

94. Adolf Butenandt: Über das Pregnandiol, einen neuen Sterin-Abkömmling aus Schwangeren-Harn.

[Aus d. Allgem. Chem. Universitäts-Laborat. Göttingen.]

(Eingegangen am 30. Januar 1930.)

Seit der bedeutsamen Beobachtung von B. Zondek und Aschheim¹⁾ (1927), daß mit dem Harn der schwangeren Frau größere Mengen an Hormonen des Hypophysen-Vorderlappens und an Ovarial-hormon ausgeschieden werden, ist Schwangeren-Harn als Ausgangsmaterial für die Bearbeitung dieser Hormone herangezogen worden. So haben sich mit dem Ziel der chemischen Untersuchung des Ovarial-hormons in den letzten Jahren Slotta²⁾ (1927), Veler und Doisy³⁾ (1928), Glimm und Wadehn⁴⁾ (1929), Marrian und Parkes⁵⁾ (1929), Butenandt⁶⁾ (1929), Wieland, Straub und Dorfmüller⁷⁾ (1929) dieses Ausgangsmaterials bedient.

Es ist an anderer Stelle⁸⁾ bereits über Fraktionierungs-Methoden berichtet, mit deren Hilfe es möglich geworden ist, aus den äther-löslichen Anteilen des Schwangeren-Harns das Ovarial-hormon in reinem krystallisierten Zustande darzustellen. Das krystallisierte Progynon (Schmp. 243 bis 245°) erwies sich als ungesättigtes Oxy-lacton der wahrscheinlichen Formel $C_{23}H_{28}O_3$ oder $C_{24}H_{32}O_3$.

Bei der Fraktionierung des Rohöls zur Darstellung des Progynons wurden krystallisierte Begleitstoffe des Hormons erhalten, die sich im Tierversuch physiologisch unwirksam zeigten. Über die Untersuchung eines Begleitstoffes des Progynons aus den unverseifbaren Anteilen des Schwangeren-Harns soll im folgenden berichtet werden.

Im Frühjahr 1929 wurde erstmalig bei der Verarbeitung von hochgereinigten Hormon-Ölen, wie sie durch Entmischungs-Methoden mit Lösungsmitteln dargestellt wurden, in kleiner Menge ein aus Alkohol oder Aceton in schönen weißen Täfelchen krystallisierender Stoff von konstantem Schmp. 234—235° erhalten. Er ist ausgezeichnet durch seine schwere Löslichkeit in den meisten organischen Lösungsmitteln. Da ihm keine Sexual-hormon-Wirkungen eigen sind, wurde seine chemische Untersuchung zurückgestellt, bis nach erfolgter Darstellung einer etwas größeren Menge seine Konstitutions-Ermittlung gesicherter erfolgen konnte. Im Laufe des vergangenen Jahres wurde der neue Stoff aus jeder Schwangeren-Harn-Aufarbeitung als regelmäßiger vorkommender Bestandteil in wechselnder Ausbeute isoliert. Aus 100 l Schwangeren-Harn können schätzungsweise 0.1—0.2 g an reinen Krystallen gewonnen werden. Zur Durchführung der vorliegenden Untersuchung standen fast 2 g zur Verfügung.

Vor kurzem hat G. F. Marrian⁹⁾ berichtet, daß ihm bei der Aufarbeitung von Schwangeren-Harn ebenfalls die Darstellung eines in farblosen Täfelchen krystallisierenden Stoffes (Schmp. 233—235°) geglückt sei. Nach den von ihm beschriebenen Eigenschaften handelt es sich zweifellos

¹⁾ Klin. Wochschr. **8**, 1322 [1927], 8, 8 [1928].

²⁾ Dtsch. Medizin. Wochschr. **1927**, 2158.

³⁾ Proceed. Soc. exper. biol. Med. **25**, 806 [1928].

⁴⁾ Biochem. Ztschr. **207**, 361 [1929]. ⁵⁾ Journ. Physiol. **67**, 389 [1929].

⁶⁾ Naturwiss. **17**, 879 [1929]; Dtsch. Medizin. Wochschr. **1929**, 2171.

