

entstehende Fehler vernachlässigt werden kann. Dieser Fehler käme bei der Vergleichsmessung zwischen der alkalischen und der sauren Lösung in das Resultat, weil bei diesem Vergleich vorausgesetzt wird, dass bei gleicher Extinktion in beiden Lösungen die Konzentration des Dinitrophenolations die gleiche ist. Wenn aber die Extinktion in der sauren Lösung zu einem nicht zu vernachlässigenden Bruchteil durch die nicht-dissoziierten Moleküle bedingt wäre, während die Lichtabsorption in der alkalischen Lösung nur von dem Ion herrührt, würde, wenn der Extinktionskoeffizient der Moleküle gegenüber demjenigen der Ionen nicht genügend klein ist, ein zu grosser Wert für die Konzentration des Dinitrophenolations und damit des Anteils an Wasserstoffionen, der von dem Dinitrophenol herröhrt, in die Rechnung eingesetzt. Die Durchrechnung zeigt, dass dieser Fehler bei der Benzoesäure vernachlässigt werden kann. Bei der Jodsäure und erst recht bei der Trichloressigsäure spielt dies ja nach dem oben Gesagten keine Rolle, da hier der ganze Beitrag an Wasserstoffionen, der von dem Indikator herröhrt, nur eine kleine Korrekturgrösse dargestellt.

Natürlich wäre es zu mühsam, die Konzentration einer Vergleichslösung so lange abzuändern, bis die beiden Extinktionen einander innerhalb der Messgenauigkeit der Methode gleich sind. Man begnügt sich damit, je eine Konzentration zu finden, die genügend nahe oberhalb, bzw. unterhalb, des richtigen Wertes liegt und interpoliert dann linear¹⁾.

Auch bei diesen Messungen hat sich das kürzlich beschriebene²⁾ Netzanschlussgerät sehr gut bewährt.

Zürich, Physikalisch-Chemisches Institut der Universität.
Oktober 1944

205. Über Steroide.

37. Mitteilung³⁾.

Konstitution und Synthese hochwirksamer Abkömmlinge östrogener Hormone⁴⁾

von K. Miescher.

(12. X. 44.)

Anlässlich ihrer ersten Untersuchungen über die Konstitution östrogener Hormone erhielten 1932 *Marrian* und *Haslewood*⁵⁾ und kurz darauf auch *Doisy* und Mitarbeiter⁶⁾ bei der Kalischmelze des Oestriols (Ia) neben anderen Produkten eine Dicarbonsäure $C_{18}H_{22}O_5$ (IIa), die sich mit Acetanhydrid leicht zu IIIb anhydrisieren liess

¹⁾ *v. Halban, H. und Ebert, L., Z. physikal. Ch.* **112**, 359 (1924). Das Prinzip der „Feinkolorimetrie“.

²⁾ *Keller, H. und v. Halban, H., Helv.* **27**, 702 (1944).

³⁾ 36. Mitteilung siehe *Helv.* **27**, 1153 (1944).

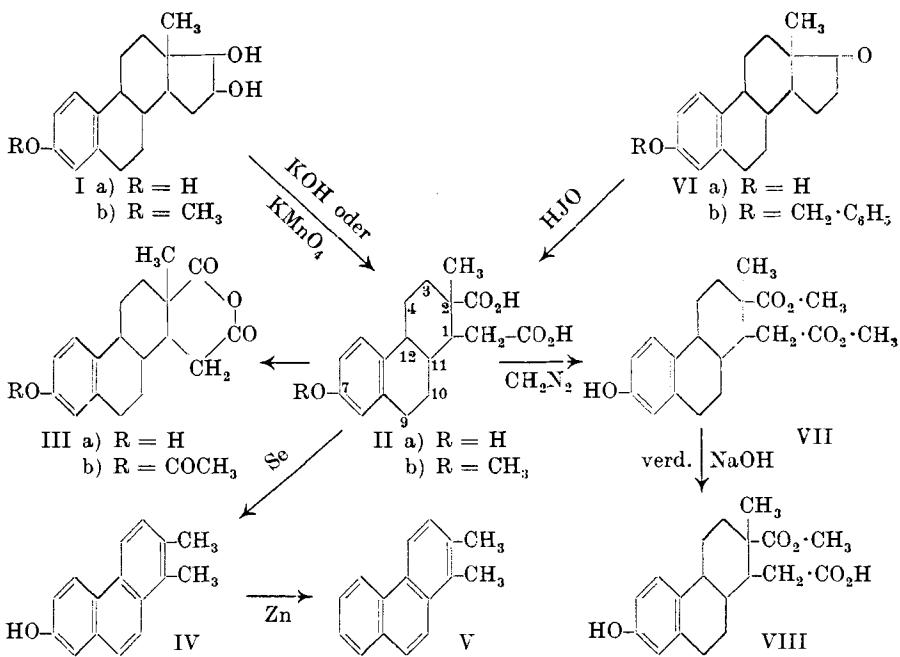
⁴⁾ Vorgetragen an der Jahresversammlung der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft vom 3. September 1944.

