

89. Über Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandte Stoffe

39. Mitteilung¹⁾

Chemischer Beweis für die Anwesenheit des Sauerstoffatoms in 3-Stellung

von C. W. Shoppee²⁾.

(14. V. 40.)

In den heute allgemein anerkannten Formeln der zahlreichen, aus Nebennieren isolierten Steroide³⁾ ist bisher nur die Struktur derjenigen Vertreter, die im Ring C keinen Sauerstoff tragen (es sind dies die Substanzen J, O, L, K, P, Q und S) völlig gesichert. Die weitaus grössere Zahl besitzt jedoch noch ein Sauerstoffatom, das in 11-Stellung angenommen wird. Für alle diese Vertreter (die ganze C₂₁O₅-Gruppe und die Hauptzahl der C₂₁O₄-Gruppe) ist ausser dem Kohlenstoffgerüst⁴⁾⁵⁾⁶⁾ lediglich die Anordnung der Sauerstoffatome in der Seitenkette bewiesen⁵⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾. Nicht bewiesen ist die Lage der zwei im Ringsystem haftenden Sauerstoffatome. Eines davon wurde aus Analogie-Gründen in 3-Stellung angenommen. Wenn diese Annahme richtig ist, so kann sich das letzte Sauerstoffatom nur in 11-Stellung befinden. Die Gründe dafür sind früher gegeben worden⁵⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾. Sie gelten aber eben nur unter der Voraussetzung, dass sich das in 3-Stellung angenommene Sauerstoffatom wirklich dort befindet. Ein eindeutiger Beweis war somit notwendig.

Eine erste chemische Stütze dafür ist vor kurzem von *Reichstein* und *Fuchs*¹⁵⁾ beigebracht worden. Das dort erhaltene Resultat

¹⁾ 38. Mitteilung, vgl. C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. **23**, 729 (1940).

²⁾ Rockefeller Research Fellow at the University of Basle.

³⁾ Vgl. die Zusammenstellungen H. L. Mason, Endocrinology **25**, 405 (1939); E. C. Kendall, Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, Vol. V, **299** (1937); T. Reichstein, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (herausgegeben von E. Abderhalden), Abt. V, Teil 3B, S. 1367 (1938).

⁴⁾ T. Reichstein, Helv. **19**, 979 (1936).

⁵⁾ M. Steiger, T. Reichstein, Helv. **20**, 817 (1937).

⁶⁾ M. Steiger, T. Reichstein, Helv. **21**, 161 (1938).

⁷⁾ H. L. Mason, W. M. Hoehn, B. F. McKenzie, E. C. Kendall, J. Biol. Chem. **120**, 719 (1937).

⁸⁾ T. Reichstein, Helv. **20**, 953 (1937).

⁹⁾ T. Reichstein, Helv. **20**, 975 (1937).

¹⁰⁾ T. Reichstein, Helv. **21**, 1490 (1938).

¹¹⁾ H. L. Mason, W. M. Hoehn, E. C. Kendall, J. Biol. Chem. **124**, 459 (1938).

¹²⁾ E. C. Kendall, H. L. Mason, W. M. Hoehn, B. F. McKenzie, Proc. Staff Meet. Mayo Clinic **12**, 136, 270 (1937).

¹³⁾ M. Steiger, T. Reichstein, Helv. **21**, 828 (1938).

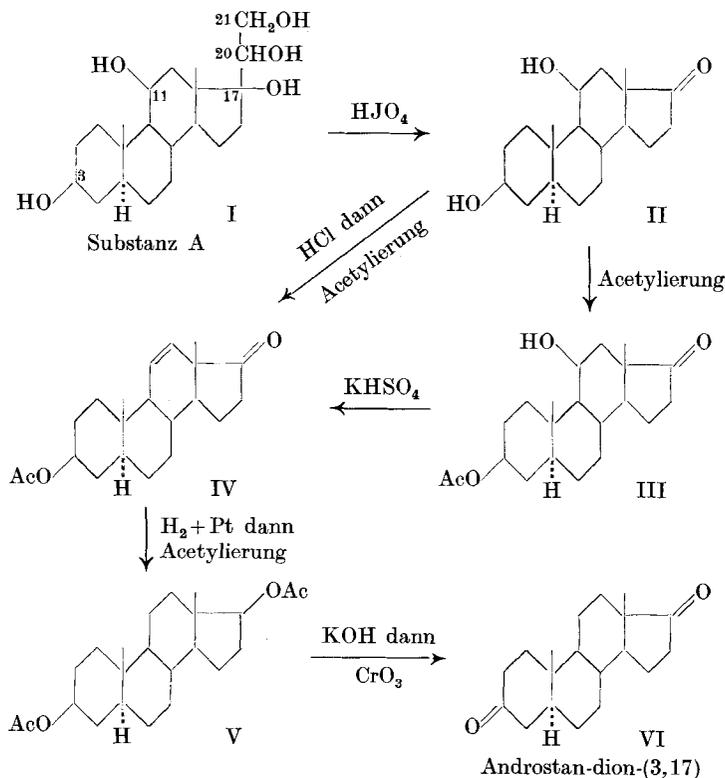
¹⁴⁾ H. L. Mason, W. M. Hoehn, Am. Soc. **60**, 2566 (1938).

