

spots which occurred on chromatograms, especially those developed in isopropanol-ammonia-water. When eluted from a chromatogram and rechromatographed, S II and S III were stable, but S I was converted to S II during chromatography.

No evidence has so far been obtained that any of the unknown substances is a phosphorylated derivative of choline. With Dragendorff reagent, phosphoryl choline gives a red colour, as do acetyl choline and CCC (as well as other choline derivatives substituted at the hydroxyl position), while the unknown substances all give the violet colour characteristic of choline itself. The ammoniummolybdate-perchloric acid reagent for phosphoric acid esters gives no reaction with the unknowns.

Details of this and of further work will be published elsewhere.

Zusammenfassung. Im Hinblick auf die Untersuchung der Wirkung von Chlorcholinchlorid im Stoffwechsel der Quartärammoniumverbindungen in Pflanzen wurden

deren natürlich vorhandene Substanzen in wässrigen Extrakten von Tomatenpflanzen papierchromatographisch in vier Lösungsmitteln untersucht.

In den Extrakten überwog eine Substanz, die sich von Cholin chromatographisch unterscheidet, die aber dieselbe Farbreaktion mit einem modifizierten Dragendorffschen Reagens gibt. Während der Papierelektrophorese bei pH 6 wird diese Substanz in zwei andere umgewandelt. Eine von diesen entspricht chromatographisch Cholin. Keine von den unbekannten Substanzen aber scheint ein phosphoryliertes Derivat von Cholin zu sein.

H. H. MAYR and R. G. PAXTON¹⁰

Biologische Forschungsabteilung der Österreichischen Stickstoffwerke Aktiengesellschaft, Linz (Austria), June 18, 1962.

¹⁰ Present address: Department of Botany, Royal Holloway College, Egham (Surrey, England).

Erycanosid, ein neues Herzglycosid aus *Erysimum canescens* Roth

Im Laufe der Isolierung von Helveticosid und Erysimosid aus den oberirdischen Teilen von *Erysimum canescens* Roth durch Gegenstromverteilung¹ erhielten wir aus den polaren Anteilen vier weitere, vermutlich neue, kristallisierte Herzglycoside. Im System Toluol-*n*-Butanol-Wasser (1:9:10) sind diese durch die R_f -Werte 0,76, 0,62, 0,59 und 0,50 charakterisiert.

Das Glycosid mit R_f -Wert 0,76 wurde Erycanosid genannt; Smp. 249–253° (Isopropanol-Äther); $[\alpha]_D^{25} = +50,4 \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in Methanol). Erycanosid ($C_{35}H_{52}O_{15}$ (712,76): Ber. C 58,96, H 7,35%; gef. C 58,87, H 7,40%) zeigte im UV-Absorptionsspektrum neben dem Absorptionsmaximum des Butenolid-Ringes bei 217 m μ ($\log \epsilon = 4,20$) ein zweites Maximum bei 302 m μ ($\log \epsilon = 1,50$). Erycanosid bildet eine krist. Hexa-*O*-acetyl-Verbindung ($C_{47}H_{64}O_{21}$ (965,15): Ber. C 58,50, H 6,71%; gef. C 58,92, H 6,74%) Smp. 234–237° (Aceton-Äther); $[\alpha]_D^{25} = +31,50 \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in Chloroform).

Die saure Hydrolyse von Erycanosid mit 0,1*N* H₂SO₄ gab als Aglukon Strophanthidin (identifiziert durch IR-Spektrum, Papierchromatogramm, Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt). Aus den wasserlöslichen Anteilen der Hydrolyse wurde durch Chromatographie an Kohle² 2-Desoxycellobiose³ isoliert; $C_{12}H_{22}O_{10}$ (326,18). Ber. C 44,15, H 6,80%; gef. C 44,89, H 7,01%; Smp. 206–214° (Aceton-Äther); $[\alpha]_D^{25} = +30,9 \pm 2^\circ$ ($c = 1,9$ in Pyridin nach 48 h).

Nach Acetylierung der Biose wurde das krist. Hexa-*O*-acetylderivat⁴ erhalten, $C_{24}H_{34}O_{18}$ (578,51). Ber. C 49,86,

H 5,94%; gef. C 50,57, H 5,94%; Smp. 194–198° (Aceton-Äther); $[\alpha]_D^{25} = -15,8 \pm 2^\circ$ ($c = 1,0$ in Chloroform). Die saure Hydrolyse der Biose unter energischen Bedingungen⁵ lieferte 2-Desoxyglucose und Glucose, die durch Papierchromatographie nachgewiesen wurden⁶.

Erycanosid kommt somit die Konstitution Strophanthidin- β -2-desoxy-*D*-glucosido-glucosid zu.

Summary. By application of the counter-current method on extracts of *Erysimum canescens* Roth, four new crystalline glycosides have been isolated besides of Helveticoside and Erysimoside. The structure of one of them, named Erycanoside, has been determined as Strophanthidin- β -2-desoxy-*D*-glucosido-glucoside.