⁵⁾ *G. F. Marrian und G. Haslewood, J. Soc. Chem. Ind.* **51**, II, 279 T. (1932).

⁶⁾ *D. W. Mac Corquodale, S. A. Thayer und E. A. Doisy, J. Biol. Chem.* **99**, 327 (1933).

und die durch Aufspaltung eines 5-Ringes zwischen benachbarten Carbinolgruppen entstanden sein musste. *Butenandt*¹⁾ und Mitarbeiter konnten sie 1933 durch Dehydrierung mit Selen in ein Dimethyl-phenanthrol (IV) und dieses durch Destillation mit Zinkstaub in ein Dimethyl-phenanthren überführen. Durch Vergleich mit einem auf rein synthetischem Wege gewonnenen Produkt wurde es als 1,2-Dimethyl-phenanthren (V) erkannt. Damit waren die kurz zuvor von *Butenandt* aufgestellten Konstitutionsformeln für Oestron und Oestriol weitgehend gesichert.

*Doisy*²⁾ und Mitarbeitern gelang es bald darauf, durch Oxydation des Methyläthers des Oestriols (Ib) mit Permanganat auch die entsprechende am Phenolhydroxyl methylierte Dicarbonsäure (IIb) herzustellen. Erstmalig beschrieben sie die Bildung einer Monocarbonsäure C₁₇H₂₂O₃ vom Smp. 195° durch Kalischmelze von Oestron (VIa). Diese Säure scheint auch *Weidlich*³⁾ im Laboratorium von *Butenandt* isoliert zu haben, doch gelang es ihm nicht, sie analysenrein zu erhalten.



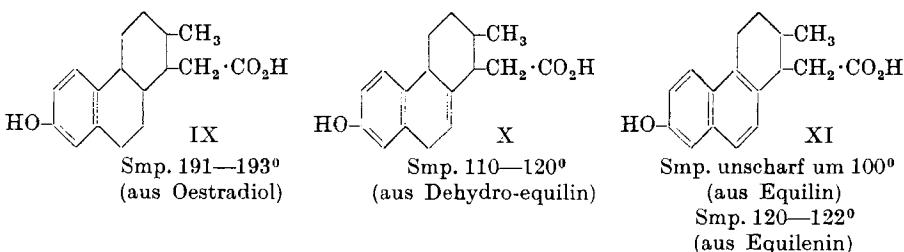
¹⁾ A. *Butenandt*, H. A. *Weidlich* und H. *Thompson*, B. **66**, 601 (1933); J. Soc. Chem. Ind. **52**, I, 289 (1933); siehe auch H. A. *Weidlich*, Inauguraldiss., Göttingen 1934.

²⁾ D. W. *Mac Corquodale*, L. *Lewin*, S. A. *Thayer* und E. A. *Doisy*, J. Biol. Chem. **101**, 753 (1933); siehe auch U. S. A.-Patent Nr. 2069096 vom 9. 8. 33.

³⁾ H. A. *Weidlich* l. c. Die Analyse ergab „unterschiedliche“ Werte.

Auffallenderweise behaupteten die amerikanischen Autoren, dass den aus Oestriol und Oestron gewonnenen Carbonsäuren im Oestrustest an der Ratte eine Wirksamkeit zukomme, die diejenige von Oestron um ein Mehrfaches übertreffe, wenn sie auch etwas verspätet auftrete. In den folgenden Jahren wurde aber diese Angabe widerufen. Die Schwellendosis der Dicarbonsäure betrage etwa 300 γ , während sie für Oestron bei 0,7 γ liegt¹⁾.

