

## 75. Untersuchungen über Organextrakte.

(8. Mitteilung<sup>1</sup>).

### Über die Isolierung von 3-Desoxy-equilenin aus dem Harn trächtiger Stuten

von V. Prelog und J. Führer.

(29. III. 45.)

Aus dem Harn trächtiger Stuten ist bereits eine grosse Anzahl von Steroiden isoliert worden<sup>2</sup>), deren Mannigfaltigkeit einen interessanten Einblick in die komplizierten und wenig erforschten Vorgänge des Steroid-Stoffwechsels gewährt. Die stark komplexe Zusammensetzung solcher Harne lässt vermuten, dass darin noch weitere, bisher nicht beschriebene Verbindungen enthalten sind. Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten über die Lipide und besonders über die Steroide des Säugetierkörpers haben wir deshalb eine Untersuchung der Inhaltsstoffe des Harnes trächtiger Stuten begonnen.

Als Ausgangsmaterial standen, unter anderem, die neutralen Anteile zur Verfügung, welche bei der technischen Herstellung der oestrogenen Hormone aus 200 000 Liter Harn als Nebenprodukt erhalten worden sind<sup>3</sup>). Mit einem kleineren Anteil dieses Ausgangsmaterials, der aus etwa 14 000 Liter Harn stammte, führten wir zuerst eine vorläufige Untersuchung durch. Da die Arbeit in grösserem Maßstab voraussichtlich längere Zeit in Anspruch nehmen wird, berichten wir kurz über einige bisher erhaltene Ergebnisse.

Nach der alkalischen Hydrolyse des Ausgangsmaterials wurden die neutralen Anteile einer Molekular-Destillation unterworfen und die leichter flüchtigen Anteile, welche bei Drucken unter 0,001 mm bis 140<sup>0</sup> übergingen, mit *Girard*-Reagens T<sup>4</sup>) behandelt. Aus den

<sup>1</sup>) 7. Mitt. Helv. **28**, 350 (1945).

<sup>2</sup>) Es wurden bisher unseres Wissens insgesamt etwa 26 Steroide erhalten, davon gehören 10 (9) der C<sub>18</sub>-Reihe, 4 (5) der C<sub>19</sub>-Reihe und 12 der C<sub>21</sub>-Reihe an. Vgl. A. Butenandt und H. Hoffstetter, Z. physiol. Ch. **259**, 222 (1939); A. Girard und Mitarb., C. r. **194**, 909, 1020 (1932); **195**, 981 (1932); **196**, 137 (1933); G. A. D. Haslewood, G. F. Marrian, und E. R. Smith, Biochem. J. **28**, 1316 (1934); R. D. H. Heard, Am. Soc. **60**, 493 (1938); R. D. H. Heard und M. M. Hoffman, J. Biol. Chem. **135**, 801 (1940); **138**, 651 (1941); R. D. H. Heard und A. F. McKay, J. Biol. Chem. **131**, 371 (1939); **140**, LVI (1941); H. Hirschmann und O. Wintersteiner, J. Biol. Chem. **122**, 303 (1938); **126**, 737 (1938); J. D. Jacobs und E. Laqueur, R. **58**, 77 (1939); R. E. Marker und Mitarb., Am. Soc. **59**, 1373, 2297 (1937); **60**, 210, 1559, 1561, 1565, 2442, 2931 (1938); **61**, 2537 (1939); G. F. Marrian und G. A. D. Haslewood, Biochem. J. **26**, 1227 (1932); R. Oppenauer, Z. physiol. Ch. **270**, 97 (1941); D. van Stolk und R. L. de Lenchere, C. r. **205**, 395 (1939); O. Wintersteiner, E. Schwenk, H. Hirschmann und B. Whitman, Am. Soc. **58**, 2652 (1936).

<sup>3</sup>) Für die Überlassung des Ausgangsmaterials danken wir der *Gesellschaft für chemische Industrie* in Basel.

