

Das Thebain-Chinon-Addukt geht beim Übergießen und Umrühren mit etwas konz. Bromwasserstoffsäure leicht in Lösung. Nach kurzer Zeit krystallisiert jedoch das gelbe Hydrobromid der Anlagerungsverbindung aus. Es ist leicht löslich in Wasser. Durch Zusatz von Ammoniak wird daraus wieder das gelbe Chinon-Addukt vom Schmp. 247—249° frei.

Umlagerung des Thebain-Chinon-Adduktes: 0.1 g Chinon-Addukt wird in 5 ccm Äthylalkohol $\frac{1}{2}$ Stde. am Rückflußkühler auf dem Wasserbade erwärmt. Allmählich geht die Substanz in Lösung, und die gelbe Farbe verschwindet. Beim Abkühlen erhält man schöne weiße Krystalle. Schmp. 247—249° nach Bräunung bei 220°.

3.439 mg Sbst.: 9.078 mg CO₂, 1.833 mg H₂O. — 4.635 mg Sbst.: 0.137 ccm N (22°, 750 mm).

C₂₅H₂₆O₅N. Ber. C 71.6, H 6.01, N 3.34. Gef. C 71.99, H 5.96, N 3.30.

Verbindung mit 1.4-Naphthochinon: 0.1 g Thebain wird zusammen mit 0.06 g 1.4-Naphthochinon 10 Min. in 6 ccm Äthylalkohol auf dem Wasserbade erhitzt. Die ausfallenden weißen Nadeln schmelzen nach dem Umkrystallisieren aus Methanol bei 239—240°.

Verbindung mit Maleinsäureanhydrid: Sie wird durch kurzes Kochen einer Benzol-Lösung von 0.1 g Thebain und 0.04 g Maleinsäureanhydrid in einer Ausbeute von 0.08 g erhalten. Die derben Krystalle färben sich bei 260° braun und schmelzen bei 263—264°.

Auch an dieser Stelle danke ich Hrn. Dr. O. Arrhenius für seine stete Hilfsbereitschaft.

103. Alberto Ercoli: Enzymatische Umwandlung des Δ^4 -Testosterons in Ätiocholan-ol-(17)-on-(3) und Epi-ätiocholan-diol-(3.17) durch einen Hengsthodenextrakt.

[Aus d. Istituto Sieroterapico Milanese, Mailand.]

(Eingegangen am 19. Februar 1938.)

Vor kurzem¹⁾ wurde die hydrierende Wirkung eines frisch bereiteten enzymatischen Hengsthodenextraktes beschrieben, durch welche das Δ^4 -Androstendion in Ätiocholan-dion-(3.17) umgewandelt wurde.

In dieser Arbeit wird über die Wirkung des Hengsthodenextraktes auf Δ^4 -Testosteron (I) berichtet. Zur Anwendung gelangte derselbe schon früher¹⁾ benutzte enzymatische Auszug, der durch 48-stdg. Autolyse des fein zerkleinerten Organs mit chloroformgesättigtem Wasser bei 37° und nachfolgende Filtration gewonnen und 65 Tage im Eisschrank aufbewahrt worden war.

Es wurden 3 Parallelversuche angesetzt; bei dem ersten (A) wurde dem enzymatischen Auszug Androstendion zugefügt, bei den anderen (B und C) Testosteron. A diente zur Kontrolle der enzymatischen Wirksamkeit des alt gewordenen Auszugs. Die drei Proben wurden bei 37° stehen gelassen. Nach Ablauf von 10 Tagen wurden A und B filtriert, die Rückstände mit Aceton zerrieben und das in Aceton Gelöste im Hochvakuum destilliert.

¹⁾ A. Ercoli u. L. Mamoli, B. 71, 156 [1938].

