

Paul-E. Schulze, Lutz Pitzel und Martin Wenzel

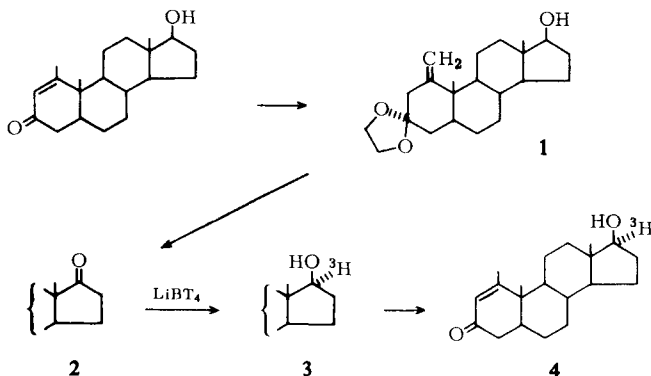
Notiz über die Synthese von 17 β -Hydroxy-1-methyl-[17 α - 3 H]-5 α -androst-1-on-(3)*)

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin, und der Biologisch-Chemischen Abteilung des Pharmazeutischen Instituts der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 2. Mai 1968)

Das Prinzip der „stoffwechsel-labilen“ Markierung ermöglicht, in einfacher Weise die Oxydation von 17 β -Hydroxy- zu 17-Keto-Steroiden im intakten Organismus zu verfolgen. Ist die 17 α -Position des Steroids mit Tritium markiert, so wird bei der enzymatischen Oxydation der 17 β -Hydroxy-Gruppe mit Hilfe der 17 β -Steroiddehydrogenase das Tritium auf NAD bzw. NADP übertragen und von dort in die Atmungskette geschleust. Das dabei gebildete Tritiumwasser (HTO) mischt sich mit dem Körperwasser; daher ist die Aktivität im Körperwasser ein Maß der ablaufenden Steroidoxydation^{1,2)}.

Der Syntheseweg zum 17 β -Hydroxy-1-methyl-[17 α - 3 H]-5 α -androst-1-on-(3) (4) entspricht der früher beschriebenen Darstellung von [17 α - 3 H]Testosteron¹⁾: 3,3-Äthylendioxy-1-methylen-5 α -androstanon-(17) (2) wurde mit LiBT₄ (spezif. Akt. 325 mC/mg) reduziert. Es gelang so, 4 mit der spezif. Akt. von 10.3 mC/mg oder 3.13 mC/ μ Mol zu synthetisieren.



Die Aufarbeitung und Reinigung der radioaktiven Synthese-Produkte ist gegenüber den üblichen präparativen Verfahren, der geringen verwendeten Stoffmengen wegen, sehr erschwert. Die Synthese-Produkte wurden auf Dünnschichtplatten, verbunden mit der direkten Messung der Radioaktivität mittels des „Dünnschicht-Scanners“**), aufgetrennt.

*) Chemische Kurzbezeichnung: Methenolon.

**) Firma Berthold, 7547 Wildbad (Schwarzwald).

1) W. Christ, M. Wenzel und P.-E. Schulze, J. Labeled Compounds **3**, 311 (1967).

2) M. Wenzel, E. Pitzel und P.-E. Schulze, Angew. Chem. **80**, 191 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. **7**, 211 (1968).

Beschreibung der Versuche

3,3-Äthylendioxy-1-methylen-5 α -androstanol-(17 β) (1)³⁾: 1.48 g 17 β -Hydroxy-1-methyl-5 α -androsten-(1)-on-(3) wurden mit 5.0 ccm Äthylenglykol und 30 mg *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat in 50 ccm Benzol unter kräftigem Rühren bis zur Beendigung der Wasserabscheidung (etwa 6 Stdn.) unter Rückfluß acetalisiert⁴⁾. Die benzolische Phase wurde mit 5proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und mit dest. Wasser neutral gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde zweimal aus Aceton/Petroläther (1:2) umkristallisiert und die Reinheit des Produktes dünn-schichtchromatographisch im System Chloroform/Methanol (9:1) überprüft. Schmp. 175–177° (Lit.³⁾: 178 bis 179°), Ausb. 1.08 g (64%).

3,3-Äthylendioxy-1-methylen-5 α -androstanon-(17) (2): Zu 1.0 g 1 in 7.5 ccm Pyridin gab man eine Chromoxid/Pyridin-Suspension (1.2 g CrO₃ in 12 ccm Pyridin). Das Kölbchen wurde verschlossen und über Nacht bei Raumtemp. aufbewahrt. Der mit 40 ccm dest. Wasser verdünnte Kolbeninhalt wurde dann dreimal mit 20 ccm Essigester extrahiert und wie für 1 beschrieben aufgearbeitet. Die ausgefallenen Kristalle wurden dreimal aus Methanol umkristallisiert und die Reinheit des Produktes dünn-schichtchromatographisch (Chloroform/Methanol 9:1) geprüft. Schmp. 185–187° (Lit.⁵⁾: 185.5–186.5°), Ausb. 448 mg (44.8%).