¹⁵⁾ T. Reichstein, H. G. Fuchs, Helv. **23**, 676 (1940).

ist aber wegen der schlechten Ausbeute nicht ganz beweiskräftig. Ein definitiver Beweis wird in vorliegender Arbeit erbracht.

In der vorstehenden Mitteilung¹⁾ wird die Beobachtung erwähnt, dass ein aus Substanz A gewonnener Stoff („Iso-R-diacetat“) beim Erwärmen mit Salzsäure die 11-ständige Hydroxylgruppe leicht als Wasser abspaltet. Es scheint, dass sich 11-Oxysterioide allgemein in dieser Weise dehydratisieren lassen, und diese Reaktion konnte nun für den beabsichtigten Zweck mit grossem Vorteil verwendet werden, wie dies im Folgenden erläutert wird.

Als Ausgangsmaterial wurde wieder Substanz A (I) gewählt, das in grösster Menge erhältlich ist. Durch Behandlung mit Perjodsäure wird sie, wie früher gezeigt wurde²⁾, sehr glatt zu einem Stoff abgebaut, dem die Formel (II) eines Androstan-diol-(3 β ,11)-ons-(17) zugeschrieben wurde. Wird dieser Stoff mit Salzsäure in Eisessig



gekocht, so spaltet sich 1 Mol Wasser ab, und nach anschliessender Acetylierung wird ein einheitliches Androsten-ol-on-acetat in vor-

¹⁾ 38. Mitteilung, vgl. C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. 23, 729 (1940).

²⁾ T. Reichstein, Helv. 19, 402 (1936).

züglicher Ausbeute erhalten. Die Lage der Doppelbindung ist nicht gesichert, sie erwies sich aber als leicht hydrierbar. Da früher gezeigt wurde¹⁾, dass eine Doppelbindung in 9,11-Stellung sehr schwer hydrierbar ist, so geben wir der in (IV) formulierten Lage den Vorzug. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass die Doppelbindung durch die Behandlung mit Salzsäure auch erheblich weiter gewandert ist. Für den hier verfolgten Zweck ist dieser Umstand aber ohne Bedeutung. Derselbe Stoff entsteht übrigens auch, wenn das Monoacetat (III) mit Kaliumbisulfat in Vakuum destilliert wird. Nach dieser Methode haben *Tschesche* und *Bohle*²⁾ Sarmetogenin und Digoxigenin dehydratisiert. Die Hydrierung von (IV) mit Platinoxid und die anschliessende Acetylierung gaben nun leicht reines Androstan-diol-(3 β ,17-trans)-diacetat (V)³⁾, das nach Analyse, Schmelzpunkt, optischer Drehung und Mischprobe mit authentischem Material identisch war. Zur Sicherheit wurde dieser Stoff noch verseift und das freie Diol mit Chromsäure oxydiert. Es resultierte erwartungsgemäss Androstan-dion-(3,17) (VI), das wiederum mit authentischem Material identisch war. Da die Stellung und Konfiguration der Hydroxylgruppen im Androstan-diol-(3,17) durch die Arbeiten von *Windaus*⁴⁾, *Tschesche*⁵⁾, *Ruzicka* und Mitarbeitern⁶⁾ gesichert war, so ist somit bewiesen, dass Substanz A in 3-Stellung eine Hydroxyl-Gruppe enthält und zwar, wie schon früher vermutet wurde, in β -Konfiguration. Da aber alle oben genannten, aus Nebennieren isolierten Steroide der C₂₁O₅- und C₂₁O₄-Gruppe ihre Sauerstoffatome an denselben Stellen des Kohlenstoffgerüsts tragen wie Substanz A und mit dieser durch direkte Umwandlungen eindeutig verknüpft sind⁷⁾⁸⁾⁹⁾, so ist damit bewiesen, dass sie alle in 3-Stellung ein Sauerstoffatom enthalten. Die bisher gegebenen Formeln für die Substanzen A, C, D, E, Fa, Corticosteron, Dehydro-corticosteron, M, N, R und T sind damit auch in dieser Beziehung eindeutig sicher gestellt.

