

Der Weg vom Cholesterin zum Follikelhormon Oestradiol

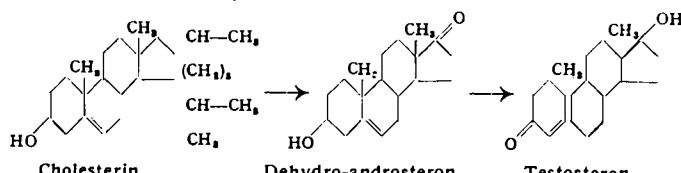
Von Prof. Dr. H. H. INHOFFEN, Braunschweig

1. Einleitung
2. Konstitution und Reaktionen verwandter Verbindungen
3. Darstellung im Ring A 2-fach ungesättigter 3-Ketone
4. Versuche zur Aromatisierung des Dienons

5. Darstellung des Oestradiols
6. Entwicklung des technischen Verfahrens
7. Entstehung des Oestradiols in vivo

Einleitung

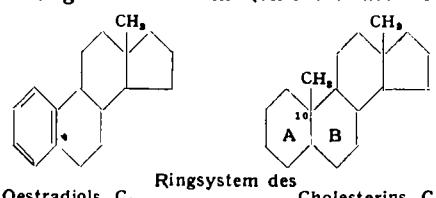
Nachdem die Reindarstellung und die Konstitutionsaufklärung der Sexualhormone vor etwa 10 Jahren erfolgreich abgeschlossen worden war, konnte man an Versuche herangehen, diese so wichtigen Wirkstoffe künstlich zu gewinnen. Zwei Wege standen hierfür prinzipiell zur Verfügung. Einmal die Totalsynthese aus einfachen Bausteinen und zweitens der Abbau strukturell verwandter Naturstoffe. Bisher ist es noch nicht gelungen, die Synthese der Hormone Testosteron und Progesteron durchzuführen, und man muß diese Aufgabe auch weiterhin als ungewöhnlich schwierig bezeichnen. Dagegen konnte ein Naturstoff, der zwar selbst kein Hormon ist, aber dem Follikelhormon sehr nahe steht, nämlich das Equilenin, in einer klassischen Arbeit von Bachmann künstlich aufgebaut werden. Das Testikelhormon Testosteron sowie das Corpus luteum Hormon Progesteron wurden in schönen Arbeiten von Butenandt und seiner Schule sowie den Schweizer Arbeitskreisen von Ruzicka und Miescher aus dem konstitutionell nahe verwandten Cholesterin durch Ab- und Umbau dargestellt, wobei als Hauptzwischenprodukt Dehydro-androsteron auftritt.



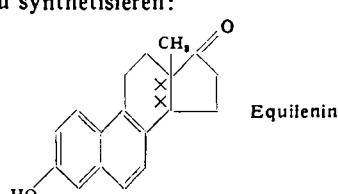
Das Follikelhormon Oestradiol nimmt insofern eine Mittelstellung ein, als es infolge seiner strukturellen Besonderheit fast ebenso schwierig aus geeigneten Naturstoffen durch Abbau wie aus einfachen Verbindungen durch Aufbau zu gewinnen schien. Während somit eine Totalsynthese auch des Oestradiols bisher noch nicht mit eindeutigem Ergebnis durchgeführt werden konnte, ist es andererseits gelungen, eine Umwandlung des Cholesterins in das Follikelhormon zu bewerkstelligen¹⁾.

Konstitution und Reaktionen verwandter Verbindungen

Die besondere Schwierigkeit dieser Umwandlung von Cholesterin in Oestradiol lag im wesentlichen in dem Umstand begründet, daß das Follikelhormon einen aromatischen Ring besitzt, während die übrigen bekannten Sterine und Steroidhormone rein hydroaromatischer Natur sind. Hiermit hängt es zusammen, daß das Ringsystem der sogenannten Oestran-Verbindungen nur 18 Kohlenstoffatome aufweist, im Gegensatz zu den 19 C-Atomen des Ringsystems der übrigen Steroide (ohne eine kohlenstoffhaltige Seitenkette am C₁₂). Und zwar fehlt den Vertretern der Follikelhormonreihe die anguläre Methylgruppe, die normaler Weise zwischen den Ringen A und B am Kohlenstoffatom 10 haftet.



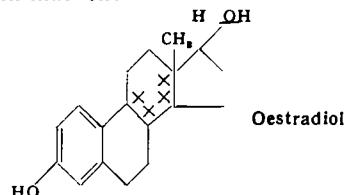
Wenn es, wie schon erwähnt, gelingen könnte, das Naphtol-Derivat Equilenin zu synthetisieren:



so deshalb, weil nur 2 asymmetrische C-Atome (X) zur Bildung von nur 4 Isomeren Anlaß geben, während beim Phenol-Derivat

¹⁾ H. H. Inhoffen u. G. Zühsdorff, Ber. dtsh. chem. Ges. 74, 1911 [1941].

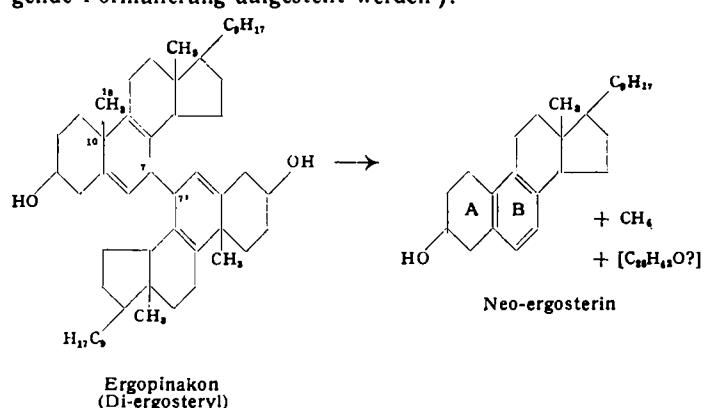
Oestradiol 4 Asymmetriezentren (ohne C₁₀) das Auftreten von 16 Isomeren möglich machen:



Jedoch dürfte dieses Ziel sicherlich noch erreicht werden.

Die anguläre C₁₀-Methyl-Gruppe des Cholesterins stellt somit das wesentlichste Hindernis eines Überganges der Ringe A und/oder B in den aromatischen Zustand dar. Ihre Entfernung war demzufolge das Hauptziel der „Aromatisierung von Sterinen“; wurde es erreicht, so war das Problem prinzipiell gelöst.

