

## 3-Oxy-2-oxo-nucidin.

1) Die Base war aus der Dioxo-Verbindung mit Zink-Amalgam dargestellt. Ihre einzelnen Fraktionen aus absol. Alkohol zeigten alle dieselbe Krystallform und den Schmp. 257—260° (luft-leer. Röhrchen). Die Drehungen der Perchlorat-Proben daraus lagen um 33° ohne wesentliche Abweichungen.

2) Jodmethylat<sup>9)</sup> und Methylperchlorat: Das erste entstand glatt aus der Base mit Methyljodid in Methanol. 3.6 g Salz löste man in 100 ccm heißem Wasser und schied mit 8 ccm 2-n.  $\text{HClO}_4$  ein noch jodid-haltiges Perchlorat ab, das nur durch Fällen mit 6 ccm  $n/_{10}$ - $\text{AgNO}_3$  jod-frei zu erhalten war. Rein bildet es in 30 Tln. heißem Wasser lösliche, derbe Prismen, die von  $n/_{2}$ -Säure noch schwerer aufgenommen werden.

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{N}_2(\text{CH}_3)(\text{ClO}_4)$  (416.5). Ber. C 51.85, H 6.00.  
Gef., , 51.66, , 6.06.

$$[\alpha]_D^{20} = +44^0/d \quad (1\% \text{ in Wasser}).$$

3) Hydrierung der quartären Salze: 1.5 MM. Jodid nahmen nach trügem Beginn mit 40 mg Platinoxyd in 20 ccm Wasser 60 ccm Wasserstoff auf (4 H = 72 ccm). Man gab 2 ccm n-NaOH zu und zog mit Chloroform aus. Die wäßrige Schicht lieferte, angesäuert und eingeengt, das Methylperchlorat des 3-Oxy-2-oxo-dihydro-nucidins ( $\alpha = +59^0$ ). Die Isolierung verlief wegen der Anwesenheit der HJ-Säure schlecht. Der Chloroform-Rest betrug 0.25 g. Man behandelte ihn in 1.5 ccm n- $\text{HClO}_4$  mit Tierkohle und schied durch Eindunsten im Exsiccator 0.2 g und 0.04 g Prismen ab mit  $\alpha = +40^0$  bzw.  $+37.4^0$ .

Beim Methylperchlorat war der Verbrauch 1.6 Mol. Wasserstoff. Man isolierte wie zuvor je 40 % quartäres Salz (Prismen, Tafeln und Polyeder mit  $\alpha = +59^0$ ) und chloroform-lösliche Basen. Das Perchlorat daraus zeigte  $[\alpha]_D^{20} = +38^0/d$ , war also das auch sonst erhaltene Gemisch.

**319. Adolf Butenandt, Ulrich Westphal und Heinz Cobler: Über einen Abbau des Stigmasterins zu corpus-luteum-wirksamen Stoffen; ein Beitrag zur Konstitution des Corpus-luteum-Hormons (Vorläuf. Mitteil.).**

[Aus d. Organ.-chem. Institut d. Techn. Hochschule Danzig-Langfuhr.]  
(Eingegangen am 29. August 1934.)

Im April dieses Jahres<sup>1)</sup> berichteten wir erstmalig über die Darstellung eines einheitlich krystallisierten, chemisch und physikalisch charakterisierten Hormons aus dem Corpus luteum. Dieses Hormon, das mit einer Gesamt-dosis von 0.75 mg die drüsige Umwandlung der durch Follikel-Hormon-Gaben aufgebauten Uterus-Schleimhaut des infantilen Kaninchens bewirkt<sup>2)</sup>, krystallisiert in Rhomben vom Schmp. 128.5° (unkorr.) und stellt ein ungesättigtes Diketon der wahrscheinlichen Zusammensetzung  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$  dar; es wurde von uns durch ein bei 243° schmelzendes Dioxim gekennzeichnet.

<sup>1)</sup> B. 63, 2221 [1930].

<sup>2)</sup> Dtsch. Gesellschaft inner. Medizin 11. 4. 34; Wiener Klin. Wochenschr. 1934, Nr. 29/30; Forsch. u. Fortschr. 1934, Nr. 20/22; B. 67, 1440 [1934]; Ztschr. physiol. Chem. 227, 84 [1934]; vergl. auch Wadehn, Angew. Chem. 47, 562 [1934].