Š. BAUER, O. BAUEROVÁ, L. MASLER und D. ŠIKL

Abteilung für Biochemie der Saccharide des Chemischen Institutes der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Bratislava (Tschechoslowakei), 27. Juli 1962.

¹ Š. BAUER, Š. ORSZÁGH, O. BAUEROVÁ, J. MOKRÝ, L. MASLER, D. ŠIKL und J. TOMKO, *Planta Medica* 8, 145 (1960).

² W. J. WHELAN und P. J. P. ROBERTS, *J. chem. Soc.* 1953, 1298.

³ M. BERGMANN und W. BREUERS, *Liebigs Ann.* 470, 38 (1929).

⁴ A. M. GACHOKIDZE, *Ž. obšč. chim.* 16, 1914 (1946).

⁵ H. KILIANI, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 63, 2866 (1930).

⁶ Wir danken Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEIN, Institut für organische Chemie der Universität Basel, und Herrn Dr. J. SICHER, Institut für organische Chemie und Biochemie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, für die Überlassung von Vergleichsproben von 2-Desoxyglucose. – Die UV-Spektren und Elementaranalysen wurden in der Abteilung für physikalische und analytische Chemie unseres Institutes durchgeführt.

The Microbiological Dehydrogenation of 16 β -Methyl-5 α -Dehydrocortisone

A recent communication from our laboratories¹ reported the synthesis of 16 β -methylprednisone, starting from hecogenin and involving about 15 steps. In continuation of this work an attempt was made to substitute the chemical introduction of the double bonds in the positions 1 and 4 of the A ring by microbiological dehydrogenation. A number of reports have been published on similar con-

versions of 3-oxy pregnanes and androstanes into their corresponding $\Delta_{1,4}$ derivatives using fermentations with fungi², actinomycetes³, and bacteria⁴.

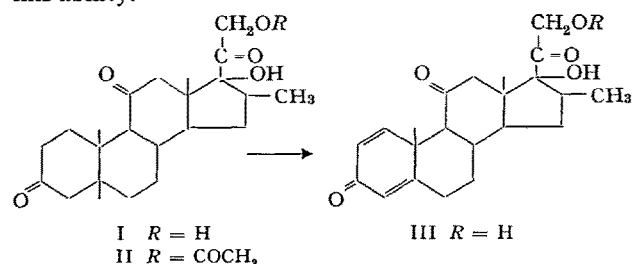
¹ G. G. NATHANSOHN, G. WINTERS, and E. TESTA, *Exper.* 17, 448 (1961).

² E. VISCHER and A. WETTSTEIN, *Exper.* 9, 371 (1953).

³ T. H. STOUT, W. J. MC ALEER, M. A. KOZLOWSKI, and V. MARLATT, *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 280 (1958).

⁴ H. R. LEVY and P. TALALAY, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 2658 (1957).

In the following paper we wish to report the conversion of 16 β -methyl-5 α -dehydrocortisone (I) to 16 β -methylprednisone (III) by a strain of *Corynebacterium simplex* (ATCC 6946) which was previously unknown to possess this ability.



With this strain the introduction of the two double bonds into the saturated A ring of the steroid molecule proceeded fairly rapidly. In some cases the Δ_1 compound was found as a side product and there were some indications that it might be considered as an intermediate step to the $\Delta^{1,4}$ dehydrogenation, since it always appeared during the earlier hours of the transformation. If the saturated steroid was added as 21-acetate (II), the acetate group was hydrolyzed and the conversion product was isolated as the free alcohol.

The fermentation was carried out as follows: One slant culture of *Corynebacterium simplex* was used to inoculate a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of medium of the following composition: peptone 0.6%, casein 0.4%, yeast autolysate 0.3%, meat extract 0.15%, glucose 0.1%. After being incubated on a rotary shaker at 200 rpm and at a temperature of 28°C for 18 h, the content of one flask was used to inoculate a 10 l glass jar containing 4 l of medium of the following composition: Basamin⁵ 1.1%, KH_2PO_4 0.4%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8%. This mixture was incubated at 28°C for 14 h under constant agitation at 500 rpm and aeration at the rate of 1 v/v per minute. Following this growth period, 1.5 g of 16 β -methyl-5 α -dehydrocortisone were added in a solution of 30 ml of methanol. Agitation and aeration were continued at the same rate. After a conversion period of 20 h, the whole broth was extracted exhaustively with chloroform and the