Zur Aufnahme dieser Arbeit wurde ich durch das eingehende Studium einer verwandten, eigenartigen Reaktion angeregt, deren Kenntnis spezielle Rückschlüsse auf das fragliche Problem zuließ. Es ist dies die Umwandlung des sogenannten Ergopinakons in das Neo-Ergosterin, eine Reaktion, die von Windaus und Borgeaud²⁾ entdeckt worden war. Im Verlauf dieses interessanten Überganges zwischen zwei Verbindungen wird dieselbe 10-Methyl-Gruppe schon bei 135° als Methan abgespalten, wobei in diesem Fall das im Ring B aromatische Neo-Ergosterin entsteht. Für den ungewöhnlichen Vorgang konnte schließlich folgende Formulierung aufgestellt werden³⁾:



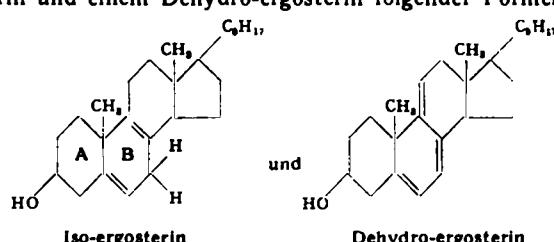
Das Ergopinakon, ein Di-ergosteryl, enthält wie man sieht im Ringsystem je zwei Doppelbindungen in gleicher „chinoider“ Lage zur Verknüpfungsstelle und den beiden einander entsprechenden 10-Methyl-Gruppen. Der thermische Zerfall (in Minuten bei 200°, in Stunden bei 135°) führt also zum Zerreissen der Dimol-Bindung unter Abspaltung von Methan, und zwar werden diejenigen Kohlenstoffbindungen gesprengt, die entsprechend der Schmidtschen Doppelbindungsregel gelockert sein sollen, nämlich C₇-C₇, und C₁₀-C₁₈.

Wie dieser Zerfall im Einzelnen vor sich geht, ist noch unklar, bei einer summenformelmäßigen Betrachtung läßt sich jedoch erkennen, daß die Bildung von Methan Wasserstoff erfordert, der der Gesamt molekül an irgendeiner Stelle entnommen werden muß. Man kann es als wahrscheinlich ansehen, daß der Zerfall des Pinakons „unsymmetrisch“ verläuft, d. h. nur eine Hälfte geht unter Methyl-Abspaltung in Neo-ergosterin über, während die andere Hälfte das nötige Wasserstoffatom spendet. Es muß hierbei indes offen bleiben, ob dieser Vorgang lediglich intramolekular stattfindet oder nicht auch intermolekular verlaufen kann. Für die erstere Annahme spricht allerdings der Befund, daß einerseits in dem erhaltenen Gas kein Äthan aufgefunden wurde, sowie andererseits nach den vorliegenden Versuchen die gemessene Methanmenge ziemlich genau 50% betrug (bezogen auf Ergopinakon). Man könnte noch daran denken, daß sich das Ergopinakon beim

²⁾ Liebigs Ann. Chem. 460, 235 [1928].

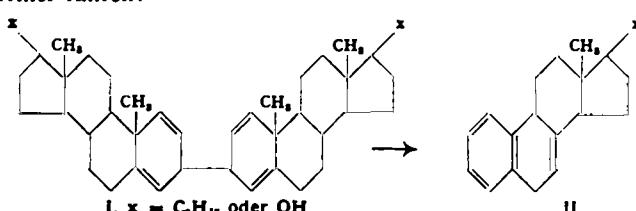
³⁾ H. H. Inhoffen, Naturwiss. 25, 125 [1937].

Erhitzen unter Zerreißen der Dimoi-Bindung und unter Wasserstoffverschiebung zunächst „disproportioniert“ zu einem Iso-*ergosterin* und einem Dehydro-*ergosterin* folgender Formeln:

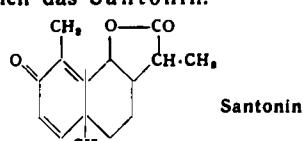


und daß erst sekundär das „chinol-artige“ Iso-ergosterin Methan abspaltet.

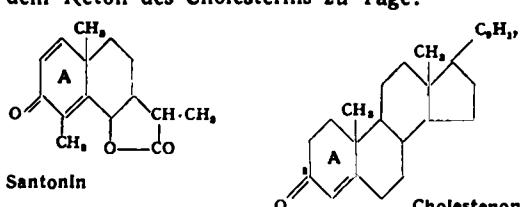
Wie dem auch sei, die vorstehend geschilderten Befunde und ihre Auslegung haben zu der Arbeitshypothese geführt, daß eine entsprechende Aromatisierung des Ringes A eintreten wird, wenn prinzipiell ähnliche strukturelle Verhältnisse im ersten Ring vorliegen. Da das Folikelhormon indessen am C-Atom 3 eine Hydroxyl-Gruppe besitzt, würde eine völlig analoge Verbindung zwangsläufig zur Bildung eines Desoxy-oestradiols (II) folgender Formel führen:



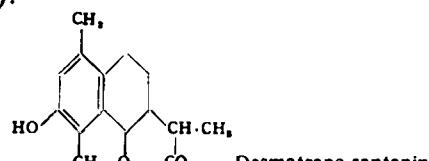
Es gibt nun eine Substanz, die sich in interessanter Weise für die experimentelle Ausrichtung des vorliegenden Problems heranziehen lässt, nämlich das Santonin.



Wenn man die vorstehende, übliche Schreibweise für das Santonin dahingehend ändert, daß man die Formel einfach auf den Kopf stellt, so tritt eine auffallende Ähnlichkeit der so geschriebenen Santonin-Moleköl hinsichtlich des ersten Ringes mit dem Cholestenon dem Keton des Cholesterins zu Tage:



Wir finden jeweils eine anguläre Methyl-Gruppe an der gleichen Ringverknüpfungsstelle, in p-Stellung (3) dazu eine Keto-Gruppe und 2 bzw. 1 Doppelbindung in Ring A. Das Santonin hat also 2 Doppelbindungen in einem ähnlichen Ringsystem in derselben Stellung zur Methyl-Gruppe wie das Ergopinakon, nur in diesem Falle im Ring A (vergl. I), also das was als erforderlich postuliert worden war. Es fehlt andererseits die Dimol-Bindung, wohingegen an der entsprechende Stelle (C₉) Sauerstoff vorhanden ist, der nach einer Aromatisierung die verlangte phenolische Hydroxyl-Gruppe abgeben würde. Das Santonin ist nun in der Tat einer interessanten Aromatisierungsreaktion fähig. Behandelt man es mit konzentrierter Salzsäure, so wandert die anguläre Methyl-Gruppe an das benachbarte Kohlenstoff-Atom und es kann nunmehr unter Umlagerung das aromatische Phenol Desmotropo-Santonin entstehen¹⁷⁾:



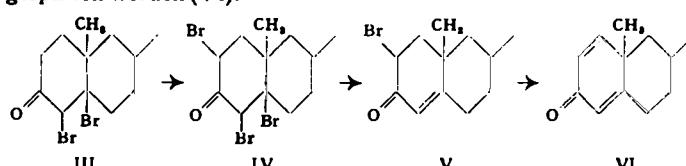
Es lag nahe zu prüfen, ob das Santonin, was bisher noch nicht versucht worden war beim Erhitzen anstelle der Methyl-Wande-

rung eine Methan-Abspaltung aufweisen würde. Das ist tatsächlich der Fall. Bei etwa 300° spaltet das Santonin beinahe erupptionsartig Methan ab und liefert hierbei phenolische Produkte in erheblicher Menge⁴⁾. Durch dieses Ergebnis schien die nunmehr einzuschlagende Richtung eindeutig festgelegt. Es waren die im Ring A 2-fach ungesättigten 3-Ketone von Steroiden darzustellen und diese nicht nur zu erhitzen, sondern nun in Analogie zur Bildung des Desmotropo-Santonins auch mit Mineralsäure zu behandeln.