<sup>2)</sup> Über den verwendeten Test s. Ztschr. physiol. Chem. 227, 84 [1934].

Ihm isomer und nahe verwandt ist ein zweites Hormon-Krystallisat aus dem Corpus luteum, das bei  $120^{\circ}$  (unkorr.) schmilzt und möglicherweise nur eine polymorphe Modifikation des ersten darstellt.

Ein Teil unserer Ergebnisse hat 3 Monate später durch eine Veröffentlichung von K. H. Slotta und Mitarbeitern<sup>3)</sup> und durch eine an den einen von uns gerichtete briefliche Mitteilung von Prof. O. Wintersteiner<sup>4)</sup>, Columbia-University, New York eine wünschenswerte Bestätigung erfahren.

Die krystallisierten Wirkstoffe des Corpus luteum sind äußerst kostbare Substanzen; es ist uns bisher nur gelungen, 20 mg des wirksamen Prinzips in völlig reinem Zustande in die Hand zu bekommen. Aus diesem Grunde schien uns eine rein analytische Untersuchung der Krystallivate zur Klärung ihrer Konstitution nur wenig Aussicht auf baldigen Erfolg zu bieten. Wir sind deshalb herangegangen, naheliegende Arbeits-Hypothesen über den Bau des Hormons auf „synthetischem“ Wege zu prüfen, um auf diese Weise die Konstitutions-Ermittlung zu erleichtern.

Wie wir des öfteren betont haben<sup>1)</sup>, macht die Zusammensetzung unserer Krystallivate  $C_{21}H_{30}O_2$  einen nahen chemischen Zusammenhang des Corpus-luteum-Hormons mit dem aus Schwangeren-Harn dargestellten Pregnanadiol,  $C_{21}H_{36}O_2$ , wahrscheinlich, das seinerseits den Keimdrüsen-Hormonen und den Sterinen nahesteht und durch die gesicherte Konstitutionsformel (I) wiederzugeben ist<sup>5)</sup>.

Es war naheliegender, in dem physiologisch aktiven Diketon  $C_{21}H_{30}O_2$  ein einfach ungesättigtes Derivat des Pregnandions, etwa vom Typus (III) oder (IV), zu vermuten. Die Lage der Doppelbindung im Typus (III) würde gerechtfertigt durch eine Analogie zu den ungesättigten Sterinen, deren eine Doppelbindung bevorzugt die Stellung 5.6 inne hat; an den Typus (IV) konnte man denken in Anbetracht der Tatsache, daß sich Doppelbindungen leicht in die  $\alpha, \beta$ -Stellung zur Ketogruppe begeben, und weil durch diese Anordnung die besonders im Rohzustand in Erscheinung tretende Empfindlichkeit des Hormons gegen Alkali und Oxydation vielleicht besser verständlich wird.

Wir haben uns bemüht, Stoffe der Konstitution III—IV aus Sterinen oder Sterin-Derivaten darzustellen und mit den Inhaltsstoffen aus Gelbkörpern zu vergleichen. Diese Versuche, die in Zusammenarbeit mit dem Hauptlaboratorium der Schering - Kahlbaum A.-G., Berlin (Prof. Schoeller, Dr. Serini, Dr. Hildebrandt) durchgeführt wurden, konnten wir leicht eingliedern in ein bereits vor 2 Jahren im Göttinger Laboratorium begonnenes Arbeits-Programm, dessen Ziel in der Darstellung der Sexualhormone aus natürlichen Sterinen gegeben war, und das aus äußeren Gründen einige Zeit unterbrochen werden mußte.

Neben anderen Sterinen haben wir als Ausgangsmaterial für diese Arbeiten das Stigmasterin (aus Sojabohnen) herangezogen, dessen Konstitutionsformel (V) von E. Fernholz<sup>6)</sup> bewiesen wurde. Es ist leicht ersichtlich, daß man durch Ersatz von 8 Kohlenstoffatomen der Stigmasterin-Seitenkette durch eine Oxogruppe zu einem ungesättigten Oxy-keton  $C_{21}H_{32}O_2$  (VI) vordringen würde, in dem ein geeignetes Ausgangsprodukt für die Darstellung mehrerer Stofftypen vorliegt, die uns in ihrer Beziehung zu den Sexualhormonen interessieren: so ist zu erwarten, daß Hydrierung des

<sup>3)</sup> B. **67**, 1270 [1934].