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **186**, 97 [1929].

⁸⁾ Biochem. Journ. **23**, 1090—1098 [1929].

um dasselbe Produkt. Marrian hat durch Darstellung eines Acetylderivats (Schmp. 177.5—178.5⁰) die Alkohol-Natur des neuen Stoffes erkannt, für den er auf Grund von Molekulargewichts-Bestimmungen und Analysen die Formeln $C_{19}H_{30}(OH)_2$ oder $C_{20}H_{32}(OH)_2$ erörtert.

Durch wiederholte Analysen des Stoffes selbst, und durch die Darstellung und Untersuchung einer Reihe seiner Derivate wird in vorliegender Arbeit gezeigt, daß die von Marrian gefundenen Werte für Kohlenstoff zu niedrig sind und dem neuen Stoff mit größter Wahrscheinlichkeit die Molekulargleichung $C_{21}H_{36}O_2$ zukommt⁹⁾.

Beide Sauerstoffatome sind als Hydroxylgruppen vorhanden: das sehr gut krystallisierende Diacetyl-derivat (Schmp. 180⁰) zeigt die Alkohol-Natur des Stoffes, auf Grund deren für ihn der Name Pregnadiol (praegnans = schwanger) vorgeschlagen sei. Pregnadiol ist gesättigt, es reagiert nicht mit Brom, und sein Acetat erwies sich gegen alle katalytischen Hydrierungen beständig. Der dem Alkohol zugrunde liegende gesättigte Kohlenwasserstoff $C_{21}H_{36}$, das Pregnan, enthält 8 Wasserstoffatome weniger als ein Grenzkohlenwasserstoff; man könnte daraus auf das Vorhandensein eines aromatischen Kerns oder vier hydrierten Ringe im Molekül des Pregnadiols schließen.

Die Ergebnisse der Oxydation entscheiden diese Frage. Bei vorsichtiger Behandlung mit Chromsäure in der Kälte gelingt es leicht, den Pregnadiol 4 Wasserstoffatome zu entziehen und ein in langen Nadeln krystallisierendes, gesättigtes Diketon $C_{21}H_{32}O_2$ (Schmp. 123⁰) darzustellen, das ein charakteristisches, schwer lösliches Dioxim liefert; beide Hydroxylgruppen des Pregnadiols sind also sekundärer Natur. Wird das Diketon energischer mit Chromsäure behandelt, so geht es über in eine Keto-dicarbonsäure $C_{21}H_{32}O_5$ (Zers.-Pkt. 270⁰), die aus Essigester in gut ausgebildeten Prismen zu erhalten ist und einen Dimethylester liefert, der aus verd. Alkohol in langen, seidenweichen Nadeln vom Schmp. 113⁰ krystallisiert.

Durch die Bildung dieser Dicarbonsäure ist die Stellung einer Ketogruppe des Pregnandions in einem hydrierten Ring erwiesen, das Vorliegen eines aromatischen Kerns damit ausgeschlossen; Pregnadiol enthält somit vier hydrierte Ringe im Molekül und steht daher mit großer Wahrscheinlichkeit in nahem chemischen Zusammenhang mit den Sterinen und Gallensäuren.