<sup>4</sup>) A. Girard und G. Sandulesco, Helv. **19**, 1095 (1936).

erhaltenen Fraktionen konnten durch sorgfältige chromatographische Analyse an Aluminiumoxyd drei neue krystallisierte Verbindungen isoliert werden.

Die erste dieser Verbindungen ist ein neutrales Keton  $C_{18}H_{18}O$  vom Smp.  $155-157^{\circ}$  mit einem  $[\alpha]_D = +117^{\circ}$ . Es besitzt im U.V. ein charakteristisches Absorptionsspektrum, welches dem von *F. A. Askew*<sup>1)</sup> aufgenommenen Absorptionsspektrum von 1,2,3,4-Tetrahydro-phenanthren sehr ähnlich ist (vgl. Fig. 1). Unter den

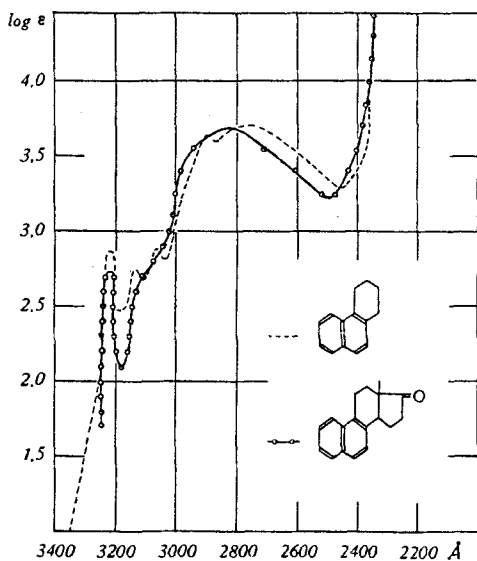
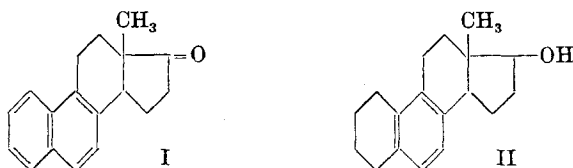


Fig. 1.

naheliegenden Annahmen, dass das bisher nicht beschriebene Keton der Steroid-Reihe angehöre und dass die Keto-Gruppe sich in 17-Stellung des Perhydro-cyclopenteno-phenanthren-Gerüsts befinde, kommt auf Grund des Absorptionsspektrums für das Keton besonders die Konstitution des 3-Desoxy-equilenins (I) in Betracht. Durch das Ergebnis der katalytischen Hydrierung mit Platinoxid-Katalysator in Eisessig unter Zusatz von Salzsäure wurde diese arbeits-hypothetisch angenommene Konstitution bestätigt. Die Verbindung nahm unter den erwähnten Reaktionsbedingungen 3 Mol Wasserstoff auf und ging dabei in den Alkohol II, das 3-Desoxy-hexahydro-equilenin über, welches durch katalytische Hydrierung von Equilenin in saurer Lösung früher erhalten worden ist<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Soc. 1935, 512.

<sup>2)</sup> *L. Ruzicka, P. Müller und E. Mörgele, Helv. 21, 1394 (1938); R. E. Marker und E. Rohrmann, Am. Soc. 61, 3314 (1939).*



Schon *R. E. Marker* und *E. Rohrmann*<sup>1)</sup> haben die Anwesenheit von 3-Desoxy-equilenin-Derivaten in Stutenharn vermutet. Sie erhielten aus einer nichtkrystallisierten „Carbinol“-Fraktion durch Oxydation mit Chromsäure eine krystallisierte Verbindung  $C_{18}H_{16}O_2$ , für welche sie die Konstitution eines 11-Keto-3-desoxy-equilenins angenommen haben. Es war jedoch bisher nicht gelungen, ein 3-Desoxy-equilenin-Derivat aus Harn direkt in krystallisierter Form zu isolieren.

Erwähnenswert ist die geringe aber deutliche oestrogene Wirksamkeit des 3-Desoxy-equilenins. Mit 100—150  $\gamma$  wurde an kastrierten weiblichen Ratten ein positiver *Allen-Doisy*-Test erhalten<sup>2)</sup>.