<sup>4)</sup> s. Ztschr. physiol. Chem. **227**, 84 [1934].

<sup>5)</sup> B. **63**, 659 [1930], **64**, 2529 [1931].

<sup>6)</sup> A. **507**, 128 [1933].

Oxy-ketons (VI) zu einem Pregnanolon (II) führt, das sterisch der „Allo-Reihe“ angehört, daß vorsichtige Oxydation den Weg zu ungesättigten Diketonen (III, IV) öffnet, und daß ein weiterer Abbau des Oxy-ketons Stoffe vom Typ des Androsterons,  $C_{19}H_{30}O_2$ <sup>7)</sup>, zugänglich macht.

In vorliegender Mitteilung wird die Darstellung des ungesättigten Oxy-ketons  $C_{21}H_{32}O_2$  (VI) aus Stigmasterin beschrieben; sie ist verhältnismäßig einfach: E. Fernholz<sup>6)</sup> hat in seiner Arbeit über die Konstitution des Stigmasterins bereits einen Weg angegeben, wie das Molekül an der Doppelbindung in der Seitenkette zu spalten ist; durch Behandlung des Stigmasterin-acetat-dibromids mit Ozon erhält man nach Entbromung und Verseifung des Reaktionsproduktes die Oxy-bisnor-cholensäure (VII); diese Säure diente uns als Ausgangsmaterial für den weiteren Abbau, der auf einem früher für die Darstellung von Pregnan<sup>8)</sup> angewandten Weg durchgeführt wurde.

Die Oxy-bisnor-cholensäure (VII) wurde mit Hilfe von Diazo-methan in ihren bei  $140^\circ$  schmelzenden Methylester<sup>6)</sup> verwandelt und dieser nach Grignard mit einem 8-fachen Überschuß (24 Mol) Phenyl-magnesiumbromid umgesetzt; aus dem zunächst entstehenden tertiären Carbinol wird durch Kochen mit Eisessig und anschließende Destillation im Hochvakuuum Wasser abgespalten und auf diese Weise der zweifach ungesättigte aromatische Alkohol (VIII) erhalten, der in Gestalt seines bei  $217^\circ$  (unkorr.) schnielzenden Acetates isoliert wurde. Zum weiteren Abbau wurde die Doppelbindung im Ringsystem mit Brom abgesättigt und das Dibrom-acetat mit Ozon in Benzophenon und das Dibromid des acetylierten Oxy-ketons (VI) zerlegt, das nach der Entbromung als Acetat vom Schmp.  $147^\circ$  (unkorr.) oder als dessen Semi-carbazone (Schmp.  $263^\circ$ ) zur Abscheidung gebracht wurde.