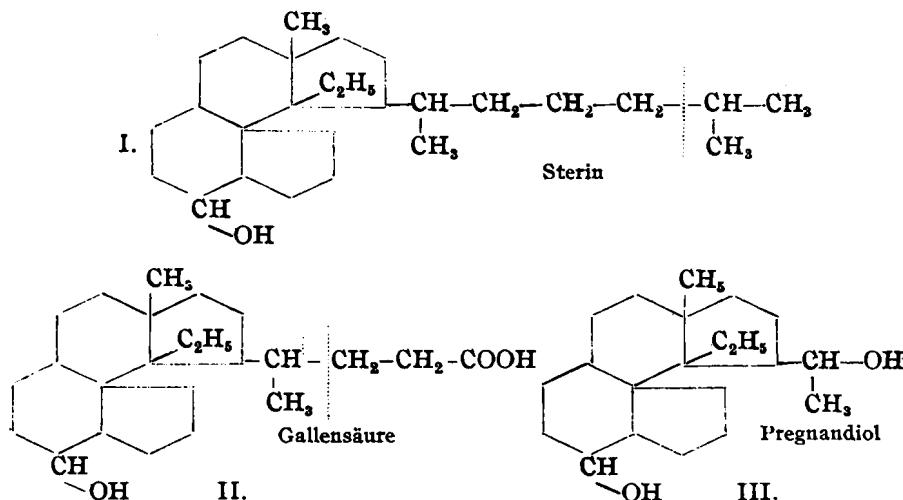
Die Stabilität der zweiten Ketogruppe im Pregnandion gegen Chromsäure ist bemerkenswert; dieser Befund könnte auf die Stellung dieser Ketogruppe in einer Seitenkette hindeuten¹⁰⁾. Da das Pregnandion mit alkalischer Jodlösung eine positive Jodoform-Reaktion gibt, so ist das Vorliegen einer $-CO.CH_3$ -Gruppe im Pregnandion, einer $-CH(OH).CH_3$ -Gruppe im Pregnadiol sehr wahrscheinlich.

Die bisher durchgeführten Experimente lassen es möglich erscheinen, daß dem Pregnadiol — unter Zugrundelegen der Windaus-Wielandschen Sterin-Formel — die Konstitutions-Formel III zukommt. Der dann

⁹⁾ Eine Formel $C_{20}H_{34}O_2$ wäre allenfalls noch möglich und ist nicht absolut sicher ausgeschlossen. Wie aus dem experimentellen Teil ersichtlich, liegen aber sämtliche gefundenen Analysenwerte näher an $C_{21}H_{36}O_2$.

¹⁰⁾ In der Reihe der Sterine und Gallensäuren haben sich Ketogruppen im Ring II und in der Seitenkette als besonders stabil gegen Chromsäure erwiesen.

klar ersichtliche Zusammenhang mit den Sterinen und Gallensäuren sei durch eine entsprechende Formel-Zusammenstellung gezeigt. Darnach wäre Pregnadiol ein neutrales Oxydationsprodukt der Sterine, das durch Abbau der Seitenkette an der ersten Kohlenstoff-Verzweigung entstanden ist.



Die Formel III für Pregnadiol erklärt alle gefundenen Reaktionen, sie stellt den gegenwärtig wahrscheinlichsten Formelausdruck für den neuen Alkohol dar. Die völlige Sicherstellung dieser Konstitution und die sterische Zuordnung des Pregnadiols zur Reihe der Cholansäure oder der Allo-cholansäure soll durch die Darstellung identischer Derivate aus Gallensäuren einerseits und dem Pregnadiol andererseits versucht werden.

Pregnadiol ist das erste neutrale Oxydationsprodukt der Sterine, das im Organismus aufgefunden ist. Nach Versuchen von Marrian⁸⁾ findet es sich nicht in nachweisbarer Menge im Harn des Mannes und der nicht-schwangeren Frau. Diese wichtige Beobachtung bedarf der weiteren Untersuchung; es erscheint nicht ausgeschlossen, daß das Pregnadiol als typisches Stoffwechselprodukt des schwangeren Organismus in naher chemischer Beziehung steht zum Progynon, als dessen charakteristischer Begleiter im Schwangeren-Harn es aufgefunden wurde.

Der Schering-Kahlbaum A.-G., Berlin, sei auch an dieser Stelle für das zur Verfügung gestellte Rohöl aus Schwangeren-Harn verbindlichst gedankt.

Beschreibung der Versuche

Darstellung und Eigenschaften des Pregnadiols.