Die Konstitution der beiden anderen isolierten Verbindungen, welche nicht zu den Steroiden gehören, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Da es sich jedoch anscheinend um Vertreter neuer Verbindungs-Gruppen handelt, welche aus Harn nicht isoliert wurden, berichten wir trotzdem über die Ergebnisse der bisherigen Untersuchung.

Eine dieser Verbindungen, ein ungesättigtes Keton  $C_{13}H_{18}O$  vom Smp. 93,5—94,5° besitzt ein Absorptionsmaximum bei 295  $m\mu$ ,  $\log \epsilon = 4,5$  (vgl. Fig. 2, Kurve 1). Das Absorptionsmaximum seines Semicarbazons ist nach längeren Wellenlängen verschoben; es liegt bei 305  $m\mu$ ,  $\log \epsilon = 4,6$  (vgl. Fig. 2, Kurve 2). Ähnliche Verhältnisse findet man bei gewissen ungesättigten Ketonen mit dem Chromophor  $>C=CH-CH=C=O$ , wie z. B. bei Pseudojonon<sup>3)</sup>. Es ist wahrscheinlich, dass unser Keton, welches sich übrigens in seiner Bruttoformel nur um zwei Wasserstoff-Atome von den Jononen  $C_{13}H_{20}O$  unterscheidet, ein solches oder ähnliches Chromophor enthält.

Die dritte von uns erhaltene Verbindung, ein Alkohol  $C_{13}H_{20}O$  vom Smp. 88,5—90,5° wurde in Form eines schwer löslichen Allophanates vom Smp. 173—175° isoliert. Das Allophanat besass ein Absorptionsspektrum im U.V. (vgl. Fig. 2, Kurve 5), das für mehrfach substituierte Benzol-Derivate charakteristisch ist. Für die Annahme eines Benzol-Kernes im Gerüst der Verbindung spricht auch der negative Verlauf eines Hydrierungsversuches mit Platinoxid-Kataly-

<sup>1)</sup> Am. Soc. 61, 2538 (1939).

<sup>2)</sup> Für die Durchführung des *Allen-Doisy*-Testes danken wir der biologischen Abteilung der *Gesellschaft für chemische Industrie* in Basel.

<sup>3)</sup> Zum Vergleich sind in der Fig. 2 die von *A. Burawoy*, Soc. 1941, 22, gemessenen Absorptionsspektren des Pseudojonons und seines Semicarbazons (Kurven 3 und 4) eingezeichnet.

sator in Eisessig, obwohl mit Tetrannitromethan eine starke Gelbfärbung erzeugt wird. Die naheliegende Vermutung, dass die vorher erwähnte Verbindung  $C_{13}H_{18}O$  das dem Alkohol  $C_{13}H_{20}O$  entsprechende Keton darstelle, erwies sich demnach als unrichtig.

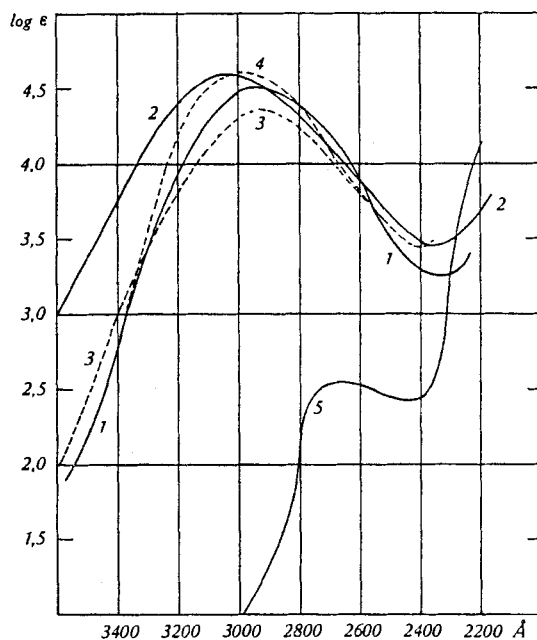


Fig. 2.