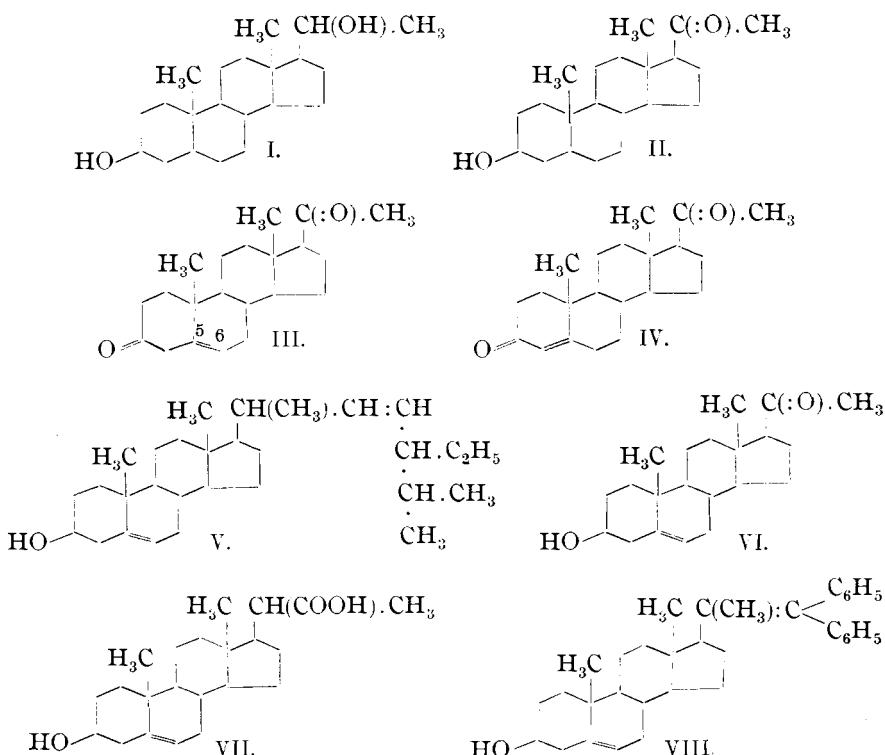
Das Oxy-keton  $C_{21}H_{32}O_2$  (VI) selbst krystallisiert in langen, prismatischen Nadeln vom Schmp.  $190^\circ$  (unkorr.). Von unseren mit diesem Stoff durchgeführten Versuchen wollen wir im folgenden diejenigen Ergebnisse in vorläufiger Mitteilung bekanntgeben, die einige Schlußfolgerungen in bezug auf die Konstitution der Inhaltsstoffe des Corpus luteum zulassen.

Um die arbeits-hypothetischen Konstitutionsformeln (III, IV) des Corpus-luteum-Hormons zu prüfen, unterwarfen wir das Oxy-keton (VI) unter verschiedenen Bedingungen einer milden Oxydation. Bei Verwendung von Chromsäure in der Kälte erwies sich das Reaktionsprodukt in allen untersuchten Fällen als ein Stoffgemisch, das durch fraktionierte Sublimation oder Krystallisation in mehrere Fraktionen zerlegt werden konnte, von denen eine bei  $160-163^\circ$ , die andere bei  $136-138^\circ$  und eine dritte bei  $129-135^\circ$  schmolz. Einen sicher einheitlichen Stoff haben wir bisher aus diesem Gemisch nicht isolieren können; unsere Versuche beanspruchen aber bereits im vorliegenden Stadium ein gewisses Interesse, weil alle dargestellten Fraktionen des Oxydations-Gemisches eine hohe und eindeutige physiologische Wirksamkeit im Test auf Corpus-luteum-Hormon entfalten: Zum Unterschiede vom Ausgangsstoff (VI), der mit 6 mg als Dosis noch keine erkennbare Umwandlung der Uterus-Schleimhaut hervorbringt, verwandelte die Fraktion vom Schmp.  $160-163^\circ$  (U. W. 26) mit 3 mg als Dosis die Uterus-Schleimhaut in das Stadium 2--3,

<sup>7)</sup> Forsh. u. Fortschr. 1934, Nr. 20/22.

<sup>8)</sup> B. 64, 2529 [1931].

die Fraktion vom Schmp. 136–138° (U. W. 25) bewirkte mit 1.5 mg eine Schleimhaut-Umwandlung in das Stadium 2, und die Fraktion vom Schmp. 129–135° (U. W. 27) brachte das Stadium 1–2 mit 1 mg hervor<sup>9</sup>). Aus diesen Zahlen folgt, daß die synthetisch dargestellten, noch nicht einheitlichen Krystallisate in ihrer höchsten Wirksamkeit dem natürlichen Hormon nur wenig nachstehen; ob der in ihnen enthaltene, physiologisch aktive Stoff mit diesem identisch ist, läßt sich noch nicht entscheiden. Wir sind mit der näheren Charakterisierung des Oxydationsgemisches beschäftigt; die vorliegende — noch vorläufige — Mitteilung findet ihre Rechtfertigung in den Schlußfolgerungen, die man bereits jetzt mit Sicherheit ziehen kann: 1) es ist prinzipiell der Weg aufgezeigt worden, auf dem eine künstliche Herstellung des bisher so kostbaren, therapeutisch wichtigen Gelbkörper-Hormons möglich sein wird; 2) seine nahe Beziehung zu den Sterinen und dem Pregnandiol, insbesondere zu den Formel-Typen III oder IV ist nicht mehr zweifelhaft; 3) aus der physiologischen Inaktivität des ungesättigten Oxy-ketons (VI) und des Pregnandions folgt die Bedeutung der Diketon-Natur und des ungesättigten Charakters für die physiologische Wirkung des Corpus-luteum-Hormons.



