

## Zusammenfassung.

Es wird die Herstellung von  $\Delta^5$ -Androsten-3  $\beta$ , 17  $\beta$ -diol-3- und 17-monoestern der 4-Amino-2-sulfo-benzoesäure beschrieben. Zur Synthese dieser Ester eignet sich das 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure-endoanhydrid, welches nach verschiedenen Verfahren hergestellt wurde, am besten.

Die Alkalisalze dieser Ester sind wasserlöslich und lassen sich diazotieren. Die diazotierten Verbindungen wurden mit verschiedenen Proteinen zu Androstendiol-azoproteinen gekuppelt. In einem Falle wurde ein solches Azoprotein verseift, wobei Androstendiol zurückgewonnen werden konnte.

Organisch-Chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

## 26. Versuche zur Herstellung künstlicher Komplexantigene der Steroidreihe.

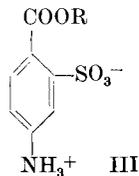
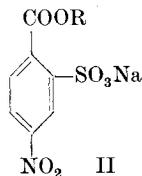
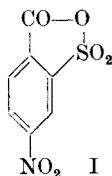
2. Mitteilung.

### Weitere Steroidester der 4-Amino-2-sulfo-benzoesäure

von C. A. Grob und W. A. Goldberg.

(18. XII. 48.)

In der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> haben wir über eine Methode zur Herstellung wasserlöslicher, diazotierbarer Steroidderivate berichtet. Diese beruht auf der leichten Veresterbarkeit der 3- resp. 17-ständigen Hydroxylgruppe des  $\Delta^5$ -Androsten-3  $\beta$ , 17  $\beta$ -diols mit 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure-endoanhydrid (I). Die so erhaltenen Ester konnten in Form ihrer Salze (II, R = Steroidrest) isoliert und durch Reduktion in 4-Amino-2-sulfo-benzoesäureester (III), welche als Alkalisalze wasserlöslich sind, übergeführt werden. Diese Ester liessen sich diazotieren und mit Proteinen kuppeln.



Es war zu erwarten, dass sich diese Methode auch auf andere Steroide übertragen liesse, und so haben wir in der Folge versucht,

<sup>1)</sup> Grob und Goldberg, Helv. **32**, 172 (1949).

analoge Ester des  $\Delta^5$ -3-Chlor-androsten-17  $\beta$ -ols (IVa) und des Oestradiols (Va) herzustellen. Wir hofften, diese Ester diazotieren und mit Proteinen kuppeln zu können, um auf diese Weise zu markierten Antigenen zu gelangen. Obschon sich die Verbindungen IVa und Va gut mit Nitro-sulfo-benzoesäure-anhydrid verestern liessen, scheiterte der letzte Teil dieses Planes an der Unmöglichkeit, die Amino-sulfo-benzoesäureester IVb und Vb in reiner, krystalliner Form zu erhalten. Wir haben ferner mit ebensowenig Erfolg versucht, Ester der 4-Amino-phtalsäure herzustellen, worüber anschliessend berichtet wird.

3-Chlor-androsten-17  $\beta$ -ol ist von *Kuwada* und *Miyasaka*<sup>1)</sup> in guter Ausbeute durch partielle Chlorierung von  $\Delta^5$ -Androsten-3  $\beta$ , 17  $\beta$ -diol (VIa) mittels Thionylchlorid in Gegenwart von Calciumcarbonat erhalten worden. Wir haben diese Angaben bestätigen können. Da aber das erhaltene Produkt oft erst nach chromatographischer Reinigung gut krystallisierte, haben wir noch einen zweiten Weg untersucht, nämlich die katalytische Hydrierung von  $\Delta^5$ -3-Chlorandrosten-17-on (IX). *Wallis* und *Fernholz*<sup>2)</sup> haben eine ausgiebige Methode zur Herstellung letzterer Verbindung entwickelt, welche in der Einwirkung von Phosphorpentachlorid auf  $\beta$ -Dehydroandrosteron (VIII) besteht. Die Reduktion des Chlorketons IX zum 3-Chlor-androsten-17-ol (VII) gelingt befriedigend mit Wasserstoff und *Raney*-Nickel, wenn durch Zusatz einer Spur Essigsäure zum neutral gewaschenen Katalysator der letzte Rest anhaftenden Alkalis beseitigt wird.

Die Veresterung des Chlor-androstenols (VII) mit 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure-anhydrid (I) fand in üblicher Weise statt. Der Nitro-ester X wurde als Pyridinsalz und als Kaliumsalz isoliert. Die Reduktion der Nitrogruppe im Kaliumsalz von X wurde mit Wasserstoff und *Raney*-Nickel durchgeführt. Das entstandene Amin IVb, welches durch Diazotieren und Kuppeln mit R-Salz nachgewiesen wurde, konnte jedoch nur sehr schwer zur Krystallisation gebracht werden. Auch die Reduktion mit Zinn(II)-chlorid und Chlorwasserstoff<sup>3)</sup>, welche von *King* und *Franks*<sup>4)</sup> zur Reduktion des p-Nitrophenyläthers des Oestrans mit Erfolg verwendet wurde, führte nicht zu einem besser krystallisierbaren Produkt.