Aus A gewann man fast das ganze Androstendion unverändert wieder: der Auszug hatte also im Vergleich zu dem früheren Versuch¹⁾ den größten Teil seiner Wirksamkeit verloren²⁾. Durch die gleiche Behandlung gewann man aus B ein Gemisch, das infolge seiner schweren Trennbarkeit acetyliert und aus verd. Methanol fraktioniert krystallisiert wurde. So konnte neben Testosteron-acetat das erwartete Ätiocholanol-(17)-on-(3)-acetat (Schmp. 143⁰) gewonnen werden, das durch Verseifung das entsprechende, schon von Butenandt³⁾ dargestellte Ätiocholanolon (II) (Schmp. 138.5⁰ bis 139.5⁰, uncorr.) ergab. Die Substanz löst sich unter gelindem Erwärmen in konz. Schwefelsäure mit hellgelber Farbe und grüner Fluoreszenz. Aus den Mutterlaugen konnte, auch nach Behandlung mit Girardschem Ketonreagens T⁴⁾, kein nichtketonartiger Anteil erhalten werden.

Nach 20 Tagen wurde C filtriert und in üblicher Weise aufgearbeitet. Umkrystallisieren aus Äther und Aceton lieferte eine Substanz vom Schmp. 232—233⁰ (uncorr.), $[\alpha]_D^{25}$: +24.8⁰ (in Alkohol), die durch ihr Diacetat (Schmp. 121—122⁰) weiter charakterisiert wurde. Der Mischschmelzpunkt mit dem durch Reduktion und gleichzeitige Verseifung des bei B gewonnenen Ätiocholanolon-acetates erhaltenen Epi-ätiocholan-diols-(3.17) (III) war ohne Depression. Es handelte sich also um das von Butenandt³⁾ aus Männerharn isolierte, und von Ruzicka⁵⁾ und von Butenandt³⁾ auch künstlich hergestellte Diol*).

Die vereinigten Mutterlaugen wurden, nach dem Trocknen, mit T-Reagens behandelt: aus dem ketonfreien Anteil konnte noch eine kleine Menge des Diols erhalten werden; der Ketonanteil lieferte durch Krystallisation aus verd. Methylalkohol unverändertes Testosteron, aus den Mutterlaugen davon konnte durch Acetylierung und nachfolgende Krystallisation Ätiocholanolon-acetat gewonnen werden.

Aus dem wäßrigen Filtrat von C endlich konnte durch Ausschütteln mit Äther, Hochvakuumdestillation, Umlösen aus Aceton-Petroläther und aus verd. Alkohol noch eine kleine Menge Epi-ätiocholandiol erhalten werden.

Außer Ätio-cholandion¹⁾ wurden also auf enzymatischem Wege noch 2 Vertreter der Ätiocholangruppe gewonnen, die der männliche Organismus wahrscheinlich auch ausscheidet⁶⁾ und Inaktivierungs- und Ausscheidungsformen des Testishormons darstellen. Diese enzymatische Wirksamkeit ist an den Zustand der Sexualreife geknüpft. Versuche mit Hoden von mehr als 15-jährigen Hengsten verliefen ohne Erfolg.

Aus den Versuchen geht hervor, daß das Testosteron von Testishydase anscheinend leichter als Androstendion angegriffen wird, und daß zuerst die Hydrierung der Doppelbindung und hierauf die der Ketogruppe erfolgt.

²⁾ Im Vergleich zu dem früheren Versuch war die Reaktionszeit nur halb so lang, während die Menge des enzymatischen Extraktes verdoppelt wurde.

³⁾ A. Butenandt, K. Tscherning u. H. Dannenberg, *Ztschr. physiol. Chem.* **248**, 205 [1937].

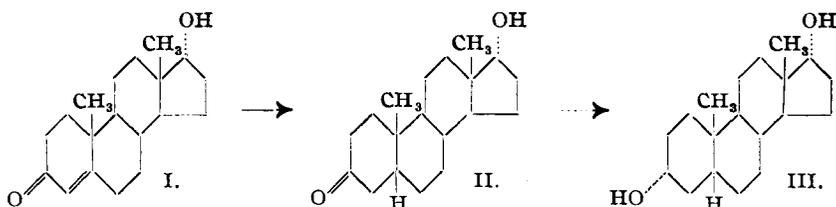
⁴⁾ A. Girard u. G. Sandulesco, *Helv. chim. Acta* **19**, 1095 [1936].