1937 und 1939 meldeten *Hohlweg* und *Inhoffen* von der Firma *Schering*²⁾ Verfahren zum Patent an, wonach durch Behandeln von Oestradiol und von Dihydro-equilin, aber auch von Equilenin und Equilin mit schmelzendem Kali die gleiche oder ähnliche Monocarbonsäuren erhalten werden, wie aus Oestron. Per os solle die Schwellendosis an der Ratte bei diesen Verbindungen zwischen 1 und 6 γ betragen, während bei oraler Zufuhr 20—30 γ Oestron erforderlich sind. Alle diese Säuren erfuhren bisher keine nähere Charakterisierung. Ihre Konstitution soll nach den Patenten vermutlich den Formeln IX—XI entsprechen.



Nach dieser Formulierung handelt es sich um Monocarbonsäuren der C₁₇-Reihe. Sie wären durch Verlust von einem Kohlenstoffatom aus den östrogenen Hormonen, zum Teil unter partieller Dehydrierung des Ringsystems, entstanden. Offenbar ist daran gedacht, dass der 5-Ring unter Bildung einer Dicarbonsäure oxydativ aufgespalten wird, die dann unter Verlust von einem CO₂ in die Monocarbonsäure übergehen würde. Unverständlich blieb aber, wieso bei der Bildung der Dicarbonsäure (IIa) durch Kalischmelze des Oestriols keine CO₂-Abspaltung eintritt.

Zur Abklärung aller noch offenen Fragen drängte sich daher eine gründliche experimentelle Überprüfung des Tatbestandes in chemischer und biologischer Beziehung auf.

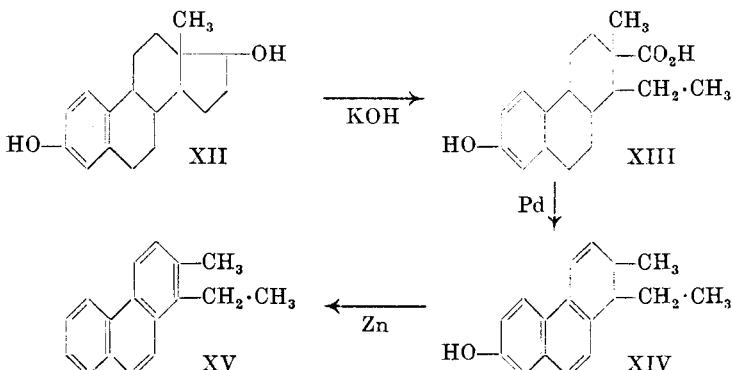
Die dem Oestriol entsprechende Dicarbonsäure entstand in besonders einfacher Weise aus Oestron-benzyläther (VIb) durch Auf-

¹⁾ *S. A. Thayer, D. W. MacCorquodale und E. A. Doisy, J. Pharmacol. exp. Therap.* **59**, 48 (1937); siehe auch schon *MacCorquodale, L. Levin und S. A. Thayer, J. Biol. Chem.* **105**, LV (1934).

²⁾ *Schering A.G., Berlin (W. Hohlweg und H. H. Inhoffen)*, D.R.P. 705862 vom 19. 12. 37 und 719572 vom 20. 1. 39.

spaltung des 5-Rings mit Hypojodit und hydrierende Abtrennung der Benzylgruppe. Die reine Säure schmolz bei $217-218^{\circ}$ ¹⁾. In ähnlicher Weise wurde auch aus Equilenin-benzyläther eine Dicarbonsäure vom Smp. $252-254^{\circ}$ gewonnen. Beide Carbonsäuren liessen sich leicht durch blosses Erhitzen in ihre Anhydride (z. B. IIIa) überführen. Die freien Säuren gaben mit Diazomethan Dimethylester (z. B. VII), deren eine Methylgruppe besonders glatt verseifbar war. Offenbar wird dabei nur die primär gebundene Carbomethoxygruppe (Formel VIII) angegriffen. Die Konstitution der Dicarbonsäuren erscheint genügend gesichert. Es handelt sich um die 2-Carboxy-2-methyl-7-oxy-1,2,3,4,9,10,11,12-octahydro- und die 2-Carboxy-2-methyl-7-oxy-1,2,3,4-tetrahydro-phenanthryl-2-essigsäure. Erstere sei nach ihrem Entdecker *Marrian* kurz als Marrianolsäure, letztere als Bisdehydro-marrianolsäure bezeichnet. Beide Marrianolsäuren erwiesen sich im Oestrustest an der Ratte bis zu Dosen von 100γ und darüber in Bestätigung der revidierten Ergebnisse von *Doisy* und Mitarbeitern als völlig unwirksam.