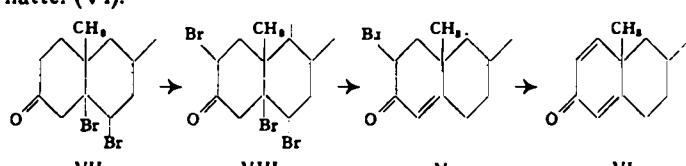
Dieser erste Teil des Problems, nämlich die Darstellung der im Ring A 2-fach ungesättigten 3-Ketone, hat zahlreiche, nicht vorherzusehende Schwierigkeiten bereitet und einen erheblichen Teil der Gesamtarbeitszeit verschlungen. Ich möchte an dieser Stelle einmal alle Reaktionen schildern, die durchschritten wurden und geklärt werden mußten.

Darstellung im Ring A 2-fach ungesättigter 3-Ketone

Naheliegend und aussichtsreich schien es, an die 4,5-Doppelbindung des Choistenonos (s.d.) Brom zu addieren (III) und hier-nach ein weiteres Bromatom durch Substitution am Kohlenstoff-atom 3 einzuführen (IV). Nach vorsichtiger Herausnahme der benachbarten Bromatome (Natriumjodid in Alkohol) unter Rück-bildung der 4,5-Doppelbindung (V) sollte das 2-Brom als Halogen-wasserstoff unter Bildung der wichtigen $\Delta^{1,2}$ -Doppelbindung ab-gespalten werden (VI).

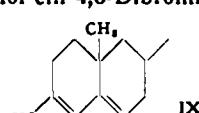


Prinzipiell die gleiche Reaktionsfolge könnte sich auch beim Cholesterin selbst durchführen lassen. Nach Brom-Addition an die 5,6-Doppelbindung und nachträglicher Oxydation der sekundären Hydroxyl-Gruppe zum Carbonyl (VII) sollte wiederum in 2-Stellung bromsubstituiert werden(VIII). Die 5,6-Bromatome würden sich in bekannter Weise unter Rückbildung der Doppelbindung und gleichzeitiger Verlagerung nach 4,5 unter dem Einfluß der Keto-Gruppe wieder herausnehmen lassen (V), wonach abschließend die Darstellung der $\Delta^{1,2}$ -Doppelbindung zu erfolgen hätte (VI).

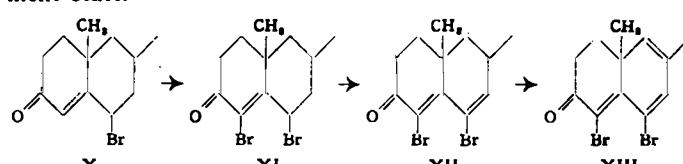


VII VIII V VI
Diese so einfach scheinenden Reaktionsfolgen haben sich nicht verwirklichen lassen. Die Reaktionen verliefen grundsätzlich anders und machten die Aufklärung des abnormalen Verlaufs notwendig.

Grundsätzlich lässt sich an die Doppelbindung des Cholesterins kein Brom addieren, unter neutralen Bedingungen ist Cholestenon gegen Brom weitgehend beständig. Erst in Gegenwart von Bromwasserstoffsäure tritt Reaktion ein, aber es findet lediglich Substitution statt. Mit 1 Mol entsteht ein Cholestenon-6-bromid (X) mit 2 Mol ein 4,6-Dibromid (XI), wobei die Enol-



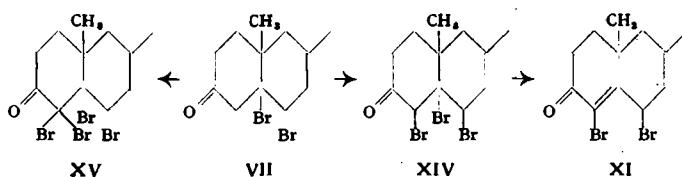
form (IX) und Allyl-Umlagerungen eine entscheidende Rolle spielen⁵). Mehr Brom erzeugt lediglich weitere Doppelbindungen im Ring B (XII, XIII), eine Substitution am C₃ findet überhaupt nicht statt.



⁴⁾ H. H. Inhoffen, diese Ztschr. 63, 473 [1940].

¹⁾ H. H. Inhoffen, diese Ztschr. 83, 473 [1940].
²⁾ H. H. Inhoffen, Ber. dtsch. chem. Ges. 69, 1134, 1702, 2141 [1936].

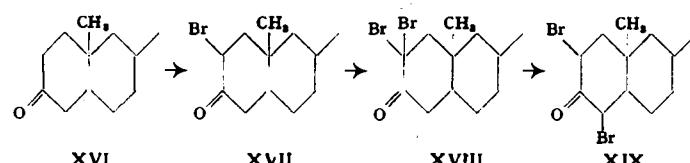
Beim gesättigten 5,6-Dibrom-keton aus Cholesterin (VII) lassen sich noch 1 und 2 Bromatome einführen, beide gehen aber in die 4-Stellung^a) (XIV, XV). Die Einführung eines 5. Broms, das jetzt zwangsläufig in die 2-Stellung gehen müßte, ist nunmehr uninteressant, da die mit so viel Brom beladene Molekel (XV) kein geeignetes Ausgangsmaterial für unseren Zweck mehr abgibt.



Behandelt man das 4,5,6-Tribromid (XIV) vorsichtig mit 1 Mol Kaliumacetat, so kann man das 5-Brom selektiv unter Bildung der 4,5-Doppel-Bindung herausnehmen. Dabei entsteht das gleiche 4,6-Dibrom-cholestanon (XI), welches wie vorstehend geschildert auch direkt durch Bromierung von Cholestanon erhalten wurde. Dieser Befund hat die verhältnismäßig rasche Aufklärung des Verlaufs der Cholestanon-Bromierung ermöglicht (Brom in 6-Stellung^b).

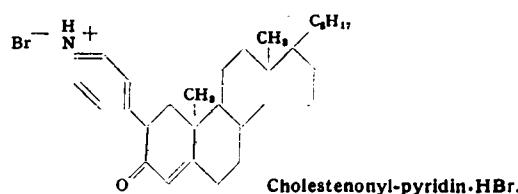
Nach diesen Mißerfolgen habe ich mich den Bromierungsprodukten des Cholestanons, des gesättigten Cholesterin-ketons zugewandt, hier lagen bereits 2 isomere Dibromide vor^c). Während für das isomere Koprostanon von Butenandt bewiesen werden konnte, daß die erste und zweite Bromierung gleichfalls in der 4-Stellung stattfindet, war für das Cholestanon-monobromid (XVII) die 2-Stellung des Broms bereits sichergestellt worden. Man durfte daher auch als wahrscheinlich annehmen, daß eines der beiden Cholestanon-dibromide das gesuchte 2,4-Derivat sein würde.

Die nähere Untersuchung der Reaktionen ergab folgende Resultate^d). Führt man die Bromierung gesättigter 3-Ketone vom Steroiden (XVI) mit trans-Verknüpfung der Ringe A und B (Cholestan-Reihe) unter bestimmten Bedingungen durch (Zimmer-temperatur und darunter, sofortiges Auflösen der Reaktionslösung nach der Bromierung, gegebenenfalls Abstumpfung der bei der Reaktion entstehenden Bromwasserstoffsäure mittels Kaliumacetats), so gelingt es, die 2,2-Dibromketone (XVIII) in reiner Form zu fassen^e). Von den beiden vorerwähnten isomeren Dibrom-cholestanonen ist das niedriger schmelzende ($F_p = 140^\circ$) das 2,2-Dibromid. Diese 2,2-Dibromide sind jedoch relativ unbeständig und lagern sich in Eisessig-Lösung glatt unter dem Einfluß der Bromwasserstoffsäure (also unter den normalen Bedingungen der Reaktion) in die 2,4-Dibromide um (XIX):



Das meistens direkt entstehende bzw. durch Umlagerung des 2,2-Isomeren erhaltene, oberhalb 190° schmelzende Dibrom-cholestanon war somit die lange gesuchte und einzig geeignete scheinende Brom-Verbindung.

