

mid⁶ gives the dione⁷ (II; $n = 1$), b.p. 180–185° (0.01 mm), $\lambda_{\max}$ 249 m μ (ϵ 9000). With polyphosphoric acid at 60° the latter is cyclised to the diene (III) which we⁸ have previously converted to oestrone. A similar alkylation of $\Delta^{16(10)}$ -9-methyloctalin-1,6-dione (I; $n = 2$)⁹ gives the dione (II; $n = 2$)¹⁰ (not obtained pure) since selective sodium borohydride reduction¹¹ followed by reduction with lithium and ammonium chloride in liquid ammonia, oxidation by chromium trioxide in pyridine and chromatography gives the dione (IV; $n = 1$), m.p. 91–92°, previously synthesised by an unambiguous route¹⁰. Cyclisation of this dione with polyphosphoric acid at 80° gives ($\pm$)-D-homoequilenin methyl ether², m.p. 209–212° (¹², m.p. 212–214°), $\lambda_{\max}$ (ethanol) 258, 268, 278, 308, 320 and 334 m μ (ϵ 4200, 5350, 5450, 1000, 1600 and 2000, respectively), semicarbazone m.p. 245° (¹², m.p. 245°).

The dione (II; $n = 1$) is also obtained by refluxing the trione (V)¹⁰ with trimethylammonium benzoate in xylene, and is converted by sodium borohydride reduction¹¹ to the ketol (VI), m.p. 88–90°. Hydrogenation over 10% palladised charcoal in ethanol and oxidation with chromium

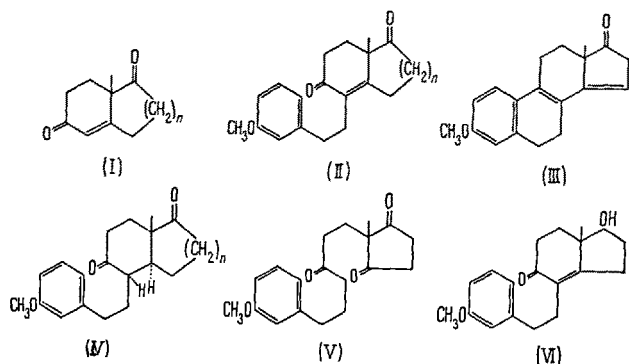
hydroindane system by catalytic hydrogenation of the ketol (VI) is notable in view of the failure¹³ of the analogue lacking the 4-substituent to give any of the corresponding *trans*-ketol under the same conditions. Reduction of ($\pm$)-9(11)-dehydroestrone methyl ether with lithium or potassium and ammonium chloride in liquid ammonia or with hydrogen over palladium black in ethanol, followed by oxidation with chromium trioxide in acetone¹⁴ gives ($\pm$)-oestrone methyl ether, m.p. 141–143° (¹⁵, m.p. 143–144°).

The trione (V) with pyridine hydrochloride at 220° for 30 min is converted to ($\pm$)-isoequilenin, m.p. 222–223° (¹⁶, m.p. 223–224°), $\lambda_{\max}$ (ethanol) 267, 277, 289, 325, and 338 m μ (ϵ 6500, 6600, 4000, 2000 and 2350, respectively).

Zusammenfassung. Die Totalsynthesen von ($\pm$)-Östron, ($\pm$)-D-homo-Equilenin-methyläther und ($\pm$)-iso-Equilenin werden beschrieben.

H. SMITH¹⁷, G. A. HUGHES^{17,18},
and B. J. McLOUGHLIN^{18,19}

Chemistry Department, Manchester University, Manchester (England), January 11, 1963.



trioxide in pyridine then gives the dione (IV; $n = 1$) cyclised by methanolic hydrochloric acid to ($\pm$)-9(11)-dehydroestrone methyl ether, m.p. 136–140°, $\lambda_{\max}$ 264 m μ (ϵ 18,800) in 60% overall yield from the dione (II; $n = 1$). Direct catalytic hydrogenation of the dione (II; $n = 1$) is less stereoscopic since acid cyclisation gives ($\pm$)-9(11)-dehydroestrone methyl ether in only 30–40% overall yield. The stereoselective production of a *trans*-hexa-

⁶ J. F. COLLINS and H. SMITH, J. chem. Soc. 1956, 3441.

