 321 (1954).

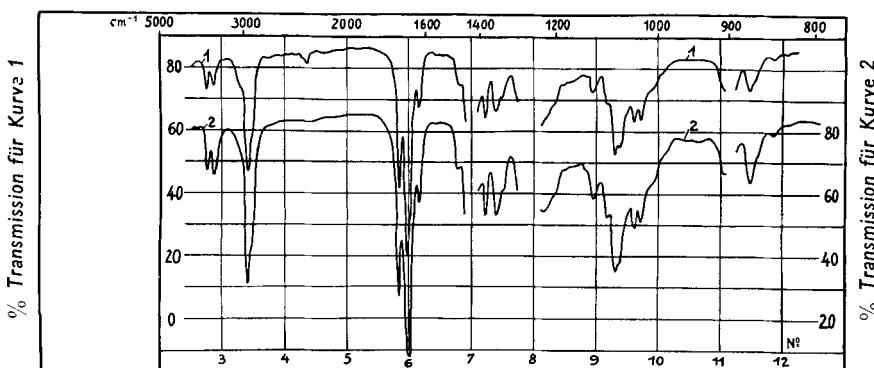


Fig. 4.

IR.-Spektren<sup>1)</sup> von 19-Oxy-cortexon (*Ehrenstein*) „Kurve 1“ und 19-Oxy-cortexon aus Nebennieren „Kurve 2“ in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , kompensiert mit reinem Lösungsmittel. Mikrozelle, Schichtdicke 0,2 mm.

**19-Oxy-cortexon-diacetat (V):** 20 mg IV wurden in  $0,2 \text{ cm}^3$  abs. Pyridin gelöst mit  $0,1 \text{ cm}^3$  einer 10-proz. Lösung von Acetanhydrid in abs. Benzol versetzt und 15 Std. bei  $20^\circ$  gehalten. Nach Einengen im Vak., Aufnehmen des Rückstandes in Äther-Chloroform 3:1 und üblicher Aufarbeitung erhielt man ein leicht kristallisierendes Produkt; es schmolz nach zweimaliger Umkristallisation aus Aceton-Äther bei  $122^\circ$  und wanderte in Propylenglykol/Toluol ca. wie Cortexon-acetat und im System *Bush B*<sub>3</sub> zwischen Cortexon und Cortexon-acetat. Es besitzt Reduktionsvermögen, absorbiert im UV. ( $240 \text{ m}\mu$ ) und gibt die blaugrüne Natronlauge-Fluoreszenz im UV.

Im IR.-Spektrum<sup>1)</sup> zeigte das Diacetat V, gelöst in  $\text{CS}_2$ , keine Hydroxylbande, dagegen eine sehr starke Bande bei  $5,70 \mu$  (2 Acetoxygruppen), eine schwächere bei  $5,76 \mu$  (20-Keton) und eine starke bei  $5,94 \mu$  ( $\Delta^4$ -3-Keton). Auch die Drehung ( $[\alpha]_D^{21} = +206^\circ \pm 40^\circ$ ) stimmte mit den Angaben von *Ehrenstein* für V gut überein.

Die Mutterlaugen von V enthielten geringe Mengen des 19-Oxy-cortexon-21-monoacetates (VII).

**19-Acetoxy-cortexon (VI):** 8,3 mg Diacetat V wurden in  $1 \text{ cm}^3$  Methanol gelöst, mit  $1 \text{ cm}^3$  n.- $\text{KHC}_2\text{O}_4$ -Lösung versetzt und 17 Std. bei  $20^\circ$  unter Stickstoff im Dunkeln stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man ein amorphes Gemisch, in dem sich papierchromatographisch IV und VI nachweisen ließen (System *Bush B*<sub>1</sub>). Das Monoacetat VI wurde durch präparative Papierchromatographie abgetrennt und isoliert. Es schmolz nach Umkristallisieren aus Äther-Aceton und Aceton bei  $180-185^\circ$ . Es erwies sich sowohl nach Misch-Smp., papierchromatographischem Verhalten (Rf-Wert und Farbreaktionen) als auch in seinen IR.-Spektren als völlig identisch mit authentischem 19-Acetoxy-cortexon von *Ehrenstein*. Banden in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Lösung bei  $2,80 \mu$  (Hydroxyl),  $5,74 \mu$  (Acetoxygruppe),  $5,84 \mu$  (20-Keton),  $5,97 \mu$  und  $6,15 \mu$  ( $\Delta^4$ -3-Keton) sowie bei  $6,79 \mu$ ,  $7,24 \mu$ ,  $7,33 \mu$ ,  $7,50 \mu$ ,  $8,46 \mu$ ,  $8,93 \mu$ ,  $9,30 \mu$ ,  $9,45 \mu$ ,  $9,67 \mu$ ,  $9,90 \mu$  und  $10,17 \mu$ .