Die Gewinnung des Dien-ketons hieraus (VI) stieß aber zunächst wiederum auf erhebliche und nicht erwartete Schwierigkeiten. Bei dem Versuch der Bromwasserstoff-Abspaltung mittels Pyridins wurde zunächst als erstes faßbares Reaktionsprodukt ein stickstoff- und halogen-haltiges Kondensationsprodukt gefaßt^f) für das folgende Konstitutionsformel aufgestellt werden konnte^g):



Der Versuch der thermischen Abspaltung des Pyridin-Restes

^a) Dorée, J. chem. Soc. [London] 95, 648 [1909].

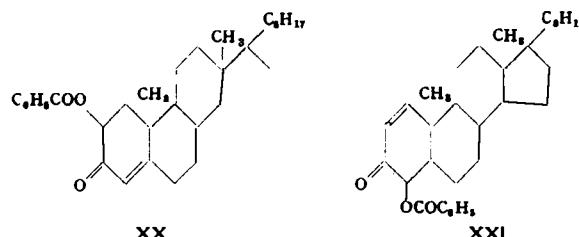
^b) H. H. Inhoffen u. G. Zühlsdorff, Ber. dtsh. chem. Ges. 76, 233 [1943].

^c) H. H. Inhoffen u. Huang-Minton, Ber. dtsh. chem. Ges. 71, 1720 [1938].

^d) H. H. Inhoffen, G. Zühlsdorff u. Huang-Minton, Ber. dtsh. chem. Ges. 73, 451 [1940].

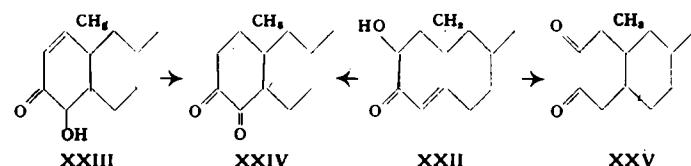
ergab ein öliges Produkt, aus dem seinerzeit das noch unbekannte Dien-keton nicht in reiner Form isoliert werden konnte, obwohl Pyridiniumbromid als zweite Komponente der Spaltung glatt erhalten wurde.

Hierauf wurde versucht, die Doppelbindungen in das Dibromid durch Kochen mit Kaliumbenzoat in Butanol-Toluollösung hinzulegen^h). Aber auch in diesem Falle verlief die Reaktion anders. Es entstanden zwar bromfreie und gut kristallisierende Produkte, die sich indessen als die Benzoatesäureester einfach ungesättigter Oxy-ketone erwiesen (XX, XXI):



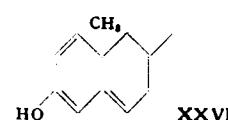
Auch hier ließ sich eine thermische Zersetzung herbeiführen und lieferte im Destillat Benzoësäure, aber es erwies sich wiederum als sehr schwierig, aus dem erhaltenen Öl die vorhandenen geringen Mengen Dien-keton rein zu isolieren.

Die fernerhin erstrebenswerten, einfach ungesättigten Oxy-Ketone (XXII, XXIII) (Wasserabspaltung) verschwanden sozusagen direkt unter den Händen, indem sie sich bei der alkalischen Verseifung der Benzoate unmittelbar zu gesättigten Diketonen umlageren (XXIV, XXV):



Der Pfeil von XXIII nach XXIV zeigt die teilweise Bildung des 3,4-Diketons aus XXII durch Wanderung der Hydroxyl-Gruppe an. Auch dieser Befund läßt erkennen, wie ungewöhnlich ausgeprägt die Neigung von Substituenten der 2-Stellung zum Sprung in die 4-Stellung istⁱ) (vergl. auch weiter unten).

In diesem hoffnungslos scheinendem Stadium hatten sich inzwischen aus den Mutterlaugen der bei der Pyridin-Behandlung von Dibrom-cholestanon angefallenen ölichen Mutterlaugen Kristalle abgeschieden, die kleinen Stickstoff enthielten und fast halogen-frei waren. Die bei 110° schmelzende, bei 80° getrocknete Substanz gab jedoch keine brauchbaren Analysenwerte und lieferte außerdem in Methanol kein Semicarbazone, so daß auch dieser Versuch endgültig in einer Sackgasse zu enden schien. Schließlich brachte mich aber die Vorstellung, daß das Dienon auch im Kristall teilweise oder sogar ganz als Trienol (XXVI) vorliegen könnte, dazu, die Analyse nach Trocknen in der Nähe des Schmelz-



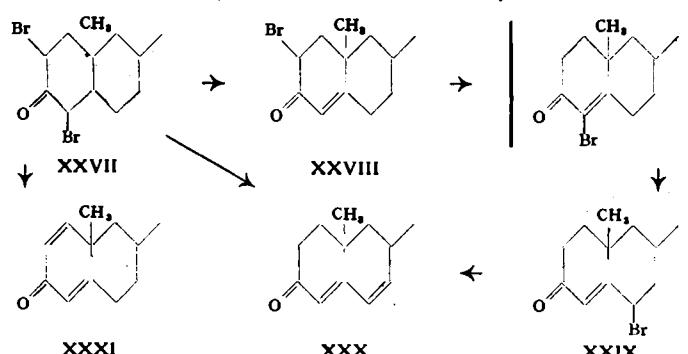
punktes (100 %) zu wiederholen, denn Sterine mit freier Hydroxyl-Gruppe halten meist hartnäckig Kristallösungsmittel fest, während die entsprechenden Ketone dies im allgemeinen nicht tun. Jetzt stimmten die Analysen eindeutig auf ein Dienon und die Wiederholung der Semicarbazone-Darstellung, diesmal in Äthanol, lieferte das gewünschte Derivat ebenfalls in glatter Reaktion. Wir hatten also ohne Zweifel ein Cholestadienon in Händen. Trotzdem waren wir mißtrauisch und sicherten erst die Konstitution durch genaue Ermittlung der Doppelbindungslage bevor mit dem Stoff weiter gearbeitet wurde^j).

Daß diese Vorsicht angebracht war, zeigt folgender Befund. Bei der späteren Gewinnung der Dien-ketone der Cholestan- und Androstan-Reihe nach der Butenandtschen Methode mittels Collidins erhielten wir neben dem $\Delta^{1,2;4,5}$ -Dien (XXXI) als Hauptprodukt in kleiner, jedoch eindeutig isolierbarer Menge das

^{j)} H. H. Inhoffen, Ber. dtsh. chem. Ges. 70, 1695 [1937].