⁷ Satisfactory elemental analyses have been obtained for this and other compounds described herein.

⁸ G. A. HUGHES and H. SMITH, Chem. and Ind. 1960, 1022.

⁹ S. SWAMINATHAN and M. S. NEWMAN, Tetrahedron 2, 88 (1958).

¹⁰ G. A. HUGHES and H. SMITH, Proc. chem. Soc. 1960, 74.

¹¹ J. D. COCKER and T. G. HALSALL, J. chem. Soc. 1957, 3441.

¹² V. C. E. BURNOP, G. H. ELLIOT, and R. P. LINSTED, J. chem. Soc. 1940, 727.

¹³ C. B. C. BOYCE and J. S. WHITEHURST, J. chem. Soc. 1960, 4547.

¹⁴ A. BOWERS, T. G. HALSALL, E. R. H. JONES, and A. J. LEMIN, J. chem. Soc. 1953, 2555.

¹⁵ W. S. JOHNSON, I. A. DAVID, H. C. DEHN, R. J. HIGHET, E. W. WARNHOFF, W. D. WOOD, and E. T. JONES, J. Amer. chem. Soc. 80, 661 (1958).

¹⁶ W. E. BACHMANN, W. COLE, and A. L. WILDS, J. Amer. chem. Soc. 62, 824 (1940).

¹⁷ Present address: Wyeth Laboratories Inc., Philadelphia (Pa., U.S.A.).

¹⁸ Acknowledgments. We thank the Department of Scientific and Industrial Research for the award of maintenance grants.

¹⁹ Present address: Imperial Chemical Industries Ltd., Macclesfield (Cheshire, England).

Molekül-Massenspektrographie von Naturstoffen. Steroide¹

Für die Bestimmung des Molekulargewichtes organischer Verbindungen sowie der Molekulargewichtsverteilung in Substanzgemischen hat die Methode der Molekül-Massenspektrographie^{2,3} mit Ionenbildung durch Anlagerung energiearmer negativer Ladungsträger neue Möglichkeiten erschlossen. Die Leistungsfähigkeit des Verfahrens wurde bisher bei Untersuchung von Paraffinen⁴, höheren Alkoholen und Fettsäuren⁵, kondensierten aromatischen Kohlenwasserstoffen⁶ und einigen weiteren Verbindungen unter Beweis gestellt, wobei Molekulargewichtsbestimmungen bis etwa $M = 2000$ auf eine Masseneinheit genau durchgeführt wurden. Im Gegensatz zur herkömmlichen Massenspektrometrie, bei der normalerweise durch Elektronenstoß erzeugte, positiv geladene Bruchstückionen

der Ausgangsmoleküle untersucht werden^{3,7}, tritt bei der Molekül-Massenspektrographie praktisch keine Molekülaufspaltung in Erscheinung.

¹ I. Mitteilung.

² M. V. ARDENNE, Kernenergie 1, 1029 (1958); Z. angew. Physik 11, 121 (1959).

³ M. V. ARDENNE, Tabellen zur angewandten Physik, 2. Aufl. (Berlin 1962), Bd. 1, S. 606, 611, 725.

⁴ M. V. ARDENNE, K. STEINFELDER und R. TÜMLER, Z. phys. Chem. 220, 240 (1962).

⁵ M. V. ARDENNE, K. STEINFELDER und R. TÜMLER, Z. phys. Chem. 220, 105 (1962).

⁶ M. V. ARDENNE, K. STEINFELDER und R. TÜMLER, Angew. Chem. 73, 136 (1961).

⁷ J. H. BEYNON, Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry (Amsterdam, London, New York, Princeton 1960).

Es lag deshalb nahe, auch kompliziertere, bei der üblichen Massenspektrometrie besonders stark fragmentierende organische Verbindungen und deren Gemische in die molekülmassenspektrographischen Untersuchungen einzubeziehen.