Wir haben uns dann der Herstellung des Oestradiol-17-(4'-amino-2'-sulfo)-benzoats (Vb) zugewandt, zu dem in der Veresterung von Oestradiol-3-acetat (XI) mit Nitro-sulfo-benzoesäure-anhydrid

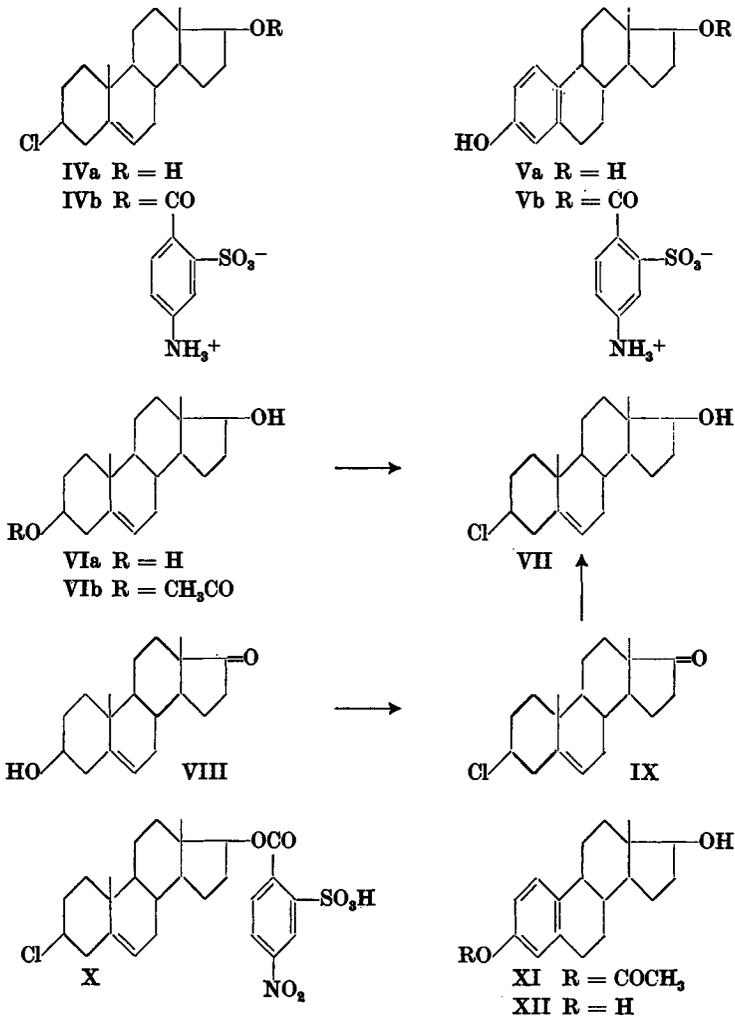
1) *Kuwada* und *Miyasaka*, J. Pharm. Soc. Jap. **57**, 232 (1937), zitiert nach C. **1938**, II, 1611.

2) *Wallis* und *Fernholz*, Am. Soc. **59**, 764 (1937).

3) *Thiele*, A. **305**, 114 (1899).

4) *King* und *Franks*, Am. Soc. **63**, 2042 (1941).

(I) zu XIII, der partiellen Verseifung zu XIV und anschliessenden Reduktion ein gangbarer Weg führt.

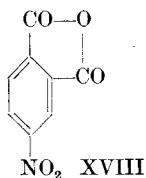
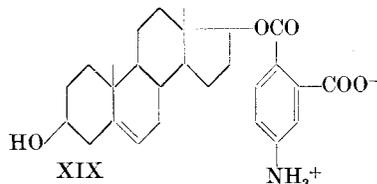
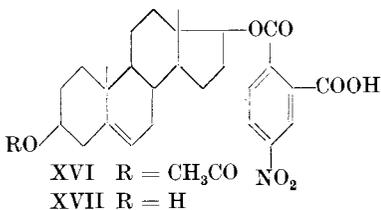
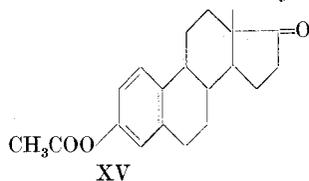
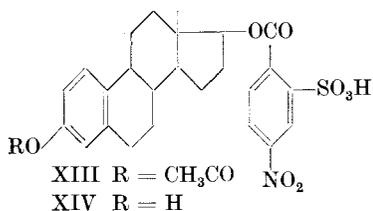