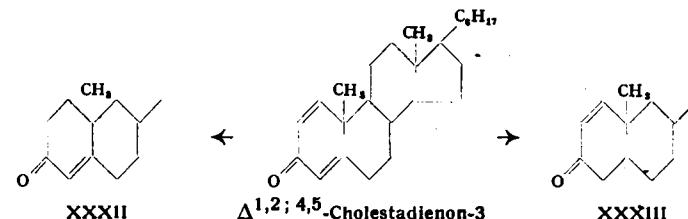
^{k)} H. H. Inhoffen u. Huang-Minton, Ber. dtsh. chem. Ges. 72, 1686 [1939].

$\Delta^{4,5;6,7}$ -Dien (XXX), welches sich aus dem 2,4-Dibrom-keton (XXVII) über folgende Zwischenstufen bildete¹⁴⁾:

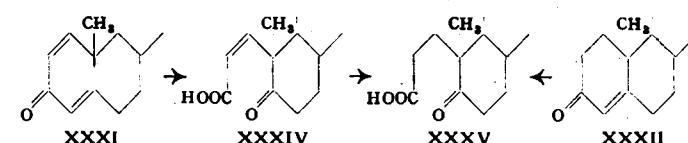


Eine systematische Zerlegung der Gesamtreaktion XXVII bis XXX in die Hauptzwischenstufen XXVII bis XXVIII, XXVIII bis XXIX, XXIX bis XXX konnte durchgeführt werden. Man sieht an diesem Beispiel, wie vorsichtig man bei der Deutung selbst einer so einfach scheinenden Reaktion wie der Abspaltung von 2 Mol Bromwasserstoff unter Umständen sein muß.

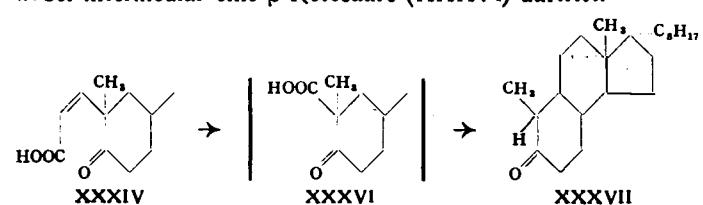
Zur Konstitutionsaufklärung unseres Dienons haben wir die katalytische Hydrierung und den Ozonabbau herangezogen¹⁵⁾. Bei der totalen Hydrierung erhielten wir erwartungsgemäß Koprostanon, bei der partiellen Hydrierung ein schwierig trennbares Gemisch, aus dem die 1-fach ungesättigten Ketone, das $\Delta^{4,5}$ -Cholestenon (XXXII) und das noch unbekannte $\Delta^{1,8}$ -Koprostenon (XXXIII) jedoch isoliert werden konnten.



Auch der Ozonabbau ließ sich sukzessive durchführen. Die Aufspaltung nur einer Doppelbindung führte zur einfach ungesättigten Ketosäure (XXXIV), die sich zur gesättigten, auch aus Cholestenon darstellbaren Ketosäure (XXXV) hydrieren ließ:

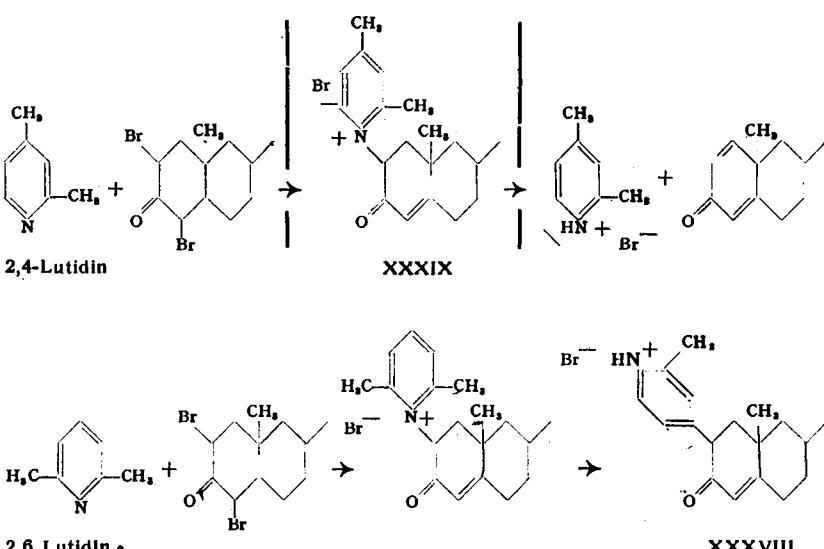


Die vollständige Ozonisierung ergab schließlich glatt das neutrale Keton (XXXVII) unter völliger Abspaltung des Ringes A, wobei intermedial eine β -Ketosäure (XXXVI) auftritt.



Die Konstitution unserer Verbindung aus 2,4-Dibrom-cholestanon war damit eindeutig als die des lange gesuchten $\Delta^{4,5;6,7}$ -Cholestadienons-3 (XXXI) sichergestellt. Für eine verbesserte Darstellung dieses Dienos kam uns, wie schon erwähnt, eine Mitteilung von Butenandt und Mitarbeitern¹⁶⁾ zu Hilfe, die besagte, daß die erforderliche Bromwasserstoff Abspaltung in guter Ausbeute mit Collidin anstelle von Pyridin durchführbar ist. Beim näheren Studium dieser Reaktion fanden wir, daß nicht der höhere Siedepunkt des Collidins für diesen Effekt verantwortlich zu machen ist, sondern ausschließlich die 4-ständige Methyl-Gruppe. Es war uns nämlich aufgefallen, daß mit Collidin keine stickstoffhaltigen Kondensationsstoffe entstehen wie dies beim Pyridin der Fall ist. Bei der systematischen Durchprüfung anderer Methylpyridine fanden wir, daß Collidin durch 2,4-Lutidin ersetztbar ist, wobei auch in diesem Fall keine Pyridinium-Verbindungen ge-

bildet werden. Dagegen reagiert das isomere, fast gleich hoch siedende 2,6-Dimethylpyridin wieder unter Bildung von Pyridin-Verbindungen (XXXVII') und liefert entsprechend schlechte Ausbeuten an 2-fach ungesättigtem Keton. Demzufolge formulieren wir auch die Pyridinium-Verbindungen als p-Substitutionsprodukte des Pyridins und nehmen an, daß die labilen Zwischenstufen mit Steroid-Verknüpfung zum Stickstoff (XXXIX) infolge Bestrebens zur Umlagerung in die p-Derivate bei Besetzung der p-Stellung in ungesättigtes Keton und Pyridiniumsalz zerfallen¹⁷⁾.

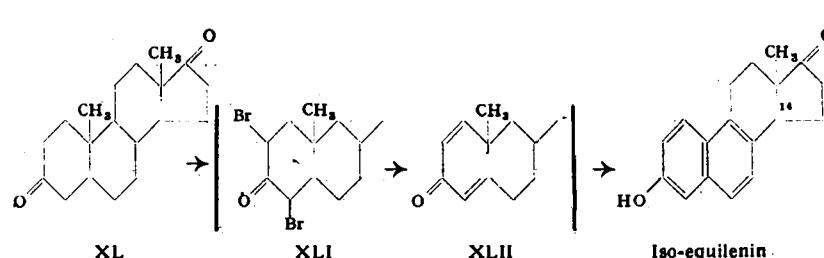


Versuche zur Aromatisierung des Dienons

Ein erster Aromatisierungsversuch mit dem $\Delta^{1,8;4,5}$ -Cholestadienon-3 verlief äußerst entmutigend. Methan spaltete sich auch bei 350 ° nur sehr wenig und sehr langsam ab. Des weiteren konnten mit wäßrigem Alkali aus dem öligem Erhitzungsprodukt keine phenolischen Anteile herausgeholt werden, so daß zu befürchten stand, daß der Moleköl schließlich doch noch ein unvergesehener grundsätzlicher Fehler anhaftete.