extract concentrated under reduced pressure to a small volume. This solution, after having been treated with a small quantity of animal charcoal, was poured into petrol ether in order to precipitate the steroid compounds. This crude material was analyzed by means of thin layer chromatography using Silicagel G as adsorbent. The development was carried out ascendingly with ethylacetate as solvent. The steroidal compounds were visualized by spraying the plate with concentrated sulfuric acid and heating for 20 min to 100°C. Synthetic 16 β -methylprednisone was spotted as standard on the same plate. Transformation product and standard had the same R_f value. In addition traces of the Δ_1 compound could be detected. Two methods were used for purification of the crude product: double crystallization from ethanol-water and ethyl acetate; acetylation of the $\Delta^{1,4}$ alcohol with acetic anhydride in pyridine and subsequent crystallization of $\Delta^{1,4}$ -21-acetate from ethylacetate. The purity of the crystalline transformation product was established by ultraviolet absorption and optical rotation i.e. 16 β -methylprednisone λ_{max} 238 m μ , $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 416$ (methanol), $[\alpha]_D + 198.4^\circ$ (Dioxane), m.p. 200–205°; 16 β -methylprednisone-21-acetate λ_{max} 238 m μ , $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 359$ (methanol), $[\alpha]_D + 207.9^\circ$ (Dioxane), m.p. 226–229°. In both cases the infrared spectra are identical with those of authentic samples. The yields of this transformation were in the order of 46%.

Zusammenfassung. Über die mikrobiologische Umwandlung des 16 β -Methyl-5 α -Dehydrocortisons in 16 β -Methylprednisone durch einen Stamm von *Corynebacterium simplex* wird berichtet. Mit Hilfe dieser Bakterienkulturen ist es möglich, in relativ kurzer Zeit die beiden Doppelbindungen in den Stellungen 1 und 4 im A-Ring des 16 β -Methylprednisone einzuführen.

D. KLUEPFEL and C. CORONELLI

Research Laboratories of Lepetit S.p.A., Milano (Italy), May 23, 1962.

⁵ Anheuser-Busch, St. Louis, Mo., U.S.A.

Fermenthistochemische Untersuchungen am Übergangsepithel verschiedener Säugetiere¹

Das Übergangsepithel (ÜE) der ableitenden Harnwege – durch seine Fähigkeit zur heterotopen Ossifikation erneut im Blickfeld des Interesses – besitzt eine hohe Bedeutung für den Schutz der umgebenden Gewebe gegenüber den Einwirkungen des Harns. Dieser Schutzfunktion dienen der reiche Glykogengehalt^{2–11}, die Sekretion von Harnmukoiden^{3–5, 11–15} und eine bedeutende Fermentausstattung, über die hier berichtet werden soll.

Die hohe Aktivität der unspezifischen alkalischen Phosphatase ist am längsten bekannt¹⁶. Das Vorkommen der unspezifischen Esterase konnte nur bei manchen *Species* nachgewiesen werden¹⁷ und wurde auch unter experimentellen Bedingungen bestimmt¹⁸.

Wir untersuchten an nativen, kryostatgeschnittenen Harnblasen (10 bis 14 μ) von Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Affe (*Macaca irus*) partiell die Aktivität von 9 Enzymen im ÜE (Tabelle). Die Natur des positiven oder negativen Reaktionsausfalles wurde durch histo-

- ¹ Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.
- ² W. SCHULTHEIS, Diss. Göttingen (1933).
- ³ J. P. GAUER, Mitt. naturf. Ges. Bern, N.F. 6, 85 (1949).
- ⁴ KLARA GÖLDI, Z. mikrosk. anat. Forsch. 58, 256 (1952).
- ⁵ T. J. MENDE und E. L. CHAMBERS, J. Histochem. Cytochem. 5, 99 (1957).
- ⁶ F. R. JOHNSON und R. M. H. McMINN, Biol. Rev. 35, 364 (1960).
- ⁷ J. K. CHOI, Anat. Rec. 139, 214 (1961).
- ⁸ L. I. FALIN, Acta Anat. 46, 244 (1961).
- ⁹ A. J. FRIEDENSTEIN, Acta Anat. 45, 31 (1961).
- ¹⁰ A. J. FRIEDENSTEIN, Arch. Anat. Histol. Embriol. 38, 61 (1960) (Russ. mit engl. Zusammenfassung).
- ¹¹ H. AMON und G. PETRY, 58. Vers. Anat. Ges., Genua (1962), im Druck.
- ¹² A. S. DOGIEL, Arch. mikr. Anat. 35, 389 (1890).
- ¹³ A. LENDORF, Anat. Hefte 17, 55 (1901).
- ¹⁴ V. v. EBNER, in A. KOELLIKER, Handbuch der Gewebelehre des Menschen, 3. Bd. (W. Engelmann, Leipzig 1902).
- ¹⁵ V. PRETO PARVIS und U. LUCARELLI, Arch. Ital. Anat. Embriol. 60, 1 (1955).
- ¹⁶ G. GOMORI, J. Cell comp. Physiol. 17, 71 (1941).
- ¹⁷ M. M. NACHLAS und A. M. SELIGMAN, Anat. Rec. 105, 677 (1949).
- ¹⁸ Z. VACEK und O. SCHÜCK, Anat. Rec. 136, 87 (1960).