Von *Miescher* und *Scholz*<sup>1)</sup> wird als Darstellungsmethode für Oestradiol-3-acetat (XI) die Reduktion von Oestron-acetat (XV) angegeben. Da uns aber Oestradiol (XII) zur Verfügung stand, wurde versucht, durch partielle Acetylierung dieser Verbindung das 3-Monoacetat zu erhalten. Dies gelang bei der Behandlung von Oestradiol mit der berechneten Menge Acetanhydrid in Gegenwart von Pyridin. Das so erhaltene Oestradiol-3-monoacetat (XI) liess sich glatt mit Nitro-sulfo-benzoesäure-anhydrid in 17-Stellung verestern. Um zum

<sup>1)</sup> *Miescher* und *Scholz*, Helv. **20**, 264 (1937).

Oestradiolderivat mit freier 3-ständiger Hydroxylgruppe (XIV) zu gelangen, ist die partielle Verseifung der Acetoxygruppe in XIII notwendig. Vorversuche ergaben, dass dies durch kurzes Erhitzen mit Natriumcarbonatlösung erfolgt, bei Bedingungen also, unter denen der substituierte Benzoesäurerest in 17-Stellung nicht angegriffen wird. Man gewinnt so das Natriumsalz der Verbindung XIV (Natrium statt H), welches in Wasser unlöslich, in verdünntem Alkohol jedoch löslich ist und krystallin erhalten werden kann.

Obschon bei der katalytischen Hydrierung von XIV mit Wasserstoff über *Raney*-Nickel die erforderliche Menge Wasserstoff aufgenommen und das Amin durch Diazotieren und Kuppeln mit R-Salz nachgewiesen wurde, konnte die Amino-sulfo-säure Vb nicht in krystalliner Form erhalten werden. Auch die Reduktion nach *Thiele*<sup>1)</sup> ergab keine besseren Resultate.



Da es uns darauf ankam, für die biologischen Versuche nur reine, wohldefinierte Verbindungen zu verwenden, wurde nach einer Variante zur Herstellung diazotierbarer Steroidderivate gesucht. Wir untersuchten deshalb die Verwendung von 4-Amino-phthalsäure als diazotierbare Komponente. Die dabei gemachten Erfahrungen waren aber nicht ermutigend, indem trotz ziemlich energischer Bedingungen die Umsetzung von Nitro-phthalsäure-anhydrid (XVIII) mit Androstendiol-3-mono-acetat (VIb) nicht vollständig erfolgte. Der Halb-

<sup>1)</sup> *Thiele*, loc. cit.

ester XVI konnte nicht analysenrein erhalten werden, so dass mit Kaliumhydrogencarbonat direkt zum krystallinen 3-Oxy-derivat (XVII) partiell verseift wurde. Letzteres wurde mit *Raney*-Nickel und Wasserstoff in wässrigem Alkohol reduziert, wobei unter Aufnahme der theoretischen Menge Wasserstoff eine schwer krystallisierbare Aminosäure erhalten wurde. Diese lieferte nach Diazotieren und Kuppeln mit R-Salz einen roten Farbstoff. Da es aber nicht gelang, die Aminosäure XIX in analysenreinem Zustand zu fassen, wurde der Weg nicht weiter verfolgt.

Aus den bisher gemachten Erfahrungen geht hervor, dass sich die Diazoniummethode nicht besonders zur Herstellung von Steroid-konjugierten Proteinen eignet. Dies liegt vor allem an den unerfreulichen physikalischen Eigenschaften der diazotierbaren Steroid-derivate, welche zunächst hergestellt werden müssen. Da die Notwendigkeit zur Einführung eines grösseren Molekelrestes bei der Azidmethode wegfällt, wurde im weiteren diese Methode untersucht, worüber wir in einer weiteren Mitteilung berichten.

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

#### *A*<sup>5</sup>-3-Chlor-androstenol-(17 $\beta$ ) (VII).

a) 4,5 g 3-Chlor-androstenon-(17)<sup>2)</sup> wurden in 40 cm<sup>3</sup> kaltem Feinsprit gelöst und mit möglichst alkalifreiem Nickel aus 4 g *Raney*-Legierung unter Zusatz einer Spur Eisessig hydriert. Nachdem 90% der Theorie an Wasserstoff aufgenommen waren, kam die Hydrierung zum Stillstand. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Nach zweimaligem Umlösen aus Methanol wurden 3,25 g reines Produkt vom Smp. 166—166,5° erhalten.