Im folgenden wird über die mit einigen Steroiden (Sterine, Steroidsapogenine und -alkaloide) erzielten Ergebnisse kurz berichtet⁸. Diese Verbindungen reagieren bei der Elektronenanlagerung im allgemeinen nach dem Prozesstyp 3^3 ($RH + e^- \rightarrow [RH]^- \rightarrow R^- + H$), das heisst die Hauptlinie liegt bei der Masse $M-1$. Die eine Masseneinheit höher, also bei der Sollmasse liegende Linie entsteht durch den ^{13}C -Anteil des natürlichen Kohlenstoffes⁹. Auf Grund der statistischen Verteilung der Kohlenstoffisotope und ihrer Häufigkeit enthält ein Teil der Steroidmoleküle ausser ^{12}C -Atomen ein ^{13}C -Atom, wodurch sich deren Molekülmasse um eine Masseneinheit erhöht. Weitere durchwegs in nur untergeordnetem Masse auftretende Linien dürften folgende Ursachen haben: (a) vor allem durch die erforderlichen erhöhten Verdampfungstemperaturen bedingte pyrolytische Zersetzungen (Dehydratisierung bei Hydroxyverbindungen: Auftreten einer Linie bei 18 Masseneinheiten unterhalb der Hauptlinie = $M-1-18$, Abspaltung von Essigsäure bei Acetoxy-Verbindungen: $M-1-60$, (b) Anlagerung eines Sauerstoff-Ions an das Restmolekül: $M-1+16$, sowie schliesslich (c) in den Testsubstanzen vorhandene Verunreinigungen (in einigen Fällen liess sich das Vorhandensein solcher im Molekül-Massenspektrogramm angezeigten Begleitsubstanzen auch auf andere Weise bestätigen).

Cholesterin (Cholest-5-en-3 β -ol)¹⁰, $C_{27}H_{46}O$, $M = 386$ (M = Sollmasse, Summe der Hauptisotopmassen des Moleküls), $T_v = 130^\circ$; Hauptlinie bei 427 (Sollmasse – 1) sowie Linien bei 428 (^{13}C -Anteil im Cholesterin-acetat) und 429, weitere Linien geringer Intensität bei 367 (Abspaltung von Essigsäure zu Cholesta-3,5-dien), 385 (Cholesterin als Begleitsubstanz) sowie 413, 441 (unbekannte Verunreinigungen). Die photometrische Registrierung des Molekül-Massenspektrums vom Cholesterin-acetat wird als Beispiel für die untersuchten Steroide in der Abbildung wiedergegeben.

Cholesterinacetat (3 β -Acetoxy-cholest-5-en)¹⁰, $C_{29}H_{48}O_2$, $M = 428$, $T_v = 130^\circ$; Hauptlinie bei 427 (Sollmasse – 1) sowie Linien bei 428 (^{13}C -Anteil im Cholesterin-acetat) und 429, weitere Linien geringer Intensität bei 367 (Abspaltung von Essigsäure zu Cholesta-3,5-dien), 385 (Cholesterin als Begleitsubstanz) sowie 413, 441 (unbekannte Verunreinigungen). Die photometrische Registrierung des Molekül-Massenspektrums vom Cholesterin-acetat wird als Beispiel für die untersuchten Steroide in der Abbildung wiedergegeben.

5 α -Cholestanol-acetat (3 β -Acetoxy-5 α -cholestan)¹⁰, $C_{29}H_{50}O_2$, $M = 430$, $T_v = 130^\circ$; Hauptlinie bei 429 (Sollmasse – 1), Linien geringer Intensität bei 428 und 430 (^{13}C -Anteil), sehr schwache Linie bei 387 (5 α -Cholestan-3 β -ol als Begleitsubstanz).

β -Sitosterin ([24 R]-Äthyl-cholest-5-en-3 β -ol)¹⁰, $C_{29}H_{50}O$, $M = 414$, $T_v = 115^\circ$; Hauptlinie bei 413 (Sollmasse – 1), weitere Linien bei 395 (sehr schwach, Dehydratisierung zu [24 R]-Äthyl-cholesta-3,5-dien), 399 (schwach, Campesterin = [24 R]-Methyl-cholest-5-en-3 β -ol als Begleitsubstanz; vgl. ¹¹) und 414 (^{13}C -Anteil im β -Sitosterin).