Hierauf wurde das Oestradiol (XII) der Alkalischmelze unterworfen und in etwa 47-proz. Ausbeute eine noch unreine Carbonsäure erhalten, die nach mehrfachem Umkrystallisieren bei $197-198,5^{\circ}$ schmolz. Die Analyse erlaubte zunächst nicht sicher, zwischen der bisher angenommenen Formel $C_{17}H_{22}O_3$ oder der Formel $C_{18}H_{24}O_3$ zu unterscheiden. Doch sprach die Analyse ihres Methylesters, wie auch seines 3-Benzoylderivats eindeutig zugunsten der Formulierung mit 18 C-Atomen. Die Carbomethoxygruppe erwies sich als schwer verseifbar. Erst durch schmelzendes Kali wird sie aufgespalten. Anderseits liess sich die freie Carbonsäure durch alkoholische Salzsäure nicht verestern. Dies spricht eindeutig gegen die Formulierung von *Hohlweg* und *Inhoffen* der Monocarbonsäuren als Hydrophenanthryl-1-essigsäuren.

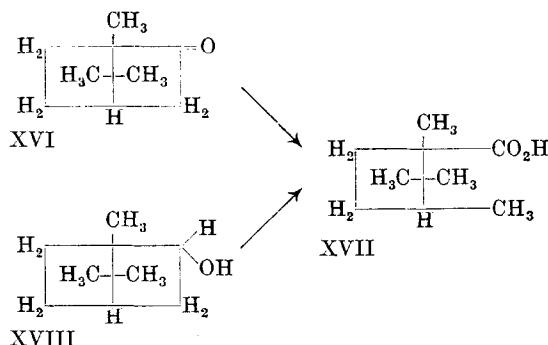


¹⁾ Bisher höchster Smp. nach Literatur (*Doisy*) $210-211^{\circ}$ (korr.).

Endgültige Aufklärung brachte die Dehydrierung mit Palladiumkohle. Die Formulierung der amerikanischen und deutschen Forscher liess die Bildung von 1,2-Dimethyl-7-phenanthrol bzw. 1,2-Dimethyl-phenanthren wie bei der Dicarbonsäure aus Oestriol erwarten. In Wirklichkeit entstand ein Äthyl-methyl-phenanthrol (XIV), das sich mit Zinkstaub in 1-Äthyl-2-methyl-phenanthren (XV) vom Smp. 80–81° überführen liess. Letzteres erwies sich mit einem von R. D. Haworth auf synthetischem Wege dargestellten Präparat als identisch¹⁾.

Der Monocarbonsäure, wir wollen sie nach ihrem Erstentdecker Doisynolsäure nennen, muss somit die Formel XIII einer 1-Äthyl-2-methyl-7-oxy-1,2,3,4,9,10,11,12-octahydro-phenanthryl-2-carbonsäure zukommen. Sie entsteht offenbar durch oxydierende Aufspaltung des 5-Rings des Oestradiols oder durch hydrolytische Öffnung des 5-Rings des Oestrons.

Diese Reaktion erfolgt nicht ganz unerwartet, konnte doch schon Delalande²⁾ vor mehr als 100 Jahren durch Überleiten von dampfförmigen Campher (XVI) über ein Kalikalkgemisch bei 300–400° die Campholsäure (XVII) derselben Kohlenstoffatomzahl bereiten. Später gewann Guerbet³⁾ diese Säure auch durch Kalischmelze von Borneol (XVIII). Auch hier tritt ganz analog im einen Fall eine hydrolysierende, im anderen eine oxydierende Spaltung des 5-Rings ein, und die Öffnung des Rings findet vorzugsweise zwischen dem tertiär gebundenen Carbonyl bzw. Carbinol und der benachbarten CH₂-Gruppe statt.



Wichtig ist nun der Befund, dass die Doisynolsäure in Bestätigung der alten, wenn auch widerrufenen Angaben von Doisy im Oestrustest an der Ratte hervorragend wirksam ist. Bei subkutaner Applikation erreicht die Säure mit 0,7 γ—1 γ nahezu die Wirksamkeit des

¹⁾ R. D. Haworth, Soc. 1934, 460. Der Vergleich wurde durch Haworth selbst durchgeführt, wofür ihm auch an diesem Ort bestens gedankt sei.