Daraufhin wurde die ganze Reaktionsfolge in die Androstan-Reihe übertragen, wobei ich mich von der in der Sterinchemie häufig gemachten Erfahrung leiten ließ, daß die Änderung der Struktur einer Verbindung an einer vom Reaktionsort weit entfernten Stelle zuweilen bedeutsame und überraschende Einflüsse am gewünschten Reaktionsort mit sich bringen kann.

Eine Vorstudie am Androstrandion-3,17 (XL) führte über die uneinheitlichen Zwischenstufen des rohen 2,4-Dibrom-androstandions-3,17 (XL I) und des entsprechenden $\Delta^{1,8;4,5}$ -Androstadienions-3,17 (XL II) durch Erhitzen dieses Dien-Diketons auf 300 ° unter glatter Methan-Abspaltung zu einem Phenol C₁₈H₁₆O₂, das ich als Iso-equilenin angesprochen habe^{18,19,20)}:



Es hat also außer der Methan-Abspaltung noch eine weitere Dehydrierung zum Naphtol-Derivat sowie eine Isomerisierung an C₁₄ stattgefunden (beides wahrscheinlich unter dem Einfluß von restlichem, in vorliegendem Falle schwer entfernbarem Brom). Jmmerhin hatte dieser Versuch eine glatte Methan-Abspaltung unter Bildung alkalilöslicher Phenole ergeben.

Wir sind daraufhin nochmals zu unserem Cholestadienon zurückgekehrt, haben aber diesmal versucht, die Methyl-Gruppe zur Wanderung zu bewegen, also die dem Übergang von Santonin

¹⁴⁾ H. H. Inhoffen, G. Zahlsdorff u. Huang-Minlon, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 451 [1940].

¹⁵⁾ H. H. Inhoffen, Naturwiss. 25, 125 [1937].

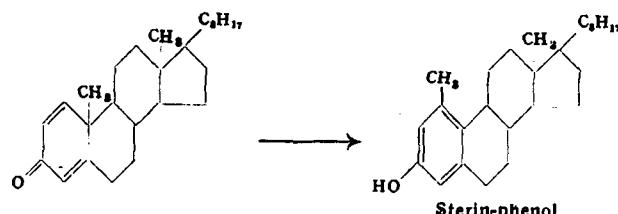
¹⁶⁾ H. H. Inhoffen, diese Ztschr. 63, 474 [1940].

¹⁷⁾ Hirschmann u. Wintersteiner, J. biol. Chemistry 126, 737 [1938].

¹⁸⁾ H. H. Inhoffen u. G. Zahlsdorff, Ber. dtsch. chem. Ges. 76, 233 [1943].

¹⁹⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 1617 [1939].

in Deamotropo-santonin¹⁷⁾ analoge Reaktion zu erzwingen. Dies gelang in der Tat durch Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid, einer speziellen Versuchsbedingung, die gerade von Windaus und Kühr¹⁸⁾ zur Darstellung von Sulfosäuren von 1-fach ungesättigten Keto-steroiden angegeben worden war. Bei den im Ring A 2-fach ungesättigten Keto-steroiden entstehen also keine Sulfosäuren, sondern es findet ausschließlich Aromatisierung unter Methyl-Wanderung statt. Das als Sterin-phenol bezeichnete Reaktionsprodukt wird in vorzüglicher Ausbeute erhalten¹⁹⁾:



Das Phenol gab mit Dimethylsulfat und Alkali einen Methylether und kuppierte mit diazotiertem Anilin zu schönen Azo-Farbstoffen. Überraschend war wiederum zunächst sein Verhalten gegen Alkali, es ließ sich aus seiner ätherischen Lösung mittels Alkali nicht in die wässrige Phase überführen. Für ein derartiges Verhalten gibt es jedoch Beispiele in Gestalt der sogenannten Kryptophenole, deren Phenol-Charakter in dieser Hinsicht gleichfalls nicht ohne weiteres erkennbar ist.

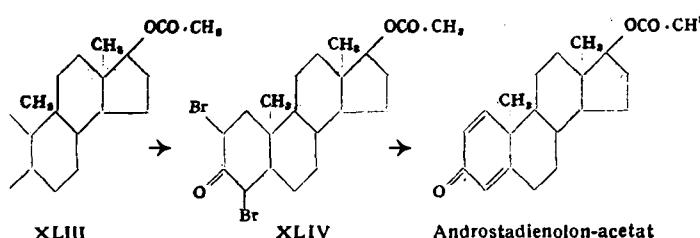
Daraufhin durchsuchten wir nochmals das ölige Erhitzungsprodukt aus Cholestadienon und stießen nunmehr auf das gleiche Sterinphenol¹⁹⁾, woraus die nicht angenehme Schlußfolgerung gezogen werden mußte, daß in der Sterinreihe sich die Methyl-Gruppe auch beim Erhitzen zu einem Teil der Abspaltung durch Wanderung an das benachbarte Kohlenstoffatom entzieht. Und in der 17-Keto-androstan-Reihe schien die Reaktion weit über das Ziel hinauszugehen.

Die theoretische Betrachtung der Reaktion hatte ferner zu dem Ergebnis geführt, daß im Falle einer ausschließlich monomolekularen Methan-Abspaltung durch die Mitnahme von Wasserstoff eine vierte, zusätzliche Doppelbindung entstehen müßte. Es mußte also zumindest teilweise auch mit einem equilin-ähnlichen Erhitzungsprodukt gerechnet werden, dessen Hydrierung zu Oestradiol in Anbetracht der bereits vorliegenden Erfahrungen als äußerst fraglich anzusehen war.

Mit diesen nicht gerade ermutigenden Aussichten gingen wir an die letzte Versuchsserie.

Darstellung des Oestradiols

Ausgehend vom Acetat des Androstanol-17-on-3 (XLIII)-ließ sich die 2,4-Bromierung in diesem Falle glatt und übersichtlich infolge Fehlens eines konkurrierenden 17-Carbonyls durchführen. Und die Collidin-Behandlung des 2,4-Dibrom-androstanol-acetats (XLIV) lieferte in ebenso glatter Reaktion das schön kristallisierende, einheitliche $\Delta^{1,3;4,5}$ -Androstanol-17-on-3-acetat. Dieser auch als Dehydro-testosteron zu bezeichnende Stoff erwies sich im Hahnenkammtest als sehr stark wirksam.