Stigmasterin ([24 R]-Äthyl-cholesta-5,22-dien-3 β -ol)¹⁰, $C_{29}H_{48}O$, $M = 412$, $T_v = 100^\circ$; Hauptlinie bei 411 (Sollmasse – 1), weitere Linien bei 393 (sehr schwach, Dehydratisierung zu [24 R]-Äthyl-cholesta-3,5,22-trien), 409 und 410 (schwach), sowie 412 (^{13}C -Anteil).

β -Sitosterinpräparat aus *Solanum tuberosum*^{12,13}, $T_v = 125^\circ$; Hauptlinie bei 413 (β -Sitosterin), weitere stärkere Linie bei 411 (Stigmasterin, durch IR-Spektrographie ebenfalls nachgewiesen), Linien bei 412 und 414 (^{13}C -Anteile), schwache Linien bei 385 und 399 (Cholesterin und Campesterin?).

Cycloartenol (9 β ,19-Cyclo-5 α -lanost-24-en-3 β -ol)¹⁰ aus *Solanum demissum*¹³, $C_{30}H_{50}O$, $M = 426$, $T_v = 100^\circ$; Hauptlinie bei 425 (Sollmasse – 1), 426 (^{13}C -Anteil), weitere Linien sehr geringer Intensität bei 409, 413, 423, 424, 439 (Homologe), 442 und 455.

Diosgenin ((22 R :25 R)-Spirost-5-en-3 β -ol)¹⁰, $C_{27}H_{42}O_3$, $M = 414$, $T_v = 210^\circ$; Hauptlinie bei 413 (Sollmasse – 1), weitere Linien geringer Intensität bei 385, 395 (Dehydratisierung zu (22 R :25 R)-Spirosta-3,5-dien), 411, 412, 414 (^{13}C -Anteil), 415 und 426.

Demissidin (5 α -Solanidan-3 β -ol)¹⁰, $C_{27}H_{44}NO$, $M = 399$, $T_v = 135^\circ$; Hauptlinie bei 398 (Sollmasse – 1), weitere Linien bei 382 (sehr schwach), 395 (sehr schwach), 396, 397, 399 (^{13}C -Anteil), 400, 414 (O-Anlagerung) und 440 (die letzten drei Linien ebenfalls sehr schwach).

Solasodin ((22 R :25 R)-Spirosol-5-en-3 β -ol)¹⁰, $C_{27}H_{43}NO_2$, $M = 413$, $T_v = 200^\circ$; Hauptlinie bei 412 (Sollmasse – 1), weitere Linien geringer Intensität bei 394 (Dehydratisierung zu (22 R :25 R)-Spirosola-3,5-dien), 410, 411, 413 (^{13}C -Anteil) und 414.

Solanocapsin ((22 R :23 S :25 R)-3 β -Amino-22,26-imino-16 β ,23-oxido-5 α -cholestan-23-ol)¹⁴, $C_{27}H_{46}N_2O_2$, $M = 430$, $T_v = 150^\circ$; Hauptlinie bei 428 (Sollmasse – 2), weitere Linien bei 411 (sehr schwach), 429 (^{13}C -Anteil), 430 und 444 (O-Anlagerung). Der beim Solanocapsin auftretende Prozesstyp (Hauptlinie bei Sollmasse – 2) ist noch nicht aufgeklärt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Molekül-Massenspektrographie für die Bestimmung des Molekulargewichts auch komplizierterer Steroide sehr gute Dienste leistet. Ein besonderer Vorzug des Verfahrens liegt in der Möglichkeit, die Molekulargewichtsverteilung von oftmals schwer trennbaren Gemischen verwandter Verbindungen schnell, genau und quantitativ zu ermitteln sowie eventuelle Begleitstoffe bzw. Verunreinigungen festzustellen. Mit den genannten und zahlreichen weiteren Steroiden sowie anderen Naturstoffen sind molekülmassenspektrographische Untersuchungen auf breiter Grundlage in Angriff genommen worden. Über diese soll später ausführlich berichtet werden¹⁵.