Die Untersuchung der beiden Verbindungen mit 13 Kohlenstoff-Atomen werden wir, sobald uns weiteres Material zur Verfügung steht, fortsetzen.

Der *Rockefeller Foundation* in New York und der *Gesellschaft für chemische Industrie* in Basel danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil<sup>1)</sup>.

1 kg der neutralen Anteile, welche aus etwa 20000 Liter Stutenharn als Nebenprodukt bei der Oestronfabrikation erhalten worden sind, wurden mit einer Lösung von 400 g Kaliumhydroxyd in 4 Liter Methanol während 26 Stunden in Stickstoffatmosphäre am Rückfluss gekocht. Der grösste Teil des Methanols wurde darauf im Stickstoffstrom abdestilliert, der Rückstand mit Äther überschichtet und mit 10-proz. Salzsäure bis zur congosäuren Reaktion versetzt. Nach der Auflösung der festen Anteile wurde die ätherische Lösung abgetrennt und die wässrige Schicht gründlich mit Äther extrahiert.

Aus den vereinten ätherischen Auszügen konnten die sauren Anteile durch langsames Durchtropfen verdünnter Lauge ohne Bildung lästiger Emulsionen entfernt werden. Die Konzentration der verwendeten Lauge wurde langsam gesteigert; nach Durchtropfen von 30 Liter 0,5-proz., 6 Liter 1-proz., 3 Liter 2-proz. Natronlauge und 9 Liter Wasser

<sup>1)</sup> Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

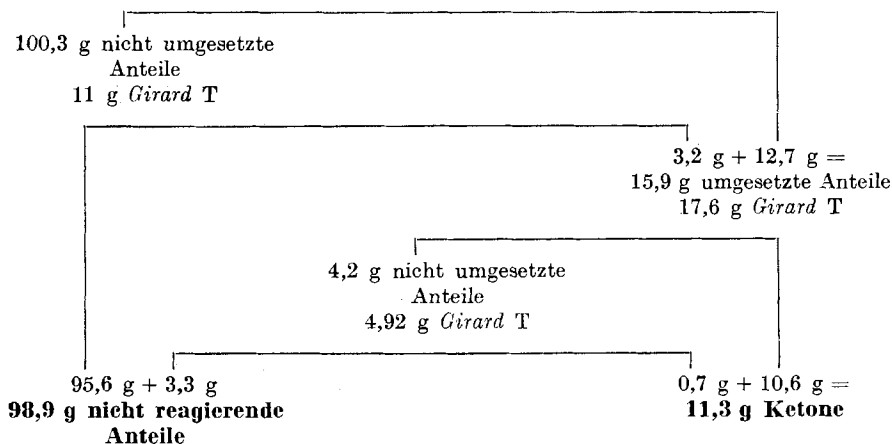
enthielt die ätherische Lösung keine Säuren mehr. Zur Entfernung der eventuell mitgerissenen neutralen Anteile liessen wir die alkalischen Waschwasser durch drei hintereinandergeschaltete Flaschen mit Äther durchtropfen. Die ganze Operation führten wir in einer Apparatur durch, welche mit reinem Stickstoff gespült wurde. Nach dem Abdampfen des Äthers wogen die neutralen Anteile 633,5 g.

Molekular-Destillation. Von den unverseiften neutralen Anteilen wurden 448,7 g (entsprechend etwa 14000 Liter Harn) weiter verarbeitet. Die Molekular-Destillation führten wir in der von *Schott & Gen.*, Jena hergestellten Apparatur für diskontinuierliche Destillation aus. Trotz der langdauernden Vorentgasung bei 0,05 mm und 60° konnte eine geringe Verunreinigung des Destillates durch Spritzen des Destillationsgutes bei der ersten Destillation nicht vermieden werden. Das Destillat, welches bei Drucken unter 0,001 mm bis 140° übergang, wurde deshalb einer nochmaligen Destillation unter denselben Bedingungen unterworfen. Nach dieser zweiten Destillation erhielten wir 129,3 g eines klaren, orangebraunen, dickflüssigen Öls, welches zwischen 90—140° destillierte. Daneben wurden in der mit Aceton-Kohlendioxyschnee gekühlten Ausfrieretasche weitere 9,65 g einer leichter flüchtigen, stark riechenden beweglichen Flüssigkeit aufgefangen. Beide Destillate wurden getrennt verarbeitet.