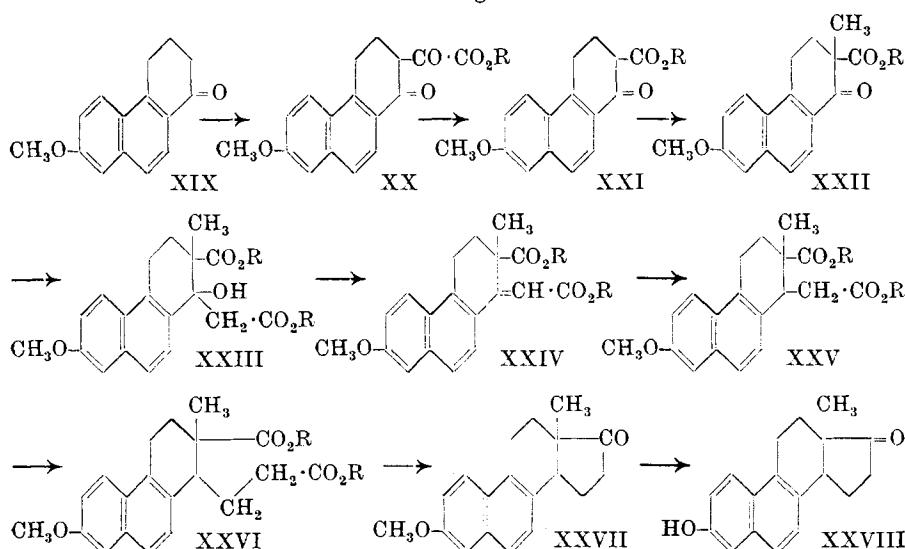
²⁾ Z. Delalande, A. 38, 337 (1841).

³⁾ M. Guerbet, C. r. 147, 70 (1908).

Oestrons. Oral beträgt die Schwellendosis blos 1,5 γ, in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Hohlweg* und *Inhoffen*, die einen Schwellenwert von 2,5 γ angeben.

Durch Kalischmelze von Equilenin oder Dihydro-equilenin entstehen offenbar Säuren ähnlicher Wirkungsgrösse wie aus Oestron oder Oestradiol. Hier bereitet aber die Reindarstellung besondere Schwierigkeiten. Wie wir uns überzeugen konnten, gelingt ebenfalls der Abbau zu 1-Äthyl-2-methyl-7-phenanthrol. Zweifellos liegt eine Bisdehydro-doisynolsäure vor, die vier Wasserstoffatome weniger als die Doisynolsäure enthält.

In Anbetracht des teuren Ausgangsmaterials und der beschränkten Ausbeute kam eine praktische Verwertung der Doisynolsäuren nicht in Betracht. Die Aufklärung ihrer Konstitution erlaubte es aber, hier mit Erfolg den Weg des künstlichen Aufbaus zu beschreiten. Diese Aufgabe wurde durch die schöne Synthese des Equilenins durch den Schweizer *Bachmann*¹⁾ in U.S.A. ausserordentlich erleichtert. Sie geht von dem von *Butenandt*²⁾ 1935 aus Cleve-Säure gewonnenen 1-Keto-7-methoxy-tetrahydro-phenanthren (**XIX**) aus und wird durch die Formeln **XIX**–**XXVIII** gekennzeichnet.

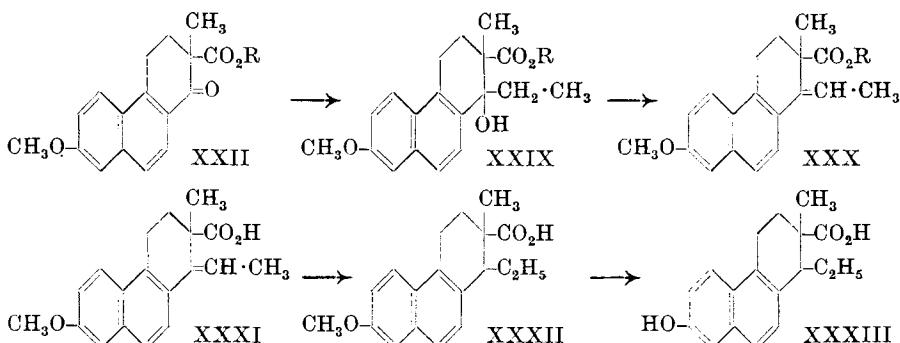


Anstatt mit Bromessigester nach *Reformatsky* wurde der 1-Keto-2-methyl-7-phenanthrol-2-carbonsäure-ester (**XXII**) mit Äthyl-magnesiumbromid umgesetzt. Glücklicherweise reagierte das *Grignard*-Reagens blos mit der Ketogruppe und lieferte ein tertiäres Carbinol (**XXIX**). Durch Wasserabspaltung ging daraus der Ester (**XXX**)

