

404. E. Fernholz: Die Darstellung des Corpus-luteum-Hormons aus Stigmasterin.

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

(Eingegangen am 16. November 1934.)

Vor kurzem¹⁾ konnte ich bereits berichten, daß mir die Überführung des ungesättigten Oxy-ketons I in das α , β -ungesättigte Diketon II gelungen ist. Dieses Diketon besitzt eine Konstitution, wie sie von A. Butenandt²⁾ und K. H. Slotta³⁾ für das von ihnen isolierte Corpus-luteum-Hormon vorgeschlagen ist. Auch sein Schmp. und der seines Dioxims stimmten mit den Angaben überein, die für das Hormon gemacht wurden, so daß ich mit großer Sicherheit bereits annehmen konnte, diesen Naturstoff in übersichtlicher Weise dargestellt und damit in seiner Konstitution aufgeklärt zu haben.

Es ist wohl nötig, darauf hinzuweisen, daß ich diesen Weg zum Corpus-luteum-Hormon gänzlich unabhängig von A. Butenandt gegangen bin, da dieser bereits die Vorversuche zur Synthese in einer vorläufigen Mitteilung veröffentlicht hat²⁾. Gleich nach Erscheinen der Arbeit von K. H. Slotta, H. Ruschig und E. Fels⁴⁾, die zwar noch keine Konstitutionsformel brachte, aber doch keinen Zweifel darüber aufkommen ließ, daß sie Formulierung II für sehr wahrscheinlich hielten, konnte ich mit Versuchen zur Synthese dieses Stoffes beginnen. In Anschluß an meine Arbeiten über die Konstitution des Stigmasterins hatte ich bereits ähnliche Körper dargestellt, unter anderem auch das unwirksame Oxy-ke-ton vom Schmp. 194⁰, über dessen Synthese kürzlich A. Butenandt u. L. Mamoli⁵⁾ berichtet haben. Dieses Keton hatte ich schon etwa ein Jahr vor seiner Isolierung aus Corpora lutea in den Händen, und ich habe die betreffende Arbeit am 18. September an die Ztschr. physiol. Chem. geschickt. Sie ist bisher noch nicht erschienen. Der von mir gegangene Weg deckt sich mit dem von Butenandt und Mamoli.

Es war mir sofort klar, daß die von mir aus Stigmasterin (III) dargestellte 3-Oxy-bis-nor-cholensäure (IV) geeignet war, die für das Hormon vorgeschlagene Formel zu prüfen, und ich hielt es für wichtig, diese Prüfung selbst vorzunehmen. So hatte ich bereits Ende Juli festgestellt, daß die für die Arbeit so entscheidende Beobachtung, daß beim Stigmasterin (III) Brom sich vorwiegend an die Doppelbindung 5.6 addiert, so daß man die weitere Doppelbindung mit Ozon sprengen kann, auch auf das aus der Säure IV leicht zu erhaltende Diphenyl-äthyl-*en* V zutrifft. Die Selektivität der Addition ist noch viel größer, denn mehr als 1 Mol Brom wird kaum angelagert. Ein Tetrabromid läßt sich nicht gewinnen.

Es gelang mir jedoch nicht, bei der auf verschiedene Weise durchgeführten Dehydrierung des Oxy-ketons I mit Kupferbronze und Kupferoxyd oder bei Oxydation des Dibromids von I, das zweifellos in bedeutenden Mengen vorhandene Dehydrierungsprodukt II zu krystallisieren. Dies mußte einem Zufall überlassen werden, der dann auch schließlich eintrat bei Produkten, die durch Oxydation des Dibromids dargestellt waren.

¹⁾ B. 67, 1855 [1934].