Isolierung und chromatographische Trennung der Ketone. Aus dem Hauptdestillat wurden die Carbonyl-Verbindungen durch mehrmalige Behandlung mit *Girard-Reagens T* abgetrennt. Die Reaktion führten wir nach einer früher veröffentlichten allgemeinen Vorschrift durch<sup>1)</sup>; es wurde nur sinngemäss die jeweils verwendete Menge des *Girard-Reagens T* geändert. Der Verlauf der Trennung (die Gewichtsmengen der erhaltenden Fraktionen und der angewandten Mengen von *Girard-Reagens T*) ist in der Übersicht I dargestellt.

Übersicht I.

116 g Destillat, 64 g *Girard T*



10,8 g der erhaltenen Ketone wurden in 100 cm<sup>3</sup> Benzol gelöst und an 324 g Aluminiumoxyd (Aktivität 2—3) chromatographiert (Chromatogramm A). Die Menge des Eluierungsmittels betrug je 100 cm<sup>3</sup> pro Fraktion.

Alle Fraktionen waren gelbe oder gelbbraune Öle. Nur aus der Fraktion 1 krystallisierte nach Bespritzen mit Petroläther etwa 15 mg des rohen 3-Desoxy-equilenins. Das nach dem Abtrennen der krystallisierten Anteile zurückgebliebene Öl, sowie die Fraktion 2 und 3—6 wurden deshalb einer zweiten chromatographischen Analyse an 30-facher Menge

<sup>1)</sup> Helv. 26, 986 (1943).

Aluminiumoxyd (Aktivität 1,5) unterworfen. So wurden z. B. 1,28 g der Fraktionen 2 an 39 g Aluminiumoxyd adsorbiert und mit je 30 cm<sup>3</sup> Lösungsmittel pro Fraktion eluiert (Chromatogramm B).

Chromatogramm A.

Nr.	Eluierungsmittel	Eluat	
1	Benzol	1,18 g	3-Desoxy-equilenin, Keton C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O
2	Benzol	1,28 g	3-Desoxy-equilenin, Keton C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O
3—6	Benzol	1,39 g	Keton C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O
7—41	Benzol	3,20 g	
42—52	Äther	3,04 g	
53—55	Methanol	0,39 g	

Chromatogramm B.

Nr.	Eluierungsmittel	Eluat g	
1—2	Benzol	0,29	3-Desoxy-equilenin
3—13	Benzol	0,395	
14—19	Äther	0,275	Keton C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O
20—21	Äther	0,02	
22—23	Methanol	0,30	

Die ersten Benzoleluate gaben nach Bespritzen mit Petroläther das rohe 3-Desoxy-equilenin, während aus den ersten Äthereluaten nach Zugabe von Petroläther bei -10° das Keton C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O krystallisierte.

### 3-Desoxy-equilenin (I).

Die aus verschiedenen Chromatogrammen stammenden Krystallisate (etwa 50 mg) wurden mehrmals aus Methanol umkrystallisiert und darauf bei 0,005 mm und 115° sublimiert. Die so erhaltenen, farblosen Nadeln schmolzen bei 155—157°.

$$[\alpha]_D^{22} = +117^\circ (\pm 3^\circ) \quad (c = 0,854 \text{ in Chloroform})$$

3,612 mg Subst. gaben 11,407 mg CO<sub>2</sub> und 2,429 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O. Ber. C 86,36 H 7,25%

Gef. „ 86,18 „ 7,53%

Das Absorptionsspektrum im U. V. (vgl. Fig. 1) wurde in alkoholischer Lösung aufgenommen.