Lithiumbortritid wurde nach dem Wilzbach-Verfahren⁶⁾ gewonnen oder von Radiochemical Centre Amersham mit der spezif. Akt. 7.15 C/mMol bezogen.

3,3-Äthylendioxy-1-methylen-[17 α -³H]-5 α -androstanol-(17 β) (3): Zu 11 mg 2 in 1 ccm absol. Tetrahydrofuran wurden 0.62 mg LiBT₄ (200 mC) in 1 ccm absol. Tetrahydrofuran gegeben, ein Kugelhühler mit CaCl₂-Röhrchen aufgesetzt und unter kräftigem Rühren zunächst 3 Stdn. bei Raumtemp. reduziert. Mit einer feinen Kapillare wurde eine Probe entnommen und auf einer Dünnschichtplatte mit Chloroform/Methanol (9:1) entwickelt. Die mit dem „Dünnschicht-Scanner“ gemessene Aktivitätsverteilung ermöglichte einen Rückschluß auf die Geschwindigkeit der ablaufenden Reaktion. Weiteres Kochen unter Rückfluß führte innerhalb von 45 Min. zu keiner nennenswerten Umsatzsteigerung (d. h. das Aktivitätsmaximum des reduzierten Acetals blieb unverändert).

17 β -Hydroxy-1-methyl-[17 α -³H]-5 α -androsten-(1)-on-(3) (4): Das Reduktionsprodukt 3 wurde nicht isoliert, sondern sofort weiterverarbeitet. Zur Zerstörung von überschüss. Reduktionsmittel wurde mit 2 ccm Methanol versetzt, danach mit 2 *n* HCl angesäuert (pH 1) und 45 Min. unter Rückfluß gekocht. Der Verseifungsablauf wurde durch Probeentnahme dünn-schichtchromatographisch (s. o.) verfolgt.

Nach Versetzen des Reaktionsgemisches mit 15 ccm dest. Wasser wurden die organischen Phasen abdestilliert; dabei enthielt das übergewende Destillat bereits den Hauptanteil an labilem Tritium. Die wäbr. Phase wurde dreimal mit 4 ccm Essigester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit dest. Wasser neutral gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Um letzte Reste labilen Tritiums zu entfernen, wurden danach 2 ccm Methanol zugegeben und der Kolbeninhalt im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Mit Test-Chromatogrammen in den Systemen Cyclohexan/Essigester

3) R. Wiechert, U. Kerb und P.-E. Schulze, *Naturwissenschaften* **24**, 86 (1964).

4) W. Dean und D. D. Stark, *Ind. Engng. Chem.*, Vol. **12/1**, 486 (1920).

5) Schering A. G. Berlin, unveröffentlichte Arbeiten.

6) M. Wenzel und P.-E. Schulze, „Tritium-Markierung“, Walter de Gruyter & Co., Berlin 1962.

(9 : 6) und (6 : 9) entwickelt, konnte eine aktive Verunreinigung des Alkohols gegenüber der mitentwickelten Vergleichssubstanz lokalisiert werden. Die Substanz wurde daher dünn-schichtchromatographisch getrennt.

Das aktive Material wurde auf wenige Mikroliter eingeeengt, auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und im System Cyclohexan/Essigester (9 : 6) entwickelt. Der im UV-Licht sichtbare Fleck wurde angezeichnet, das Silicagel abgeschabt, mit 30ccm Methylenchlorid extrahiert und filtriert. Die Extraktion mußte sechsmal wiederholt werden, erst dann war die mit dem Kieselgel zurückbleibende Aktivität zu vernachlässigen. Die gewonnenen Methylenchlorid-Auszüge wurden im Rotationsverdampfer eingeeengt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und die Aktivität gemessen, nachdem auf erneuten Test-Chromatogrammen ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 9 : 1 und Benzol/Äthanol 9 : 1) jeweils nur ein Aktivitätsmaximum gemessen werden konnte, dessen Lage der mitentwickelten Vergleichssubstanz entsprach. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im „Tri-Carb“, die Substanzmenge wurde durch Extinktionsmessung ermittelt. Ausb. 5 mg ($\sim 47\%$), spezif. Akt. 10.3 mC/mg (3.13 mC/ μMol).

Um den Reinheitsgrad der synthetisierten radioaktiven Substanz zu überprüfen, wurde eine Probe mit 150 mg inaktivem **4** verdünnt und mehrmals aus Äthanol umkristallisiert. Die spezif. Akt. blieb dabei innerhalb der Fehlergrenze konstant.

[175/68]