<sup>9)</sup> Über den Test s. Ztschr. physiol. Chem. 227, 84 [1934]; definitionsgemäß bewirkt 1 KE das Stadium 2; danach ist U. W. 26 etwas überdosiert.

Wir danken der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft und der Schering-Kahlbaum A.-G., Berlin für die Unterstützung unserer Arbeiten; das Stigmasterin wurde uns vom Hauptlaboratorium der Schering-Kahlbaum A.-G., Berlin zur Verfügung gestellt; dort wurden auch die physiologischen Auswertungen durchgeführt. Der Justus-Liebig-Gesellschaft und der I.-G. Farbenindustrie haben wir für das Bereitstellen von Stipendien zu danken.

### Beschreibung der Versuche.

Aus Stigmasterin wurde nach den Angaben von Fernholz<sup>6)</sup> die Acetoxy-bisnor-cholensäure bereitet, die durch  $1\frac{1}{4}$ -stdg. Kochen mit 5-proz. methylalkohol. Kalilauge (70 ccm auf 1.2 g Säure) zur Oxy-bisnor-cholensäure (VII)<sup>6)</sup> verseift wurde; das Reaktionsprodukt wurde aus der Verseifungs-Lauge durch Eingießen in verd. Salzsäure ausgefällt (Schmp. 295°) und durch Umsatz mit Diazo-methan in methylalkoholischem-ätherischer Lösung in den Methylester<sup>6)</sup> verwandelt; Schmp. 140°.

#### Umsatz des Oxy-bisnor-cholensäure-methylesters mit Phenyl-magnesiumbromid.

Zu einer Auflösung von 1.95 g Magnesium und 12.6 g Brom-benzol in 75 ccm absol. Äther wurden 1.2 g Oxy-bisnor-cholensäure-methylester<sup>10)</sup> in 75 ccm absol. Äther unter kräftigem Schütteln hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Stdn. unter Rückfluß bei 50° gehalten, das Lösungsmittel anschließend verdampft und das Reaktionsgut 8 Stdn. auf lebhaft siedendem Wasserbade erwärmt. Nach dem Zersetzen mit Eis wurde mit verd. Schwefelsäure angesäuert und 10–12-mal gründlich mit Äther ausgeschüttelt. Die in Äther löslichen Anteile des Reaktionsproduktes stellten ein braunes Öl dar, das zur Entfernung von Diphenyl mit Wasserdampf destilliert und anschließend mit 100 ccm 8-proz. methylalkohol. Kalilauge 9 Stdn. zum Sieden erhitzt wurde. Nach dem Erkalten wurde mit verd. Schwefelsäure angesäuert und zur Entfernung restlichen Diphenyls nochmals mit Wasserdampf destilliert; die nicht flüchtigen Anteile wurden in Äther aufgenommen und durch 4-maliges Ausschütteln der ätherischen Lösung mit 2-n. Natronlauge von sauren Bestandteilen befreit. Die filtrierte Lösung der Neutral-anteile wurde mit Wasser gewaschen, 20' unter Zusatz von Tiere Kohle gekocht, filtriert und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in Eisessig-Lösung 5 Stdn. zum Sieden erhitzt und (nach dem Abdampfen des Eisessigs im Vakuum) im Hochvakuum (0.001 mm Hg) fraktioniert destilliert: bis 190° ging ein Vorlauf über, die Hauptfraktion destillierte als hellgelbes, glasartig erstarrendes Öl bis 270–280°; sie wurde 13 Min. mit 2 ccm Essigsäure-anhydrid zum Sieden erhitzt und anschließend in alkohol. Lösung übergeführt, aus der das Reaktionsprodukt in nadelförmigen Blättchen krystallisierte. Das Rohprodukt (480 mg) zeigte einen Schmelzpunkt von 190–200°; es wurde durch Umlösen aus verd. Alkohol gereinigt bis zum konstanten Schmelzpunkt von 216–217° (unkorr.). Es liegt das Acetat des Alkohols C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>O (VIII) vor.