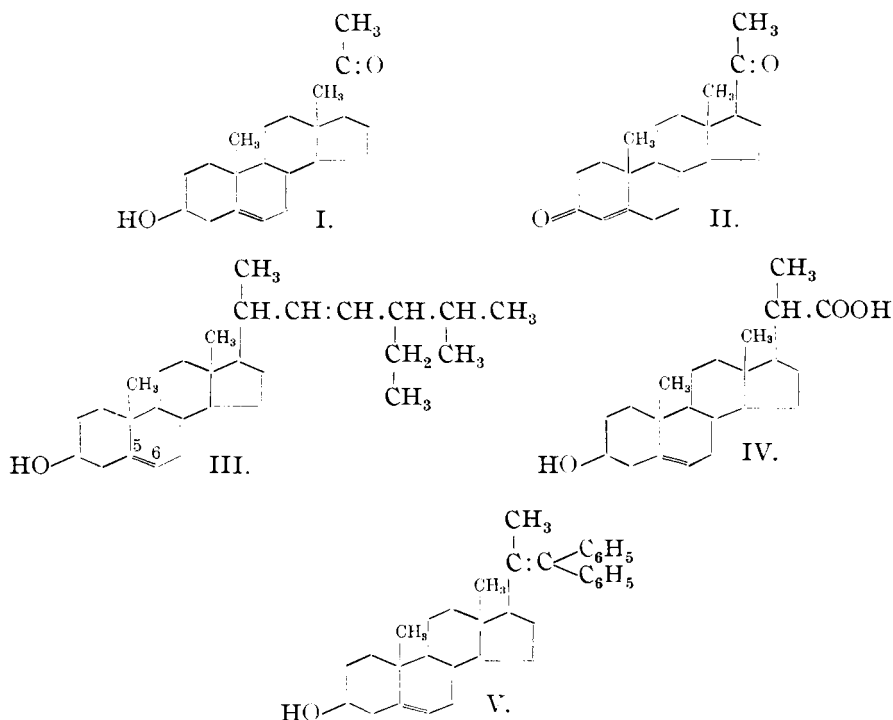
²⁾ B. 67, 1611 [1934].

³⁾ B. 67, 1625 [1934].

⁴⁾ B. 67, 1270 [1934].

⁵⁾ B. 67, 1897 [1934].

Inzwischen haben A. Butenandt und J. Schmidt⁶⁾ einen zweiten Weg gefunden, der von einem Sterin, dem Pregnandiol, zu demselben Diketon führt, so daß in kurzem Abstände zwei Synthesen durchgeführt worden sind.



Nachdem ich die Möglichkeit hatte, animpfen zu können, gelang mir seine Isolierung auch bei der Dehydrierung des Oxy-ketons I mit Kupferoxyd. Die Ausbeute war jedoch sehr schlecht. Zur Sicherung der Identität mit dem Corpus-luteum-Hormon war seine physiologische Prüfung unbedingt erforderlich, denn bei den zur Bildung von Misch-krystallen besonders leicht neigenden Sterinen war es nicht ausgeschlossen, daß das Hormon lediglich eine kleine Beimengung des Diketons darstellte. Die Prüfung des synthetischen Präparates, die inzwischen in der Pharmakologischen Abteilung der Firma E. Merck, Darmstadt, ausgeführt wurde, ergab jedoch eine hohe Wirksamkeit. Sie wurde nach den Angaben von A. Butenandt, U. Westphal und W. Hohlweg⁷⁾ ausgeführt, und die Kaninchen-Einheit zu 0.5 mg bestimmt, in befriedigender Übereinstimmung mit dem Naturstoff.

Wenn ich das Diketon aus trockenem Methanol umkrystallisierte, so beobachtete ich nur die Form vom Schmp. 129°; bei Anwendung von Alkohol-Wasser traten häufig Gemische auf. Eine vollständige Überführung gelang mir jedoch immer bei Anwendung eines Gemisches aus Alkohol, Wasser und Äther, wenn ich die Lösung durch einen Luftstrom einengte. Die dabei auftretende starke Abkühlung scheint die Bildung der niedrig schmelzenden

⁶⁾ B. 67, 1901 [1934].

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. 227, 87 [1934].