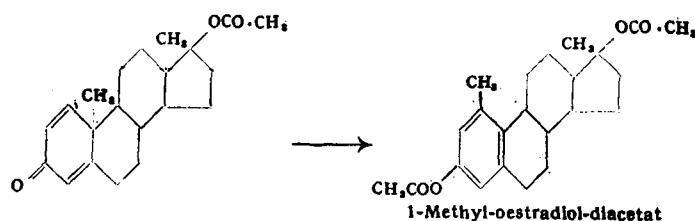
Mit diesem Androstanolone-acetat haben wir zunächst die Methyl-Wanderung durchgeführt, in der Hoffnung, daß sich das 1-Methyl-Derivat möglicherweise als fast ebenso wirksam erweisen würde wie das Oestradiol und somit ein eventueller Fehlschlag hinsichtlich der Methan-Abspaltung von vornherein etwas gemildert werden könnte. Die Methyl-Wanderung ließ sich unter

¹⁷⁾ A. Andreocci, Gazz. chim. ital. 23, 496 [1893]; G. R. Clemo, R. D. Haworth u. E. Walton, J. chem. Soc. [London] 1930, 1110, 2579.

¹⁸⁾ Liebigs Ann. Chem. A. 532, 52 [1937].

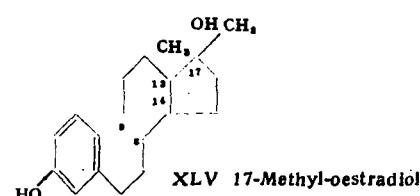
¹⁹⁾ H. H. Inhoffen u. Huang-Minlon, Naturwiss. 26, 756 [1938]; H. H. Inhoffen u. G. Zählsdorff, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 604, [1941].

den bereits erprobten Bedingungen mit konzentrierter Schwefelsäure und Acetanhydrid auch glatt bewerkstelligen²⁰⁾.



Das nach Verseifung der Acetyl-Gruppen erhaltene 1-Methyl-oestradiol konnte leicht durch Darstellung von Methyläther und Azofarbstoffen als Phenol charakterisiert werden. Auch das Ultraviolet-Absorptionsspektrum deckte sich vollkommen mit dem des Oestradiols. Wiederum wurde auch hier eine fast völlige Indifferenz gegenüber starken, wäßrigen Alkalilaugen festgestellt. Eine große Überraschung bildete dann schließlich die physiologische Prüfung des 1-Methyl-oestradiols. Während das Follikelhormon an der kastrierten Ratte mit 0,1 γ die Brunstreaktion auszulösen vermag, erwies sich das 1-Methyl-Derivat noch mit 1 mg, also bei 10000facher Überdosierung, als völlig unwirksam.

Diese physiologische Unwirksamkeit hängt wohl ohne Zweifel mit der Unlöslichkeit in Alkali zusammen, und dieses ist augenscheinlich eine Folgeerscheinung der 1-ständigen Methyl-Gruppe. Wenn man bedenkt, daß die Einführung einer Methyl-Gruppe in die 17-Stellung (XLV) keinen Verlust an physiologischer Wirksamkeit mit sich bringt, so unterstreicht diese Tatsache nochmals den bemerkenswerten und nicht ohne weiteres erklärbaren Einfluß, den die 1-ständige Methyl-Gruppe auf die Eigenschaften der Grundmolekel ausübt.



Nunmehr gingen wir – nach 5-jährigem Anmarsch – an den letzten Versuch, nämlich die thermische Umwandlung des Androstanolons. Wurde diese Substanz im Einschlußrohr wenige Minuten auf 320 ° erhitzt, so konnten wir bei der Aufarbeitung über 50% phenolische Anteile erhalten, aus denen sich nach Hochvacuumdestillation über die Digitonin-Additionsverbindung kristallisiertes Oestradiol in reiner Form gewinnen ließ. Das so erhaltene Produkt erwies sich in allen seinen Eigenschaften, sowohl den chemischen, den physikalischen als auch den physiologischen, als völlig identisch mit dem natürlichen Follikelhormon Oestradiol.

Mit der Überführung von Cholesterin in Oestradiol wurde gleichzeitig noch die bereits wahrscheinliche Annahme gestützt, daß das Follikelhormon bezüglich der asymmetrischen C-Atome 8, 9, 13 und 14 sterisch den gleichen Bau besitzt wie das Cholesterin. Damit war das Problem zwar für die Wissenschaft gelöst, aber die Technik zeigte sich in keiner Weise zufrieden gestellt, denn die Ausbeute war derart geringfügig, daß an eine Verwertung des Verfahrens zunächst überhaupt nicht gedacht werden konnte.

Entwicklung des technischen Verfahrens

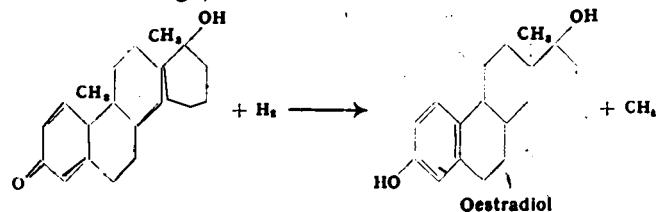
Doch nun gelang es in kurzer Aufeinanderfolge, die einzelnen Stufen außerordentlich zu verbessern. Vor allem führte die bereits erwähnte theoretische Durchleuchtung der letzten Phase, der thermischen Reaktion, zum entscheidenden Fortschritt.

Aus dem dreifach ungesättigten Keton hatten wir das ebenfalls 3fach ungesättigte Phenol erhalten, trotzdem Entmethyllierung stattgefunden hatte. Dies brachte uns zu der Vermutung, daß der eigentliche Vorgang keine Methan-Abspaltung, sondern eine Abspaltung von Methyl darstellt. Es mußten demzufolge primär radikalartige Bruchstücke entstehen, die den zu ihrer Absättigung gebrauchten Wasserstoff anderen Teilen der Molekel entziehen, z. B. der sekundären Hydroxyl-Gruppe am Kohlenstoff-Atom 17. Als Bestätigung fanden wir neben dem Alkohol Oestra-

²⁰⁾ H. H. Inhoffen u. G. Zählsdorff, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 604 [1941].

diole in der Mutterlauge in beträchtlichen Mengen das Ketton Oestrone. Wir kamen daher auf den Gedanken, die thermische Spaltung in Gegenwart von wasserstoffspendenden Mitteln durchzuführen, um hierdurch das Steroid-Material von der Autodehydrierung auszuschließen. Als wir hierfür Tetralin verwendeten und die Erhitzung in diesem Lösungsmittel vornahmen, konnte in der Tat die den technischen Erfolg bestimmende Ausbeute dieser letzten Reaktion von 5% auf 60% gesteigert werden.

Wir gelangen somit letztlich zu folgender Formulierung der Oestradiol-Bildung^{21).}

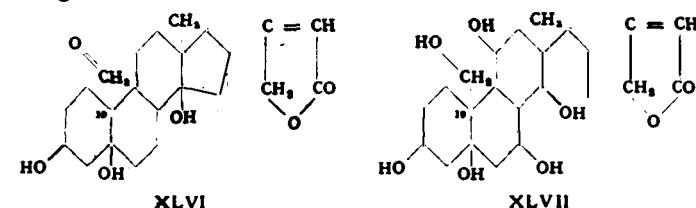


Die Gewinnung des Follikelhormons aus Cholesterin in technischem Maßstab ist seither durchführbar.

Bei diesen Untersuchungen hat mir während der letzten Jahre Herr Dr. Zülsdorff ganz wesentlich zur Seite gestanden; er kam gleichfalls aus der damals noch unerschöpflichen Göttinger Chemiker-Schule zu mir.