Der Verfasser dankt Herrn Prof. Dr. *Reichstein* für sein stetiges Interesse und seine Ratschläge bei dieser Arbeit.

-
- 1) *J. Barnett, T. Reichstein, Helv. 22, 75 (1939).*
 2) *R. Tschesche, K. Bohle, B. 69, 2499 (1936).*
 3) *L. Ruzicka, M. W. Goldberg, H. R. Rosenberg, Helv. 18, 1497 (1935).*
 4) *A. Windaus, O. Dalmer, B. 52, 162 (1919).*
 5) *R. Tschesche, A. 498, 191 (1932).*
 6) *L. Ruzicka, M. W. Goldberg, H. Brünnger, Helv. 17, 1389 (1934); L. Ruzicka, M. W. Goldberg, J. Meyer, H. Brünnger, E. Eichenberger, Helv. 17, 1395 (1934).*
 7) 38. Mitteilung, vgl. *C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. 23, 729 (1940).*
 8) *T. Reichstein, Helv. 19, 402 (1936).*
 9) *H. L. Mason, J. Biol. Chem. 124, 475 (1938).*

Experimenteller Teil.

(Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.)

Dehydratisierung von 17-Iso-allo-pregnan-triol-(3 β ,11,21)-on-(20)-diacetat-(3,21) („Iso-R-diacetat“¹⁾)

20 mg „Iso-R-diacetat“¹⁾ wurden mit 0,5 cm³ einer Mischung von 90 Vol. % Eisessig und 10 Vol. % konz. wässriger Salzsäure 15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Es wurde im Vakuum zur Trockne gedampft und der Rückstand zur Nachacetylierung mit 0,3 cm³ absolutem Pyridin und 0,5 cm³ Essigsäure-anhydrid 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther gelöst, mit Salzsäure, Sodaauflösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt wurde aus Äther-Pentan und dann nochmals aus wenig Methanol umkrystallisiert. Dabei wurden 6 mg farbloser kleiner Nadeln erhalten, die bei etwa 146—147⁰, nach vorhergehendem Erweichen von 142⁰ an schmolzen, aber offenbar noch nicht ganz rein waren. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 100⁰ getrocknet.

3,813 mg Subst. gaben 9,96 mg CO₂ und 2,95 mg H₂O
 C₂₅H₃₆O₅ (416,54) Ber. C 72,08 H 8,71%
 Gef. „ 71,27 „ 8,65%

Die Substanz reduzierte alkalische Silber-diammin-Lösung rasch bei Zimmertemperatur und gab zum Unterschied vom Ausgangsmaterial, in einer Spur Chloroform gelöst, mit Tetranitromethan eine deutliche Gelbfärbung. Die spez. Drehung musste an einer noch weniger reinen Probe bestimmt werden, die bei 138—146⁰ schmolz. $[\alpha]_D^{17} = +33^{\circ} \pm 6^{\circ}$ (c = 0,425 in Aceton).

4,3 mg \pm 0,2 mg Subst. zu 1,0125 cm³; l = 1 dm; $\alpha_D^{17} = +0,14^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$

Androsten-(11?)-ol-(3 β)-on-(17)-acetat (IV).

a) Salzsäure. 250 mg Androstan-diol-(3,11)-on-(17) (II)²⁾ vom Smp. 235⁰ wurden mit 2,5 cm³ einer Mischung von 90 Vol. % Eisessig und 10 Vol. % konz. wässriger Salzsäure 15 Minuten unter Rückfluss gekocht, dann bei gewöhnlichem Druck auf die Hälfte eingedampft und schliesslich im Vakuum ganz getrocknet. Der Rückstand wurde mit 1 cm³ Essigsäure-anhydrid und 1,2 cm³ absolutem Pyridin 16 Stunden bei 20⁰ stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther gelöst, neutral gewaschen, getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt wurde in 0,5 cm³ absolutem Benzol gelöst, mit 4,5 cm³ Pentan verdünnt und über eine mit Pentan bereitete Säule von 7,5 g Aluminiumoxyd (*Merek*, standar-

¹⁾ C. W. Shoppee, T. Reichstein, Helv. 23, 729 (1940).