Mikrohydrierung. 3,227 mg Substanz wurden in 2 cm<sup>3</sup> Eisessig und 1 Tropfen konz. Salzsäure mit einem Katalysator aus 15 mg vorhydriertem Platinoxid hydriert. Verbrauch 0,928 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub> (20°, 734 mm), das ist 2,9 Mol. Das Hydrierungsprodukt wurde in Äther aufgenommen, mit Wasser und Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die ätherische Lösung eingedampft. Nach Bespritzen des Rückstandes mit wenig Petroläther erhielten wir eine in weissen Nadeln krystallisierende Substanz, welche durch Schmelzpunkt und Mischprobe als 3-Desoxy-hexahydro-equilenin II identifiziert werden konnte.

Keton  $C_{13}H_{18}O$ .

Nach zweimaligem Umlösen des aus verschiedenen Chromatogramm-Fractionen erhaltenen Rohproduktes (insgesamt etwa 35 mg) aus Petroläther und wässrigem Methanol wurde mehrmals bei 0,01 mm und 45° fraktioniert sublimiert. Die in farblosen Nadeln krystallisierende Verbindung, welche mit Tetranitromethan eine starke Gelbfärbung gab, schmolz bei 93,5—94,5°.

$$[\alpha]_D = 0^\circ (\pm 2^\circ) \text{ (in Chloroform)}$$

3,684 mg Subst. gaben 11,061 mg  $CO_2$  und 3,143 mg  $H_2O$

$C_{13}H_{18}O$  Ber. C 82,06 H 9,55%  
Gef. „ 81,94 „ 9,54%

Das Semicarbazon des Ketons, welches auf übliche Weise aus 3,6 mg Substanz erhalten und aus wässrigem Alkohol umgelöst wurde, schmolz bei 105—107°.

Die Absorptionsspektren des freien Ketons und seines Semicarbazons (vgl. Fig. 2, Kurve 1 und 2) wurden in alkoholischer Lösung aufgenommen.

Alkohol  $C_{13}H_{20}O$ .

Durch einmalige Behandlung mit *Girard* Reagens T entfernten wir aus den bei der Molekular-Destillation in der Ausfrierflasche aufgefangenen leichter flüchtigen Ölen (s. S. 587) zuerst 2,5 g Carbonyl-Verbindungen. Die nicht umgesetzten Anteile (5,5 g) wurden darauf an 160 g Aluminiumoxyd (Aktivität 2—3) aus einer Lösung in 50 cm<sup>3</sup> Benzol adsorbiert und dann mit je 50 cm<sup>3</sup> Lösungsmittel pro Fraktion eluiert (Chromatogramm C).

Chromatogramm C.

Nr.	Eluierungsmittel	Eluat g	
1—6	Benzol	2,90	
7	Benzol	0,16	Allophanat ölig
8—16	Benzol	0,75	Allophanate kryst.
17—18	Benzol	0,05	Allophanate ölig
19—21	Benzol	0,06	
22—33	Äther	1,15	
34—36	Methanol	0,24	

Alle Fractionen des Chromatogramms waren ölig. Die Fraktion 8 (109 mg) wurde mit 2,5 cm<sup>3</sup> gesättigter ätherischer Cyansäure-Lösung zwei Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dem Verdampfen des Äthers blieb ein gelblich-weisser Rückstand zurück, welcher sechsmal mit siedendem Benzol ausgekocht wurde. Aus dem öligen Rückstand nach dem Verdampfen der Benzol-Auszüge konnte durch Umlösen aus wässrigem Methanol ein krystallisiertes Allophanat vom Smp. 156—160° erhalten werden. Nach sechsmaligem Umkrystallisieren aus demselben Lösungsmittel schmolz die Verbindung konstant bei 173—175°. Dasselbe Allophanat bekamen wir auf analoge Weise auch aus den Fractionen 9 und 10—16 des Chromatogramms, während 7 und 17—18 nichtkrystallisierte Produkte lieferten. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$$[\alpha]_D^{25} = +7^\circ (\pm 4^\circ) \text{ (c = 0,488 in Chloroform)}$$