Modifikation zu begünstigen. Umkrystallisieren aus Methanol wandelte sie jedoch gleich wieder in die höher schmelzende Form um. Da A. Neuhaus⁸⁾ aus der Bestimmung der Molrefraktion geschlossen hatte, daß es sich um eine Form mit 1 Mol. Krystall-Wasser handle, habe ich mein „Luteosteron D“ in luft-trocknem Zustande verbrennen lassen. Der Kohlenstoffwert lag dann wohl 0.5 % zu niedrig, aber bei einem Gehalt von 1 H₂O müßte er 4.35 % zu niedrig sein. Bei beiden Modifikationen fand ich dieselbe spez. Drehung $[\alpha]_D + 200^0$ in Chloroform; O. Wintersteiner und W. M. Allen⁹⁾ geben für beide dasselbe Spektrum an. In gelöstem Zustande sind sie also wohl identisch und ein Unterschied in der physiologischen Wirksamkeit, wie ihn K. H. Slotta noch in seiner letzten Arbeit¹⁰⁾ findet, ist schwer vorstellbar.

Zur Sicherung der Identität mit dem Naturstoff habe ich noch eine krystallographische Untersuchung machen lassen. Sie wurde in dankenswerter Weise im hiesigen Mineralogischen Institut von Hrn. cand. phys. W. Schütz ausgeführt und ergab beim Luteosteron C eine gute Übereinstimmung mit den letzten Werten von A. Neuhaus⁸⁾, während beim Luteosteron D wegen technischer Schwierigkeiten eine sichere Identifizierung nicht möglich war.

Das Spektrum des synthetischen Hormons habe ich bisher nur in einer Hartley-Baly-Aufnahme untersucht. Eine 0.01-proz. Lösung in Alkohol zeigte eine Absorption, die mit einer Lösung von Cholestenon derselben molaren Konzentration (0.0122 %) weitgehend übereinstimmte. An dieser Stelle sei bemerkt, daß Cholestenon auch in einer Dosis von 20 mg noch keine Wirkung als Corpus-luteum-Hormon aufwies.

Beschreibung der Versuche.

Den Abbau der 3-Oxy-bisnor-choleensäure bis zum Oxy-keton I, der bereits von A. Butenandt²⁾ beschrieben ist, brauche ich hier nicht zu wiederholen, da ich die gemachten Angaben im wesentlichen bestätigen kann.

Oxydation als Dibromid: 1.34 g des Oxy-ketons I wurden in 50 ccm gelöst und 0.68 g Brom in 30 ccm Chloroform aus einer Bürette in dünnem Strahle zulaufen gelassen. Das Lösungsmittel wurde dann bei 30° im Vak. abgedampft und das zurückbleibende Harz in 40 ccm Benzol gelöst. Diese Lösung wurde mit 30 ccm 5-proz. Kaliumpermanganat und 10 ccm 20-proz. Schwefelsäure 8 Stdn. geschüttelt. Der entstandene Braunstein wurde durch vorsichtigen Zusatz von schwefliger Säure gelöst und die Benzol-Schicht abgetrennt. Der wäßrige Teil wurde noch einmal mit Äther ausgeschüttelt. Äther- und Benzol-Lösung wurden vereinigt und nach Zusatz von 1 g Zinkstaub und 20 ccm Eisessig am absteigenden Kühler erhitzt, bis kein Destillat mehr überging. Zur Vervollständigung der Entbromung wurde der Rückstand nach Zugabe von 1 ccm Wasser noch 1/2 Stde. unter Rückfluß gekocht. Das organische Material wurde in Äther aufgenommen und durch Schütteln mit verd. Natronlauge von der geringen Menge saurer Oxydationsprodukte befreit. Der Äther hinterließ beim Verdampfen ein mit Krystallen durchsetztes Harz. Dies wurde 10 Min. mit 10 ccm Essigsäureanhydrid gekocht, um zu verhindern, daß gleichzeitig mit dem Diketon auch unverändertes Ausgangsmaterial auskrystallisierte. Nach Zerstörung

⁸⁾ B. **67**, 1627 [1934].