Als Ausgangsmaterial zur Darstellung des Pregnadiols diente ein aus Schwangeren-Harn von der Schering-Kahlbaum A.-G., Berlin, hergestelltes Rohöl, in dem nur äther-lösliche, in bezug auf Progynon angereicherte Anteile des Harns vorhanden sind. Das Rohöl wird zur Gewinnung des krystallisierten weiblichen Sexual-hormons, des Progynons, nach einer schon früher angegebenen Methodik⁶⁾ aufgearbeitet; es wird durch Entmischung mit Hilfe von Lösungsmitteln fraktioniert. Durch Verteilung des

Rohöls zwischen 50-proz. Alkohol und Ligroin wird eine wesentliche Anreicherung des Pregnandiols mit dem Progynon in der alkoholischen Phase erzielt, der man es nach weiterem Zusatz von Wasser mit Äther entzieht. Der Rückstand der ätherischen Lösung wird zwischen 60-proz. Alkohol und Benzol verteilt, Pregnadiol und Progynon lösen sich im Benzol¹¹⁾, nach dem Abdestillieren des Benzols und Aufnehmen des Rückstandes mit Aceton krystallisiert ein Teil des Pregnandiols aus. Eine 2. Fraktion erhält man bei der weiteren Verarbeitung der benzol-löslichen Anteile auf Progynon; hydrolysiert man sie mit verd. alkohol. Salzsäure in der Wärme, nimmt mit Äther auf und entzieht dem Äther die sauren Bestandteile durch Ausschütteln mit Alkali, so bleibt das Pregnadiol im Äther zurück. Beim Eindunsten der ätherischen Lösung erhält man es in farblosen Krystallen. Die erzielten Ausbeuten wechseln je nach dem zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterial¹²⁾.

Pregnadiol ist schwer löslich in allen organischen Lösungsmitteln und Wasser, in heißem Alkohol oder Aceton ist es hinreichend löslich, um daraus gut umgelöst zu werden. Es krystallisiert in farblosen, gut ausgebildeten Täfelchen vom konstanten Schmp. 234–235°. Pregnadiol gibt keine ausgesprochenen Sterin-Farbreaktionen, mit Essigsäure-anhydrid und Schwefelsäure in Chloroform-Lösung färbt es sich rotbraun; es wird von Digitonin nicht gefällt.

Pregnadiol ist frei von Stickstoff und Schwefel.

4.904, 4.870 mg Sbst.: 14.125, 14.060 mg CO₂, 4.94, 4.96 mg H₂O.

(C₂₀H₃₄O₂). Ber. C 78.43, H 11.11.)

C₂₁H₃₆O₂. Ber. C 78.68, H 11.33. Gef. C 78.55, 78.73, H 11.27, 11.39.

Pregnadiol-diacetat: 0.1 g Pregnadiol wird mit wenig Essigsäure-anhydrid 2 Stdn. zum Sieden erhitzt; nach dem Erkalten krystallisiert das Diacetyl derivat in feinen weißen Nadeln, die aus Alkohol umgelöst werden. Das Rohprodukt sintert bei 164° und schmilzt völlig bei 178–179°; nach mehrfachem Umlösen liegt der Schmp. des in farblosen Prismen krystallisierenden Stoffes konstant und scharf bei 180°.

In einem Versuch wurde ein konstant bei 166° schmelzendes Acetyl-derivat erhalten, das aber gleiche Analysen gab, wie das Produkt vom Schmp. 180°. Nach dem Animpfen seiner Lösung mit dem höher schmelzenden Derivat krystallisierte nur noch das Diacetat vom Schmp. 180°.

3.874, 5.041, 4.821 mg Sbst.: 10.540, 13.735, 13.115 mg CO₂, 3.42, 4.53, 4.31 mg H₂O. (C₂₀H₃₂O₂(CO.CH₃)₂). Ber. C 73.85, H 9.74.)

C₂₁H₃₄O₂(CO.CH₃)₂. Ber. C 74.20, H 9.97.
Gef. ., 74.20, 74.31, 74.19, ., 9.87, 10.05, 10.00.

Das Diacetyl derivat bleibt bei katalytischer Hydrierung nach Fokin-Willstätter oder nach Adams-Shriner unangegriffen. Nach dem Verseifen durch 1-stdg. Kochen mit 5-proz. alkohol. Kalilauge wird Pregnadiol zurück erhalten.

Oxydation des Pregnandiols zum Diketon C₂₁H₃₂O₂.