⁸ Bezüglich früherer Untersuchungen zur Massenspektrometrie von Steroiden (Bildung positiv geladener Ionen durch Elektronenstoss bei starken Fragmentierungen) siehe P. DE MAYO und R. I. REED, Chem. and Ind. 1956, 1481. – R. I. REED, J. chem. Soc. (Lond.) 1958, 3432. – S. S. FRIEDLAND, G. H. LANE, R. T. LONGMAN, K. E. TRAIN und M. J. O'NEAL, Analyt. Chem. 31, 169 (1959). – K. BIE-MANN und J. SEIBL, J. Amer. chem. Soc. 81, 3149 (1959). – S. BERGSTRÖM, R. RYHAGE und E. STENHAGEN, Acta chem. scand. 12, 1349 (1958). – R. RYHAGE und E. STENHAGEN, J. lipid Research 1, 361 (1960). – S. BERGSTRÖM, R. RYHAGE und E. STENHAGEN, Svensk chem. Tidskr. 73, 566 (1961). – H. BUDZIKIEWICZ und C. DJERASSI, J. Amer. chem. Soc. 84, 1480 (1962). – L. E. PETERSON, Chem. and Ind. 1962, 264.

⁹ M. V. ARDENNE, K. STEINFELDER und R. TÖMMLER, Naturwissenschaften, 47, 492 (1960).

¹⁰ L. F. FIESER und M. FIESER, Steroide (Weinheim/Bergstr. 1961).

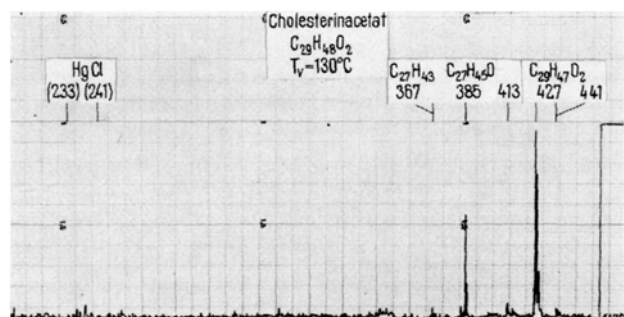
¹¹ M. J. THOMPSON, S. J. LOULOUDES, W. E. ROBBINS, J. A. WATERS, J. A. STEELE und E. MOSETTIG, Biochem. biophys. Res. Commun. 9, 113 (1962).

¹² K. SCHREIBER, G. OSSKE und G. SEMBNER, Exper. 17, 436 (1961).

¹³ K. SCHREIBER und G. OSSKE, Die Kulturpflanze 10, 372 (1962).

¹⁴ K. SCHREIBER und H. RIPPERGER, Liebigs Ann. 655, 114 (1962).

¹⁵ Die Ergebnisse wurden im Rahmen eines Forschungsauftrages des Amtes für Kernforschung und Kerntechnik, Berlin-Niederschöneweide, erhalten.



Photometrische Registrierung des Molekülmassenspektrums von Cholesterinacetat (3β -Acetoxy-cholest-5-en), $C_{29}H_{48}O_2$; $M = 428$.

Potassium and the Reactivity Pattern of the Isolated Human Myometrium to Prostaglandin from Human Seminal Fluid¹

It appears that the muscle cells of the rat and rabbit myometrium are in principle affected by variations of the extracellular potassium concentration in the same way as other excitable organs, i.e. increased concentration of potassium causing partial depolarization, increased spontaneous motility and increased excitability to electrical stimuli^{2,3}. It is not clear to what extent these changes are associated with variations also in the sensitivity to autopharmacological substances. Studies in our laboratory indicate that the isolated human myometrium is influenced by variations in the extracellular potassium concentration in the same way as the rat and rabbit uterus (to be published).

The isolated non-pregnant human myometrium is stimulated by most autopharmacological compounds⁴, while prostaglandin usually causes a decrease of the motility⁵. Some uterine preparations respond, however, with an increased motility if a very small dose of prostaglandin is added to the bath fluid, but this reaction is changed to inhibition if a slightly larger dose is added^{5,6}. Since the reactivity pattern of the human myometrium may be of importance for normal fertility, further studies on factors that may influence this reactivity pattern are warranted.