⁵⁾ L. Ruzicka, M. W. Goldberg u. W. Bosshard, *Helv. chim. Acta* **20**, 541 [1937].

* Anmerkung bei der Korrektur. — Der Stoff zeigt im Allen-Doisy-Test an kastrierten weiblichen Mäusen eine beträchtliche östrogene Wirkung. Die physiologischen Versuche sind noch im Gange.

⁶⁾ Zur Frage, ob das Epi-ätiocholandiol als solches oder in Form einer Keton-Vorstufe im Harn vorkommt, s. Butenandt, Tscherning u. Dannenberg (l. c.).

Auf diesem Gebiet sind noch Arbeiten im Gang; vorläufig sei nur gesagt, daß die Testishormon-Hydrase (aus Hengst- und Stierhoden), welche die seitenkettenlosen Steroide mit androgener Wirksamkeit (einschließlich Dehydroandrosteron) angreift, keine nachweisbare Wirkung auf die entsprechenden seitenkettenträgenden Sterine und Sterinderivate auszuüben scheint.



Beschreibung der Versuche.

Zur Bereitung des enzymatischen Hodenextraktes s. A. Ercoli und L. Mamoli¹⁾.

Versuchsansatz:

A) 200 ccm des Auszuges wurden 200 mg feinpulverisiertes Androstendion hinzugefügt.

B) 200 ccm des Auszuges wurden 200 mg feinpulverisiertes Testosteron hinzugefügt.

C) 250 ccm des Auszuges wurden 250 mg feinpulverisiertes Testosteron hinzugefügt.

Die drei Proben wurden gleichzeitig in den Brutschrank bei 37° gebracht.

Nach Ablauf von 10 Tagen für A) und B), von 20 Tagen für C), wurde filtriert, die Rückstände nach Trocknen mit heißem Aceton zerrieben, die Acetonlösungen filtriert, eingengt und im Hochvakuum destilliert.

Bearbeitung von A: Die nach Hochvakuumdestillation erhaltene Substanz (etwa 140 mg) lieferte, aus verd. Aceton umkrystallisiert, 110 mg reines Androstendion.

Bearbeitung von B: Das Hochvakuumdestillat (etwa 150 mg) erwies sich beim Umkrystallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln als schwer trennbares Gemisch, so daß alle erhaltenen Krystallfraktionen wieder vereinigt, mit 1 ccm Essigsäureanhydrid $\frac{1}{2}$ Stde. gekocht und aus verd. Methanol fraktioniert krystallisiert wurden. Aus der ersten und dritten Krystallfraktion erhielt man im ganzen nach Umlösen aus verd. Methylalkohol etwa 40 mg reines Ätiocholanol-(17)-on-(3)-acetat, Schmp. 143° (unkorr.).

4.974 mg Subst.: 13.830 mg CO₂, 4.300 mg H₂O.

C₂₁H₃₂O₃. Ber. C 75.85, H 9.70. Gef. C 75.83, H 9.67.

Aus der zweiten Fraktion (30 mg) erhielt man nach Umkrystallisieren aus verd. Aceton 10 mg reines Testosteron-acetat, Schmp. 138° (unkorr.) (Mischprobe).

Alle vereinigten Mutterlaugen wurden mit 2 ccm Methanol, 0.2 ccm Essigsäure, 400 mg Girard-Reagens T zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlung mit Kältemischung wurden 3.3 ccm *n*-Natronlauge hinzugefügt, mit eisgekühltem Wasser verdünnt und mit Äther 4-mal erschöpfend extrahiert.

Nach Trocknen und Verdampfen der ätherischen Lösung erhielt man nur 10 mg eines schmierigen, nicht krystallisierbaren Öls.