⁹⁾ Journ. biol. Chem. **107**, 321 [1934].

¹⁰⁾ B. **67**, 1977 [1934].

des Anhydrids mit Wasser wurde das Harz in wenig Methanol gelöst, woraus sich bald Krystalle abzuscheiden begannen: 0.6 g vom Schmp. 115° (unscharf). Es wurde bis zur Konstanz von Schmp. und Drehung aus Methanol umkrystallisiert. Charakteristische kurze Prismen vom Schmp. 129°; leicht löslich in den meisten Lösungsmitteln, weniger leicht in Petroläther.

15.5 mg Sbst., in 2 ccm Chloroform: $\alpha_D = +1.55^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = +200^\circ$.

4.681 mg Sbst.: 13.720 mg CO₂, 3.980 mg H₂O.

C₂₁H₃₀O₂. Ber. C 80.20, H 9.62. Gef. C 79.94, H 9.51.

Dioxim: 40 mg Substanz wurden mit 0.2 g Hydroxylamin-Hydrochlorid, 0.25 g Natriumacetat und 20 ccm absol. Alkohol 2 Stdn. gekocht. Das Oxim wurde dann mit Wasser ausgefällt und aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Kleine Blättchen, die bei raschem Erhitzen bei 246—248° schmolzen.

2.878 mg Sbst.: 0.206 ccm N (24°, 753 mm).

C₂₁H₃₂O₂N₂. Ber. N 8.13. Gef. N 8.15.

Ein einheitliches Semicarbazon ließ sich nicht gewinnen. Ein nach der üblichen Methode erhaltenes, nicht krystallines Pulver war in den üblichen Lösungsmitteln fast unlöslich.

Überführung in die Modifikation vom Schmp. 121°: 50 mg des Diketons vom Schmp. 129° wurden in wenig Alkohol gelöst und die bei Zusatz etwa des halben Volumens Wasser eingetretene Fällung mit Äther wieder in Lösung gebracht. Durch Übersaugen von Luft wurde die Lösung dann eingengt, wobei sich dünne Nadeln abschieden. Schmp. 121°.

6.6 mg Sbst., in 2 ccm Chloroform: $\alpha_D = +0.66^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = +200^\circ$.

4.612 mg Sbst. (luft-trocken): 13.480 mg CO₂, 3.970 mg H₂O.

C₂₁H₃₀O₂. Ber. C 80.20, H 9.62. Gef. C 79.71, H 9.63.

Dehydrierung mit Kupferoxyd: 0.5 g Oxy-keton wurden in einer kleinen Retorte mit 1.5 g nicht zu feinem Kupferoxyd in einem Salzbad 20 Min. auf 310° erwärmt. Hierbei entwickelte sich eine merkliche Menge Wasser. Im Hochvakuum wurde die Substanz dann abdestilliert und die Destillation noch einmal wiederholt. Das Destillat (0.3 g) wurde in wenig Methanol gelöst und mit dem Diketon vom Schmp. 129° angeimpft. Nach mehreren Tagen setzte eine langsame Krystallisation ein. Ausbeute an noch nicht ganz reinem Produkt etwa 20 mg. Bei kürzerer Einwirkungszeit blieb ein zu großer Teil der Substanz unverändert.

Physiologische Prüfung.

Ausführung nach den Angaben von Butenandt⁴⁾. Ölige Lösung, von der 1 ccm 1 mg Substanz enthält.

0.1 mg Kaninchen	1 Stadium	0	0.5 mg Kaninchen	6 Stadium	3
0.1 „ „	2 „	0—1	1.0 „ „	7 „	3
0.25 „ „	3 „	1—2	1.0 „ „	8 „	3
0.5 „ „	4 „	2	1.0 „ „	9 „	3
0.5 „ „	5 „	2—3			

Nach der Definition Butenandts liegt die Kaninchen-Einheit bei 0.5 mg.