The method used in the present investigation is fully described elsewhere⁶. Immediately following surgical removal of the uterus suitable pieces of myometrium were taken from corpus uteri and suspended in cold Ringer's solution. Four strips of equal size (about $20 \times 2 \times 2$ mm) were then cut out. Each strip was mounted in a 40 ml cuvette in an isolated organ bath. Temperature, gas flow, pH etc. were controlled during the experiments. The motility of the four strips was recorded simultaneously and almost isometrically on a smoked drum, using frontal writing levers with an amplification of 25:1. Histological determinations of the phase in the menstrual cycle were performed on all uteri. The prostaglandin preparation was extracted with two volumes acidified acetone from pooled human seminal fluid. After filtration the acetone was evaporated under reduced pressure and the pH adjusted to 7.4 with NaOH. The resulting aqueous solution was used in these experiments. The biological activity was determined against a standard preparation according to ELIASSON⁵.

Summary. The molecular weight of various steroids (sterols, steroidal sapogenins, and alkaloids) as well as the molecular weight distribution in complex mixtures of similar steroids, has been exactly determined by application of 'molecule mass spectrography'. In this technique, negatively-charged ($p - 1$) ions are formed, usually without further fragmentation. The advantages and new possibilities of this method are discussed.

M. V. ARDENNE, K. STEINFELDER,
R. TÜMLER, und K. SCHREIBER

Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden-Weisser Hirsch; Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben, Kreis Aschersleben (DDR), 27. Dezember 1962.

In all experiments (36 strips from 9 uteri) the effect of potassium on the reactivity pattern of the myometrium to prostaglandin was similar to that illustrated in Figures 1 and 2. Lowering the potassium below the normal concentration in the Tyrode solution (5.6 mEqv/l) increased the inhibitory response to prostaglandin. The opposite effect was obtained when the potassium concentration was increased. Moreover, in some experiments, the inhibitory response to prostaglandin changed to stimulation when the potassium concentration was in the upper region (13–16 mEqv/l) of that used in these experiments.

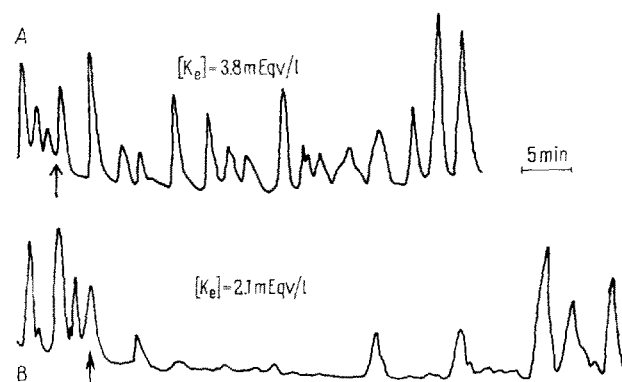


Fig. 1. The effect of extracellular potassium concentration $[K_e]$ on the response of the isolated human myometrium in late proliferative phase to prostaglandin from human seminal fluid. At arrows: 0.01 U prostaglandin from human semen per ml bath fluid.

From results to be published elsewhere it is apparent that also for the isolated human myometrium there is a linear relationship between the number of contractions per time unit and the extracellular potassium concentration within the range of 4–16 mEqv/l. It is therefore most likely that potassium causes similar changes in the mem-

¹ Financial support from the Lalor Foundation, the Karolinska Institutet, and the Lars Hiertas Minne is thankfully acknowledged.

² A. CSAPO, J. Physiol. (Lond.) 133, 145 (1956).

³ H. JUNG, Arch. Gynäk. 192, 96 (1959).

⁴ F. SANDBERG, A. INGELMAN-SUNDBERG, and G. RYDÉN, J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp. 65, 965 (1958).

⁵ R. ELIASSON, Acta physiol. scand. 46, Suppl. 158.

⁶ M. BYGDEMANN and R. ELIASSON, Acta physiol. scand., in press (1963).