²⁾ T. Reichstein, Helv. 19, 402 (1936).

disiert nach *Brockmann*) filtriert. Es wurde mit je 20 cm³ der in der Tabelle genannten Lösungsmittel nachgewaschen, jede Fraktion für sich eingedampft und der Rückstand durch Zusatz von etwas Pentan zur Krystallisation gebracht.

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel	Rückstand
1—2	Pentan	—
3	Benzol-Pentan (1 : 1)	viel Kryst. Smp. 102°
4	„ „	Kryst. „ 102°
5	abs. Benzol	„ „ 100°
6	„ „	„ „ 98°
7	„ „	wenig Kryst. „ 98°
8	Äther-Benzol (1 : 1)	„ Öl
9	abs. Äther	Kryst. „ 218—228°
10	Aceton	wenig Kryst. „ 208—228°
11	„	—

Die Fraktionen 9 und 10 wurden vereinigt (52 mg) und im Molekularkolben bei 0,01 mm Druck und 160—165° Badtemperatur sublimiert. Das Sublimat wurde aus Essigester-Pentan umkrystallisiert und gab farblose Nadeln vom Smp. 226—229°, die sich als Acetat des unveränderten Ausgangsmaterials erwiesen.

Die Fraktionen 3—7 wurden vereinigt (203 mg) und im Molekularkolben bei 0,01 mm Druck und 135—140° Badtemperatur sublimiert, wobei kein Rückstand hinterblieb. Dann wurde aus Pentan umkrystallisiert, wobei farblose Prismen vom Smp. 102° erhalten wurden. Zur Analyse wurde eine Probe nochmals im Hochvakuum sublimiert.

4,267 mg Subst. gaben 11,93 mg CO₂ und 3,54 mg H₂O
 C₂₁H₃₀O₃ (330,45) Ber. C 76,32 H 9,15%
 Gef. „ 76,30 „ 9,23%

Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{14} = +110,8^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 1,255$ in Aceton).

12,7 mg \pm 0,2 mg zu 1,0125 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{14} = +1,39^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$

Das Produkt gibt zum Unterschied vom Ausgangsmaterial, in einer Spur Chloroform gelöst, mit Tetrannitromethan eine starke Gelbfärbung.

b) Kaliumbisulfat. 30 mg Androstan-diol-(3,11)-on-(17)-mono-acetat-(3) vom Smp. 226—229° wurden mit 1 g Kaliumbisulfat fein verrieben und hierauf 1 Stunde im Molekularkolben bei 0,05 mm Druck bei einer Badtemperatur von 135—140° erhitzt. Das krystalline Sublimat wurde mehrfach mit Pentan ausgekocht. Aus dieser Lösung wurden 6 mg farbloser Prismen gewonnen, die bei

97—99° schmolzen und mit dem oben beschriebenen, mit Salzsäure gewonnenen Produkt keine Schmelzpunkts-Erniedrigung gaben. Das in Pentan unlösliche Material erwies sich als unveränderter Ausgangsstoff.

Der im Molekularkolben verbliebene Rückstand wurde hierauf noch $\frac{1}{2}$ Stunde bei 10 mm Druck und 200° Badtemperatur weiter erhitzt. Es wurde dabei ein Sublimat erhalten, das sich vollständig in Pentan löste und beim Einengen Krystalle gab, die bei 97—99° schmolzen und mit den obigen keine Schmelzpunkts-Erniedrigung gaben. Für präparative Zwecke ist die Salzsäuremethode offenbar vorzuziehen.

Androstandiol-(3 β ,17-trans)-diacetat (V) aus (IV).

100 mg Androsten-ol-(3 β)-on-(17)-acetat (IV) wurden in 1 cm³ reinstem Eisessig gelöst und nach Zusatz von 50 mg Platinoxid bei 17° in Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Nach 1 Stunde waren 23,5 cm³ Gas aufgenommen, und die Hydrierung stand still (ber. für 2 Mol Äquiv. H₂ 13,6 cm³; für 50 mg PtO₂ · H₂O 9,2 cm³; total 22,8 cm³). Es wurde filtriert und das Filtrat im Vakuum ganz eingedampft. Der krystalline Rückstand gab keine Färbung mit Tetranitromethan. Er wurde mit 0,7 cm³ Essigsäureanhydrid und 0,8 cm³ absolutem Pyridin 45 Minuten auf 100° erwärmt. Dann wurde eingedampft, der Rückstand in Äther gelöst, die Ätherlösung neutral gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand krystallisierte sofort und schmolz roh bei 120—125°. Er wurde aus einer Spur Äther durch Zusatz von Pentan umkrystallisiert. Die Spitzenfraktion (44 mg) schmolz bei 127—129°, in guter Übereinstimmung mit den Angaben von Ruzicka und Mitarbeitern¹⁾. Eine durch Hydrierung von *t*-Dehydroandrosteron und anschließende Acetylierung bereitete Probe von Androstan-diol-(3 β ,17-trans)-diacetat zeigte denselben Schmelzpunkt, und die Mischprobe gab keine Depression. Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{14} = -1,0^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1,976$ in Aceton).