¹⁾ *W. E. Bachmann* und Mitarbeiter, Am. Soc. **61**, 974 (1939); **62**, 824 (1940).

²⁾ *A. Butenandt* und *G. Schramm*, B. **68**, 2083 (1935).

einer β,γ -ungesättigten Säure hervor. Dieser wurde verseift und die gebildete Säure (XXXI) katalytisch hydriert. Die entstandene 7-Methoxy-carbonsäure (XXXII) konnten wir auf verschiedenen Wegen in die gesuchte freie 1-Äthyl-2-methyl-7-oxy-1,2,3,4-tetrahydrophenanthryl-2-carbonsäure (XXXIII), die Bisdehydro-doisynolsäure, überführen.



Infolge der zwei Asymmetriezentren des Phenanthrenskeletts bilden sich jeweils Isomere, doch soll hier auf die zahlreichen von uns isolierten Zwischenprodukte und auch auf gewisse weitere Synthesevarianten nicht eingetreten werden. Wie erwartet, liessen sich zwei Racemate isolieren. Sie schmolzen bei 204–205° und 235–238°. Wir bezeichnen sie als normale und als iso-Bisdehydro-doisynolsäure, wobei vermutlich der normalen Säure die trans-, der Isosäure die eis-Konfiguration zukommt. Beide Säuren sind schwer veresterbar und schwierig wieder verseifbar. Immerhin ist die sterische Hinderung hier etwas geringer als bei der Doisynolsäure selbst.

Über die Wirkung der neuen Verbindung bei subcutaner und oraler Applikation im Oestrustest an der Ratte orientiert folgende Tabelle:

Schwellenwerte im Oestrustest (Ratte).

| | subcutan | oral |
|---|------------|-----------|
| n-Dehydro-doisynolsäures Natrium (rac.) . . . | 0,1–0,15 γ | 0,1–0,2 γ |
| Methyl-ester | 0,1–0,15 | 0,1–0,2 |
| iso-Dehydro-doisynolsäures Natrium (rac.) . . . | > 100 | — |
| Doisynolsäure (aus Oestradiol) | 0,7–1,0 | 1,5 |
| Oestron | 0,7 | 20–30 |
| Oestradiol | 0,3–0,4 | 20–30 |
| Diäthyl-stilböstrol | 0,3–0,4 | 0,7–1,0 |

Es ist daraus ersichtlich, dass die rein synthetische normale Dehydro-doisynolsäure vom Smp. 204–205° alle bisher bekannten Verbindungen mit östrogener Wirkung, sowohl die natürlichen als

auch die künstlichen, ja selbst die optisch aktive Doisynolsäure übertrifft. Das gleiche gilt für ihren Methylester, während die isomere Säure anscheinend wirkungslos ist. Es besteht hier dasselbe Verhältnis wie zwischen Equilenin und Iso-equilenin nach Bachmann¹⁾. Bei subcutaner Applikation zeigt die Dehydro-doisynolsäure eine Wirkungsverbesserung um mehr als das Doppelte gegenüber Oestradiol oder Stilboestrol und etwa um das 3-fache im Vergleich zu Oestron. Oral ist der Unterschied noch sehr viel beträchtlicher, da hier die Dehydro-doisynolsäure die gleiche Wirkung zeigt wie subcutan, dagegen die der natürlichen Hormone, aber auch des Stilboestrols, stark abfällt.