3,862; 3,560 mg Subst. gaben 9,167; 8,449 mg  $CO_2$  und 2,759; 2,541 mg  $H_2O$

$C_{15}H_{22}O_3N_2$  Ber. C 64,72 H 7,97%  
Gef. „ 64,78; 64,76 „ 7,99; 7,99%

Das Absorptionsspektrum im U. V. (vgl. Fig. 2, Kurve 5) wurde in alkoholischer Lösung aufgenommen. Die Verbindung gab eine starke Gelbfärbung mit Tetranitromethan,

nahm jedoch bei einem Hydrierungsversuch (2,865 mg Substanz in 2 cm<sup>3</sup> Eisessig, Katalysator aus 10 mg Platinoxid) keinen Wasserstoff auf.

25 mg des Allophanats wurden 1 Stunde auf dem Wasserbad mit 1 cm<sup>3</sup> 10-proz. methanolischer Kalilauge gekocht. Die Lösung wurde mit 5 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt und das Produkt in Äther aufgenommen. Nach dem Verdampfen des Äthers blieben 18 mg eines öligen Rückstandes zurück, welcher nach Zugabe von Petroläther krystallisierte. Nach zweimaligem Umlösen aus Petroläther wurde bei 0,02 mm und 60° sublimiert, Smp. 88,5—90,5°.

3,704 mg Subst. gaben 10,959 mg CO<sub>2</sub> und 3,431 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O Ber. C 81,20 H 10,48%  
 Gef. „ 80,74 „ 10,37%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser ausgeführt.

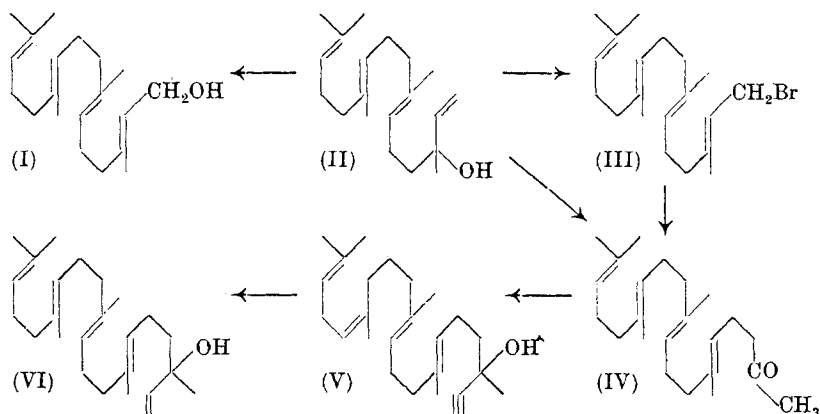
Organisch-chemisches Laboratorium der  
 Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

## 76. Synthese des Geranyl-nerolidols

von L. Ruzicka und L. Castro.

(29. III. 45.)

*Ruzicka* und *Firmenich* haben vor mehreren Jahren die Synthese des Geranyl-geraniols (I) beschrieben<sup>1</sup>). Wir berichten nun über die Darstellung des Geranyl-nerolidols (VI), die nach der zum Teil schon früher ausgearbeiteten Methodik durchgeführt wurde. Das Geranyl-linalool (II) wurde nach dem von *M. F. Carroll*<sup>2</sup>) ausgearbeiteten Verfahren – Erhitzen eines tert. Allyl-carbinols mit Acetessigester in Anwesenheit von Spuren Alkali – ins Geranyl-geranyl-aceton (IV) übergeführt. In besserer Ausbeute erhielten wir IV bei der Umsetzung des Geranyl-geranyl-bromids (III) mit Natrium-acetessigester und der



<sup>1</sup>) Helv. 22, 392 (1939).

<sup>2</sup>) Soc. 1940, 704.