20,0 mg \pm 0,2 mg Subst. zu 1,0125 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{14} = -0,02^\circ \pm 0,02^\circ$

Es scheint, dass die spez. Drehung des Androstan-diol-(3 β ,17-trans)-diacetats bisher noch nie bestimmt worden ist, daher wurde sie auch bei der synthetischen Vergleichsprobe gemessen. Gefunden wurde $[\alpha]_D^{14} = -1,3^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,311$ in Aceton).

23,4 mg \pm 0,2 mg Subst. zu 1,0125 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{14} = -0,03^\circ \pm 0,02^\circ$

Die Übereinstimmung ist somit sehr gut. Eine Probe des aus (IV) bereiteten Diacetats wurde zur Analyse bei 170° Blocktemperatur und 0,002 mm Druck sublimiert. Sie schmolz scharf bei 129°.

4,817 mg Subst. gaben 12,99 mg CO₂ und 4,10 mg H₂O

C ₂₃ H ₃₆ O ₄ (376,52)	Ber. C 73,36	H 9,64%
	Gef. „ 73,59	„ 9,52%

¹⁾ L. Ruzicka, M. W. Goldberg, H. R. Rosenberg, Helv. **18**, 1497 (1935).

Androstan-dion (VI) aus (V).

43 mg des Diacetats (V) (Mutterlaugen des analysenreinen Produktes) wurden mit 0,35 cm³ wässriger 2-n. Kaliumhydroxydlösung und 1,7 cm³ Methanol 15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Dann wurde das freie Alkali mit Kohlendioxyd neutralisiert und nach Zusatz von Wasser das Methanol im Vakuum entfernt. Das in Blättchen ausfallende Diol wurde abgenutscht, mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 33 mg erhalten, die roh bei 166—168° schmolzen, in guter Übereinstimmung mit dem für Androstan-diol-(3,17) gegebenen Schmelzpunkt von *Ruzicka* und Mitarbeitern¹⁾.

30 mg dieses Produktes wurden in 1 cm³ reinstem Eisessig gelöst, mit 1 cm³ einer 2-proz. Chromtrioxyd-Eisessig-Lösung (= 20 mg CrO₃) versetzt und 16 Stunden bei 20° stehen gelassen. Dann wurde im Vakuum bei 25° Badtemperatur stark eingeengt, mit Wasser versetzt und mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit verdünnter Schwefelsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, stark eingeengt und mit Pentan versetzt. Nach kurzer Zeit krystallisierten 25 mg farbloser Blättchen, die bei 128—130° schmolzen. Diese wurden durch Chromatographie²⁾ über eine Säule von 0,75 g Aluminiumoxyd vorgereinigt und dann aus Äther-Pentan umkrystallisiert. Es wurden 16 mg farbloser Blättchen erhalten, die bei 132—134° schmolzen. Die Mischprobe mit authentischem Androstandion-(3,17) von demselben Schmelzpunkt gab keine Erniedrigung. Die spez. Drehung betrug: $[\alpha]_D^{14} = +100,4^{\circ} \pm 3^{\circ}$ (c = 1,175 in Alkohol).

11,9 mg \pm 0,2 mg Subst. zu 1,0125 cm³; l = 1 dm; $\alpha_D^{14} = +1,18^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$

Zur Analyse wurde bei 150° Blocktemperatur und 0,004 mm Druck sublimiert.

3,765 mg Subst. gaben 10,955 mg CO₂ und 3,29 mg H₂O

C₁₂H₂₈O₂ (288,41) Ber. C 79,12 H 9,79%

Gef. „ 79,39 „ 9,78%

Die Mikroanalysen wurden teilweise von Hrn. Dr. *A. Schoeller*, Berlin, und teilweise von Hrn. Dr. *O. Schwarzkopf*, Paris, ausgeführt.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

¹⁾ *L. Ruzicka, M. W. Goldberg, H. R. Rosenberg*, Helv. **18**, 1497 (1935).

²⁾ *M. Steiger, T. Reichstein*, Helv. **21**, 556 (1938).