Entstehung des Oestradiols in vivo

Was schließlich die Frage der Entstehung des Oestradiols im weiblichen Organismus anbetrifft, so ist natürlich eine Methan-Abspaltung, auch enzymatisch, als äußerst unwahrscheinlich anzusehen. Die Natur wird hier den Weg über weit reaktionsfähige Zwischenstufen beschreiten. Zwei Vorbilder für einen



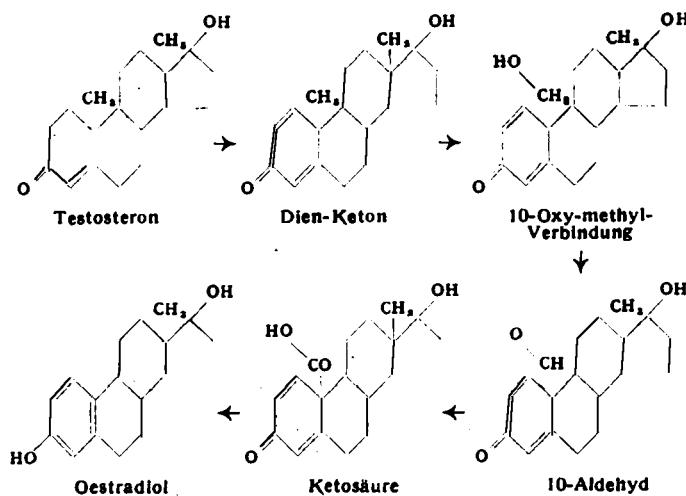
möglichen physiologischen Übergang liefert die Pflanze. Die Gennine der Herzgifte Strophantidin (XLVI) aus Strophantus compositus

²¹⁾ H. H. Inhoffen u. G. Zülsdorff, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 1914 [1941].

und Ouabain (XLVII) aus strophantus gratus besitzen als seltene Ausnahmen am Kohlenstoffatom 10 anstelle der Methyl-Gruppe eine Aldehyd-Gruppe resp. eine primäre Alkohol-Gruppe.

Diese Aldehyd-Gruppe sowohl wie die Oxy-methyl-Gruppe lassen sich im Verlauf tiefgreifender Reaktionen leicht von ihrem Platz durch Wanderung verschieben resp. ganz aus der Molekel entfernen^{22).}

Man könnte im Hinblick auf diese Vorbilder daran denken, daß im weiblichen Organismus folgende Bildung des Oestradiols aus Testosteron als Muttersubstanz vor sich geht:



Nach Dehydrierung zum Dien-keton setzt eine stufenweise Oxydation des Methyls bis zum Carboxyl ein. Die resultierende Säure stellt infolge der konjuguierten Zwischenlage der beiden Doppelbindungen praktisch ein β-Ketonsäure dar, die leicht unter Verlust von Kohlendioxyd in das Follikelhormon überzugehen vermag. Eine Störung dieses Abbaumechanismus könnte wohl die teilweise Erklärung des Auftretens männlicher Merkmale bei vielen Frauen abgeben. Da im männlichen Organismus ebenfalls Oestradiol angetroffen wird, würde auch hier die nämliche Umwandlung, wenn gleich im wesentlich geringeren Ausmaß, anzunehmen sein.

Eingeg. am 10. Mai 1947 [A 39].

²²⁾ Jacobs u. Collins, J. biol. Chemistry, 63, 123 [1925]. Jacobs u. Bigelow, J. biol. Chemistry, 101, 15 [1933]. L. Fieser: Chemistry of Natural Products related to Phenanthrene, S. 294 [1936].

Kohlenhydrat-Eiweißverbindungen

Von Prof. Dr. FRITZ MICHEEL, aus dem Chemischen Institut der Universität Münster/W.

Die Eiweißstoffe werden hinsichtlich der Mannigfaltigkeit ihrer Struktur und der Vielseitigkeit ihrer Bedeutung von keiner anderen Gruppe von Naturstoffen erreicht oder übertroffen. Man pflegt sie in die eigentlichen Proteine und die Proteide einzuteilen, wobei man von ersteren ursprünglich annahm, daß sie ausschließlich aus α-Aminosäuren aufgebaut seien, während in letzteren außerdem noch nicht-aminoäureartige Bausteine enthalten sind, also z. B. Phosphorsäure im Casein, Purin- und Pyrimidin-zucker-phosphorsäurereste in den Nucleoproteiden. Eine solche Einteilung würde jedoch bei ihrer konsequenten Durchführung heute dazu führen, daß die Gruppe der eigentlichen Proteine sehr klein wäre. Denn die meisten Eiweißstoffe enthalten geringe Mengen an Kohlenhydraten. Sie müßten also, streng genommen, zu den Proteiden gerechnet werden, obwohl sich die kohlenhydrathaltigen in ihren wichtigsten chemischen und physikalischen Eigenschaften nur geringfügig von den kohlenhydratreichen Proteinen unterscheiden, wenn der Kohlenhydrat-Gehalt klein ist. Es ist schon längere Zeit bekannt, daß die meisten Eiweißstoffe kohlenhydrathaltig sind. Man glaubte es dabei jedoch lediglich mit Verunreinigungen zu tun zu haben, wenn der Gehalt an Kohlenhydrat klein war. Erst die Fortschritte in der Reindarstellung der Proteine zeigten, daß dem nicht so ist. Die folgende Tabelle gibt den Kohlenhydrat-Gehalt einiger nach den gebräuchlichen Methoden dargestellter Proteine¹⁾ an.

Kohlenhydrat-Gehalt (%)	
Eieralbumin	1,7
Eiweißglobulin	4,0
Serumalbumin (Pferd)	0,47
Serumglobulin (Pferd)	1,82
Casein	0,81
Laetalbumin	0,44
Gelatine	0,6
Kollagen	0,66

Völlig kohlenhydratfreie Proteine, z. B. Insulin, waren recht selten bekannt.

Der Kohlenhydrat-Gehalt der Eiweißstoffe ist, wie weiter unten ausgeführt wird, für deren biologisches, insbesondere immunologisches Verhalten von großer Bedeutung. Dies trifft in besonderem Maße für gewisse bakterielle Kohlenhydrat-Eiweißverbindungen zu, deren Kohlenhydrat-Komponente spezifisch für die betreffenden Bakterien ist. Er ist aber auch für das serologische Verhalten der meisten andern Proteine von Wichtigkeit.

Die in den letzten Jahren ständig fortschreitende Entwicklung der Reinigungsmethodik hat gezeigt, daß man scheinbar einheitliche Proteine in kohlenhydrathaltige und kohlenhydratreiche Komponenten zerlegen kann. In erster Linie geeignet für solche Untersuchungen sind die löslichen Eiweißstoffe aus Serum, Plasma, Milch oder Eiern. Die Ergebnisse werden besonders eindrucksvoll, wenn es gelingt, einen kristallinen Eiweißstoff scheinbar homogener Zusammensetzung in kristallisierte kohlenhydrathaltige und kohlenhydratreiche Komponenten zu zerlegen. Die Kryatalisation hat bei Eiweißstoffen nicht die gleiche Bedeutung wie bei niedrigmolekularen Substanzen. Während bei letzteren im allgemeinen nur Mo-

¹⁾ Siehe z. B. die Zusammenstellung in Jordan-Lloyd u. Shore: Chemistry of the proteins, London 1938, S. 139.