**19-Oxy-cortexon-21-acetat (VII):** 20,5 mg IV wurden, in  $0,2 \text{ cm}^3$  abs. Pyridin gelöst, mit  $0,066 \text{ cm}^3$  einer 10-proz. Lösung von Acetanhydrid in abs. Benzol versetzt und 2 Tage bei  $20^\circ$  stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurde das Gemisch papierchromatographisch (Propylenglykol/Toluol) analysiert. Es lagen 4 Verbindungen vor, nämlich 19-Oxy-cortexon (IV), Rf ca. 0,06, das 21-Mono-acetat VII, Rf ca. 0,32 (knapp vor Cortison-acetat), das 19-Mono-acetat VI, Rf ca. 0,65 (wie Cortexon), und das Diacetat

<sup>1)</sup> Aufgenommen in einem *Perkin-Elmer*-Spektrophotometer, Modell 21, mit NaCl-Prisma; resolution 4, response 1/1, speed 2 Min./ $\mu$ , suppression 1. Für die Aufnahme der in dieser Arbeit erwähnten Makro-IR-Spektren danken wir Herrn Dr. E. Ganz bestens.

V, Rf ca. 0,86 (etwa wie Cortexon-acetat). 23,1 mg des Gemisches wurden auf 10 Blatt *Whatman*-Papier Nr. 1 (mit je 17 cm Startlinienlänge) präparativ im System *Bush B<sub>1</sub>* chromatographiert. Nach Elution der UV.-absorbierenden Banden konnten alle 4 Bestandteile kristallisiert erhalten werden.

Nach Umkristallisieren aus Äther-Aceton schmolz das 21-Monoacetat VII bei 196—199°. Es reduzierte Blautetrazoliumchlorid, absorbierte im UV. ( $\lambda_{\text{max}}$  242 m $\mu$ ) und zeigte ebenfalls blaugrüne Natronlauge-Fluoreszenz im UV. Im IR.-Spektrum<sup>1)</sup> (aufgenommen in Methylchlorid) sind folgende Banden sichtbar: 2,75  $\mu$  (Hydroxyl), 5,70  $\mu$  (21-Acetoxygruppe), 5,78  $\mu$  (20-Keton), 5,98  $\mu$  und 6,15  $\mu$  ( $\Delta^4$ -3-Keton) sowie mehrere Banden im übrigen Bereich, die von denjenigen des 19-Monoacetat VI teilweise stark verschieden sind.

#### SUMMARY.

By aerobic incubation of Cortexone with homogenates of beef adrenals the new 18-hydroxy-cortexone as well as the already known 19-hydroxy-compound are obtained. The implications of the presence of an 18-hydroxylase for the postulated course of biosynthesis of aldosterone in vitro are discussed.

Forschungslaboratorium der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel  
Pharmazeutische Abteilung.

### 143. Über den Mechanismus der Bildung von Diphenyl aus Fluorbenzol und Phenyllithium<sup>2)</sup><sup>3)</sup>

von Erwin F. Jenny<sup>4)</sup> und John D. Roberts.

(21. I. 55.)

Isotopenstudien haben gezeigt, dass Chlorbenzol und Kaliumamid unter Umlagerung miteinander reagieren<sup>5)</sup>. Chlorbenzol-1-<sup>14</sup>C lieferte Anilin-1-<sup>14</sup>C (III) und Anilin-2-<sup>14</sup>C (IV) in gleichen Mengen. Die äquivalente Verteilung des isotopen Kohlenstoffs in der Anilinmolekel lässt auf ein symmetrisches Zwischenprodukt schliessen. Im ersten Schritt wird Chlorwasserstoff aus I eliminiert, und Ammoniak lagert sich dann an das symmetrische „Benzyn“<sup>6)</sup> (II) an, was die gefundene Verteilung der Radioaktivität erklärt:

<sup>1)</sup> Siehe Fussnote 1, Seite 1247.

<sup>2)</sup> Teilweise vorgetragen am XIV. Internationalen Kongress für reine und angewandte Chemie, 21.—27. Juli 1955, in Zürich.

<sup>3)</sup> Contribution No. 2007 from the *Gates and Crellin* Laboratories, California Institute of Technology, Pasadena 4, California, USA.

<sup>4)</sup> Arthur Amos Noyes Fellow in Chemistry, California Institute of Technology. Der Stiftung sei auch an dieser Stelle für die grosszügige Unterstützung gedankt.

<sup>5)</sup> John D. Roberts, Howard E. Simmons, Jr., L. A. Carlsmith & C. Wheaton Vaughan, J. Amer. chem. Soc. **75**, 3290 (1953).

<sup>6)</sup> Der Ausdruck „Benzyn“ wurde in Anlehnung an das englische „benzyne“ gewählt.