Verseifung des Ätiocholanolon-acetates: 9 mg des acetylierten Oxyketons wurden mit 2.5 ccm *n*-methylalkohol. Kalilauge $\frac{1}{2}$ Stde. verseift, mit Wasser verdünnt und mit Äther ausgeschüttelt. Aus der über Na_2SO_4 getrockneten ätherischen Lösung konnten nach Einengen und Umlösen aus Aceton-Petroläther und aus verd. Alkohol 4 mg Ätiocholanolon-(17)-on-(3), Schmp. 139—140°, erhalten werden.

Verseifung und gleichzeitige Reduktion des Acetates des Ätiocholanolon-(17)-on-(3): 23 mg des acetylierten Oxyketons wurden in 6 ccm Isopropylalkohol gelöst und unter Sieden mit kleinen Stückchen Natrium versetzt, bis das Metall sich nicht mehr löste. Nach kurzem Einengen wurde mit etwa 12 ccm heißem Wasser verdünnt. Der nach Abkühlen erhaltene krystallinische Niederschlag wurde aus verd. Alkohol umgelöst: 15 mg Epi-ätiocholan-diol-(3.17), Schmp. 231° (unkorr.); $[\alpha]_D^{21}$: +24.8° (Alkohol).

4.658 mg Subst.: 13.220 mg CO_2 , 4.610 mg H_2O .

$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_2$. Ber. C 78.01, H 11.04. Gef. C 77.42, H 11.07.

Bearbeitung von C: Das Hochvakuumdestillat (etwa 180 mg) wurde aus Äther, Aceton und verd. Alkohol umkrystallisiert: 20 mg, Schmp. 231° bis 232° (unkorr.). Ein Mischschmelzpunkt mit oben vorbereitetem Epi-ätiocholan-diol-(3.17) ergab keine Depression. Die vereinigten Mutterlaugen wurden nach Trocknen mit 2 ccm Methanol, 0.2 ccm Essigsäure und mit 400 mg Girard-Reagens T behandelt und 1 Stde. zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen mit Kältemischung wurden der Lösung 3.3 ccm *n*-NaOH hinzugefügt, mit eisgekühltem Wasser verdünnt und mit Äther 4-mal extrahiert (ketonfreier Anteil). Die wäßrige Lösung wurde mit Salzsäure kongosauer gemacht und 4-mal mit Äther extrahiert (Keton-Anteil).

Aus dem Nichtketon-Anteil konnte man nach Abdampfen und Trocknen des Äthers und Umlösen des Rückstandes aus Aceton-Petroläther und verd. Aceton noch 14 mg reines Diol, aus dem Keton-Anteil nach Umkrystallisieren aus verd. Methanol 43 mg Testosteron gewinnen. Die Mutterlaugen dieser Krystallfraktion wurden zur Trockne gebracht, mit 4 ccm Essigsäureanhydrid 30 Min. gekocht und nach Entfernung des Essigsäureanhydrids aus verd. Methanol umkrystallisiert: 21 mg Ätiocholanolon-acetat, Schmp. 143° (Mischprobe).

Epi-ätiocholandioldiacetat: 11 mg Epi-ätiocholandioldiol wurden 30 Min. mit 1 ccm Essigsäureanhydrid gekocht. Das Diacetat wurde aus verd. Methanol umgelöst: 10 mg. Schmp. 121—122° (unkorr.).

Epi-ätiocholan-diol-(3.17) aus filtrierter enzymatischer wäßriger Reaktionslösung: Der filtrierte enzymatische Auszug von C wurde mit Äther extrahiert, nach Abdampfen des Äthers der Rückstand im Hochvakuum destilliert. Die gewonnenen 30 mg wurden aus Aceton und aus verd. Alkohol mehrmals umkrystallisiert: 4 mg. Epi-ätiocholan-diol-(3.17), Schmp. 232° (unkorr.) (Mischprobe).