4.035 mg Sbst.: 12.555 mg CO<sub>2</sub>, 3.160 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>. Ber. C 84.98, H 8.72. Gef. C 84.86, H 8.76.

<sup>10)</sup> Mit Acetoxy-bisnor-cholensäure-methylester verläuft der Umsatz in völlig analoger Weise.

Bei einem zweiten Ansatz wurden aus 1.4 g Methylester 806 mg Acetat als Rohprodukt vom Schmp. 198–202° erhalten.

Abbau zum ungesättigten Oxy-keton  $C_{21}H_{32}O_2$  (VI).

440 mg des Acetates  $C_{36}H_{44}O_2$  wurden in 20 ccm Chloroform gelöst und tropfenweise unter Eiskühlung mit 139 mg Brom in 4 ccm Chloroform (= 2 Atome Brom je Mol) versetzt. Je 12 ccm dieser Reaktionslösung (entspr. 220 mg Acetat) wurden 30 Min. unter Eis-Kühlung mit einem Ozon-Strom behandelt, der etwa 7 mg Ozon pro Minute lieferte. Die wieder vereinigten Lösungen wurden von Chloroform befreit, der trockne Rückstand zur Entbromung mit Zinkstaub und 20 ccm Eisessig versetzt und 30 Min. auf dem Wasserbade erwärmt. Die mit Wasser verdünnte und filtrierte Lösung wurde mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung 3-mal mit 2-n. Natronlauge gewaschen, filtriert und durch etwa  $\frac{1}{2}$ -stdg. Kochen unter Zusatz von Tierkohle gereinigt. Nach dem Verdampfen der ätherischen Lösung hinterblieb das Acetat des Oxy-ketons  $C_{21}H_{32}O_2$  (VI) als ein von Krystallen durchsetztes Öl; ein kleiner Teil wurde aus verd. Alkohol umkrystallisiert: Farblose Nadeln vom Schmp. 146–147° (unkorr.).

4.116 mg Sbst.: 11.65 mg  $CO_2$ , 3.54 mg  $H_2O$ .

$C_{23}H_{34}O_3$ . Ber. C 77.04, H 9.56. Gef. C 77.19, H 9.63.

Die Hauptmenge des Acetates wurde in Gestalt seines Semicarbazons abgeschieden, das sich durch kurzes Kochen der alkohol. Lösung mit überschüssigem Semicarbazid-Acetat bildet und beim vorsichtigen Wasser-Zusatz in feinen, schwerlöslichen Nadeln krystallisiert. Ausbeute: 190 mg vom Schmp. 240–245° unt. Zers.; durch häufiges Umkrystallisieren aus reinem und aus verd. Alkohol wurde es rein erhalten: Schmp. 262–263° unt. Zers.

4.963 mg Sbst.: 12.615 mg  $CO_2$ , 4.025 mg  $H_2O$ . — 2.593 mg Sbst.: 0.225 ccm N (22°, 755 mm).

$C_{24}H_{37}O_3N_3$ . Ber. C 69.35, H 8.98, N 10.11.

Gef., 69.32, .. 9.07, .. 9.98.

50 mg Semicarbazone wurden 30 Min. mit 10 ccm Alkohol und 5 ccm 5-n. Schwefelsäure gekocht, die Reaktionslösung wurde mit Wasser verdünnt und mit Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung wurde mit verd. Schwefelsäure und Wasser gewaschen, getrocknet und abgedampft. Das Oxy-keton  $C_{21}H_{32}O_2$  (VI) krystallisierte aus verd. Alkohol in langen, prismatischen Nadeln vom Schmp. 190° (unkorr.). Ausbeute: 40 mg.

4.725 mg Sbst.: 13.815 mg  $CO_2$ , 4.360 mg  $H_2O$ .

$C_{21}H_{32}O_2$ . Ber. C 79.68, H 10.20.

Gef., 79.74, .. 10.32.

Dasselbe Oxy-keton wurde durch 1-stdg. Verseifen seines oben beschriebenen Acetates mit 3-n. methylalkohol. Kalilauge erhalten.