Mikro-krystallographische Untersuchung (W. Schütz).

Diketon vom Schmp. 129°: Habitus: Kurz-säulige Prismen. Spaltet ausgezeichnet in dünnen, rechteckigen Tafeln. Optische Bestimmung: Starke Doppelbrechung. Auslöschungs-Richtungen parallel den Spaltrissen. Optisch 2-achsig, positiv doppelbrechend.

Nach Schätzungen aus den Krümmungen des Achsen-Balkens beträgt der Achsen-Winkel 2V ungefähr 30—40°.

Die optische Orientierung war meistens so, daß die Spaltstückchen bei konoskopischer Betrachtung die erste Mittellinie γ mitten im Gesichtsfeld erkennen lassen. Bestimmung des Brechungsquotienten α und β für Na-Licht: Als Einbettungs-Flüssigkeit diente eine wäßrige Lösung von Kalium-Quecksilberjodid.

$$n_{\alpha} = 1.543 \pm 0.003; \quad n_{\beta} = 1.552 \pm 0.003$$

γ ließ sich wegen Fehlens einer geeigneten Einbettungs-Flüssigkeit nicht bestimmen.

Der vorliegende Befund läßt rhombische Symmetrie erkennen und widerspricht nicht den mitgeteilten Daten über Luteosteron C.

Diketon vom Schmp. 121°: Habitus: Nadelförmige Krystalle. Wegen einer ausgezeichneten Spaltbarkeit traten immer lineal-förmige Krystalle auf, die eine eindeutige Bestimmung mit dem Mikroskop nicht zuließen. Optische Bestimmung: Die Spaltplättchen zeigten starke Doppelbrechung, 2-Achsigkeit und Auslöschungs-Richtungen parallel zu Spaltrissen. Der Charakter der Doppelbrechung konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Zwei Brechungsquotienten konnten bestimmt werden für Na-Licht. Es diente auch hier wieder eine wäßrige Lösung von Kalium-Quecksilberjodid als Einbettungsmittel.

$$1. \quad n = 1.530 \pm 0.003 \quad 2. \quad n = 1.580 \pm 0.003.$$

Der dritte, höhere Brechungsquotient konnte nicht bestimmt werden aus oben schon erwähnten Gründen.

Der Befund deutet auf rhombische Symmetrie. Die Brechungsquotienten 1 und 2 decken sich sehr gut mit den angegebenen Werten für Luteosteron D für α und β .

Der Firma E. Merck, Darmstadt, bin ich für die vielseitige Unterstützung dieser Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

405. Georg Hahn und Hermann Ludewig: Synthese von Tetrahydro-harman-Derivaten unter physiologischen Bedingungen, I. (vorläuf.) Mitteil.¹⁾

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Frankfurt a/M.]

(Eingegangen am 13. November 1934.)

Nachdem wir, zusammen mit E. Kappes²⁾ die Konstitutionsformel des Yohimbins bis auf die Stellung der Hydroxylgruppe ermittelt hatten, gingen wir dazu über, diese letzte Unklarheit auf synthetischem Wege zu beseitigen. Am einfachsten erschien es zunächst, die Synthese des Yohimbols (II) in Angriff zu nehmen, das Hahn und Stenner³⁾ durch Decarboxylierung von Yohimboasäure erhalten hatten, und in dem sich das Hydroxyl entweder in Stellung 17, 18 oder 19 befinden kann.

¹⁾ C. Schöpf hat sich A. 513, 195 [1934] die Kondensation von Tryptamin mit Acetaldehyd unter physiologischen Bedingungen vorbehalten. Da wir diese Kondensation bereits ausgeführt hatten — was wir Hrn. Schöpf brieflich mitgeteilt haben — sehen wir uns zu dieser vorläufigen Mitteilung veranlaßt.

²⁾ G. Hahn, E. Kappes u. H. Ludewig, B. 67, 686 [1934].

³⁾ G. Hahn u. W. Stenner, B. 61, 278 [1928].