0.1 g Pregnadiol wird in gelinder Wärme in 4 ccm 90-proz. Eisessig gelöst, mit der Lösung von 0.1 g Chromsäure-anhydrid in 4 ccm 90-proz.

¹¹⁾ In der alkoholisch-wässrigen Phase dieser Reinigungsstufe findet sich stets eine stickstoff-haltige Carbonsäure vom Zers.-Pkt. 280–290°, deren Untersuchung aussteht.

¹²⁾ vergl. Marrian, I. c.

Eisessig versetzt und in der Kälte 12 Stdn. stehen gelassen. Nach dem Verdünnen mit Wasser fällt das Pregnandion ölig aus, beim längeren Stehen und Reiben mit dem Glasstab krystallisiert es; aus verd. Alkohol erhält man es in farblosen Nadeln vom Schmp. 123°. Pregnandion ist leicht löslich in organischen Lösungsmitteln; in reinem Methylalkohol mit alkoholischer Jodlösung erwärmt, gibt es eine positive Jodoform-Reaktion.

4.762 mg Sbst.: 13.910 mg CO₂, 4.31 mg H₂O.

(C₂₀H₃₀O₂. Ber. C 79.42, H 10.00.)

C₂₁H₃₂O₂. Ber. C 79.67, H 10.20. Gef. C 79.67, H 10.13.

Dioxim: 0.1 g Pregnandion wird in alkohol. Lösung mit überschüssigem Hydroxylamin-Acetat 1—2 Stdn. zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten krystallisiert das schwer lösliche Dioxim aus, das aus viel Alkohol durch allmähliches Verdunsten des Lösungsmittels in prismatischen Nadeln gewonnen wird, die sich beim Erhitzen oberhalb von 250° zersetzen.

4.948 mg Sbst.: 13.155 mg CO₂, 4.34 mg H₂O. — 4.090 mg Sbst.: 0.284 ccm N (22°, 757 mm).

(C₂₀H₃₂O₂N₂. Ber. C 72.22, H 9.71, N 8.43.)

C₂₁H₃₄O₂N₂. Ber. C 72.77, H 9.90, N 8.09. Gef. C 72.51, H 9.82, N 8.00.

Oxydation des Pregnandiols zur Keto-dicarbonsäure C₂₁H₃₂O₆.

0.1 g Pregnandiol wird in wenig Eisessig auf dem Wasserbade gelöst und heiß mit der Lösung von 0.2 g (etwa 10 O) Chromsäure-anhydrid in wenig Wasser versetzt und 1 Stde. auf 80—90° erwärmt. Die überschüssige Chromsäure wird mit schwefliger Säure zerstört; nach dem Zusatz von verd. Schwefelsäure wird die Reaktionslösung ausgeäthert und die ätherische Lösung in saure und neutrale Anteile getrennt. Die sauren Anteile krystallisieren nach dem Abdestillieren des Äthers; sie werden unter Hinzufügen von sehr wenig Alkohol in Essigester gelöst, aus dem sie nach Zusatz von Petroläther in schönen, kurzen Prismen krystallisieren, die um 270° unt. Zers. schmelzen; sie sind leicht löslich in Alkohol, schwer dagegen in Aceton, Petroläther und Essigester.

4.552 mg Säure verbrauchen 0.55 ccm 0.455-n. NaOH.

C₂₁H₃₂O₆ (364). Äquiv.-Gew. Ber. 182, gef. 181.

2.201 mg Sbst.: 5.565 mg CO₂, 1.73 mg H₂O.

(C₂₀H₃₀O₆. Ber. C 68.57, H 8.44.)

C₂₁H₃₂O₆. Ber. C 69.18, H 8.86. Gef. C 68.96, H 8.80.

Dimethylester: Dargestellt in ätherischer Lösung mit Diazo-methan; krystallisiert aus verd. Alkohol in langen, feinen Nadeln vom Schmp. 113°.

4.450 mg Sbst.: 11.430 mg CO₂, 3.65 mg H₂O.

(C₂₂H₃₄O₆. Ber. C 69.78, H 9.06.)

C₂₃H₃₆O₆. Ber. C 70.35, H 9.25. Gef. C 70.06, H 9.18.