Während bei der Austestierung östrogener Hormone, besonders in wässriger Lösung, die Dosis mehrfach unterteilt werden muss, wurde mit der normalen Dehydro-doisynolsäure schon bei einmaliger Applikation eine volle Wirkung erzielt. Schon dies sprach dafür, dass letztere anhält. Diese Annahme wurde durch die Bestimmung der Oestrusdauer an der Ratte bestätigt. Die Kurven der Fig. 1 geben

die Dauer in Tagen bei wachsender Dosis an. Die Dosis (γ) ist in logarithmischem Maße aufgetragen. Wiederum besteht Übereinstimmung zwischen subcutaner und oraler Wirkung bei der synthetischen Säure. Interessant erscheint der geradlinige Verlauf im untersuchten Intervall. Schon subcutan wirkt die Säure länger wie die Hormone oder Stilboestrol, die bei diesem Test übereinstimmen. Besonders auffällig ist der Unterschied bei oraler Applikation, wo die Dehydro-doisynolsäure die natürlichen Hormone und auch das Stilboestrol, die auch hier unterscheiden nicht differieren, weit hinter sich lässt. Dies ist darum überraschend, weil im allgemeinen die wasserlöslichen Derivate der Sexualhormone nur eine flüchtige Wirkung aufweisen.

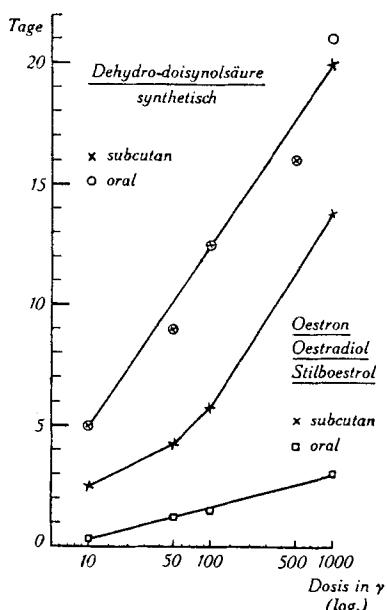


Fig. 1.
Oestrusdauer in Tagen (Ratte)

Vorliegende Synthese erlaubt es natürlich auch, Homologe und Analoge der Doisynolsäuren herzustellen. Auch dieser Weg ist beschritten worden. Hierüber wird später zu berichten sein.

¹⁾ W. E. Bachmann, I. c.

Neuartige Befunde vorliegender Art bedeuten selbstverständlich keinen Abschluss, sondern geben zu einer Fülle weiterer Fragestellungen Anlass. Hier sei bloss auf zwei Aspekte hingewiesen. Das Vorkommen von Oestron, Oestradiol oder Oestriol ist erst in wenigen Tierarten nachgewiesen worden. Möglicherweise bedient sich die Natur in andern Fällen selbst der hochwirksamen Doisynolsäuren. Vielleicht kommen auch die bisher bekannten Hormone, zum mindestens teilweise, erst nach ihrer hydrolytischen (oder dehydrierenden) Aufspaltung zur Wirkung. Sie würden damit bloss Vorstufen der eigentlichen Hormone darstellen.

Anderseits ist es auffällig, dass nur geringe Mengen exogen eingeführter Hormone wieder ausgeschieden werden. Kürzliche Untersuchungen durch v. Wattenwyl¹⁾ an der Zürcher Frauenklinik zeigen, dass es oft nur Bruchteile von Prozenten bis wenige Prozente sind. Wäre es nicht möglich, dass der Abbau über die unwirksamen Dicarbonsäuren führt? Ein Übergang einer Marrianol- zu einer Doisynolsäure oder umgekehrt im Tierkörper scheint dagegen wenig wahrscheinlich. Jedenfalls wird man in Zukunft im Harn und Blut nach dem Vorkommen beiderlei Säuren zu suchen haben.

Mit der Erkenntnis, dass auch gewissen Oxy-phenanthrylcabonsäuren ausgesprochen östrogene Wirkung zukommt, ja mit der Dehydro-doisynolsäure alle bekannten Verbindungen übertroffen werden, erfährt das vielgestaltige Problem des Zusammenhangs zwischen Konstitution und hormonaler Wirkung eine neue und interessante Wendung. Von einer Erklärungsmöglichkeit stehen wir immer noch weit entfernt.

In folgenden Arbeiten werden die erzielten experimentellen Ergebnisse ausführlicher dargelegt werden. Hieraus wird auch der Anteil der Mitarbeiter, insbesondere der Herren Drs. Heer und Billeter hervorgehen. Über die ausgedehnten tierexperimentellen Befunde wird andernorts berichtet.

Wissenschaftliche Laboratorien der *Ciba*, Basel.
Pharmazeutische Abteilung.

¹⁾ v. Wattenwyl, Schweiz. med. Wschr. **74**, 160 (1944).