3,650 mg Subst. gaben 9,899 mg CO<sub>2</sub> und 3,147 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>OCl Ber. C 73,88 H 9,46% Gef. C 74,01 H 9,65%

b) 500 mg Androstendiol, 500 mg getrocknetes Calciumcarbonat und eine Lösung von 1 g Thionylchlorid in 25 cm<sup>3</sup> absolutem Benzol wurden während einer Stunde unter Rückfluss gekocht. Der Überschuss an Thionylchlorid wurde mit dem Benzol im Vakuum abgedampft, der Rückstand mit Äther in einen Scheidetrichter gespült. Das Calciumcarbonat wurde mit verdünnter Salzsäure zersetzt und die Ätherlösung gründlich mit verdünnter Natronlauge und Wasser gewaschen. Da der nach dem Trocknen und Abdampfen des Äthers verbleibende Rückstand braun gefärbt war und nicht schön krystallisierte, wurde er durch eine Aluminiumoxyd-Säule chromatographiert. Die Benzolfraktion ergab 460 mg Substanz vom Smp. 163°, die mit dem auf anderem Wege hergestellten Produkt bei der Mischprobe keine Erniedrigung des Schmelzpunktes gab.

#### *A*<sup>5</sup>-3-Chlor-androstenol-(17 $\beta$ )-(4'-nitro-2'-sulfosäure)-benzoat (X).

500 mg 3-Chlor-androstenol wurden mit 390 mg Nitro-sulfo-benzoesäure-anhydrid in 30 cm<sup>3</sup> absolutem Benzol während einer Stunde auf dem Wasserbad unter Rückfluss und Feuchtigkeitsausschluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde ein Teil der Benzollösung mit Pyridin versetzt und zur Trockne verdampft. Das Pyridinsalz wurde aus Alkohol-Pyridin umkrystallisiert. Nach viermaligem Umlösen schmolz die Substanz bei 177—179° unter Braunfärbung.

4,248 mg Subst. gaben 9,277 mg CO<sub>2</sub> und 2,280 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>ClS Ber. C 60,32 H 6,04% Gef. C 59,60 H 6,00%

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

<sup>2)</sup> *Wallis* und *Fernholz*, loc. cit.

Die Substanz, die schon beim Trocknen bei 90° sich verfärbt, konnte nicht reiner erhalten werden.

Der Rest der Benzollösung wurde mit einer wässrigen Lösung von Kaliumhydrogencarbonat geschüttelt, wobei das Kaliumsalz ausfiel. Es wurde abgenutscht und mit Wasser gewaschen. Die Substanz ist unlöslich in Wasser, schwerlöslich in Alkohol, leichtlöslich in verdünntem Alkohol oder Aceton. Sie wurde viermal aus Alkohol-Wasser (8:2) umkrystallisiert, wobei schöne Nadeln erhalten wurden. Zur Analyse wurde 18 Stunden im Luftstrom bei 122° getrocknet und mit Bichromat verbrannt.

4,884 mg Subst. gaben 9,69 mg CO<sub>2</sub> und 2,35 mg H<sub>2</sub>O  
 C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>O<sub>7</sub>NCISK Ber. C 54,20 H 5,42% Gef. C 54,14 H 5,38%

#### A<sup>5</sup>-3-Chlor-androstenol-(17)-(4'-amino-2'-sulfosäure)-benzoat (IVb).

Das Kaliumsalz wurde in wässrigem Feinsprit gelöst und mit sorgfältig neutral gewaschenem Nickel hydriert, bis 3 Mol Wasserstoff aufgenommen waren. Die filtrierte Lösung wurde dann im Vakuum eingeeengt und mit verdünnter Salzsäure die freie Aminosulfosäure gefällt und abgenutscht. Aus Wasser-Pyridin liessen sich Krystalle vom Smp. 245—250° erhalten, die sich aber nicht weiter reinigen liessen und nicht analysenrein erhalten werden konnten. Die Substanz liess sich diazotieren und mit alkalischer R-Salzlösung kuppeln.

Reduktion mit *Thiele*-Lösung: Die Reduktionslösung wurde durch Lösen von 90 g Zinn(II)-chlorid in 150 cm<sup>3</sup> Eisessig und Sättigung der Lösung mit HCl-Gas hergestellt. Die Lösung wurde dann mit Eisessig auf 200 cm<sup>3</sup> aufgefüllt.

400 mg des Kaliumsalzes der Nitroverbindung wurden in wenig Eisessig gelöst und mit 15 cm<sup>3</sup> obiger Lösung während 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Allmählich fiel ein feiner Niederschlag aus, der offenbar das Zinn-Doppelsalz darstellte. Dieser wurde abgenutscht und mit Eisessig gewaschen. Das Salz wurde dann in Methanol gelöst und durch Einrühren desselben in kalte, verdünnte Natronlauge das Doppelsalz zerlegt. Das Amin fiel in schleimiger Form aus und musste abzentrifugiert werden. Es wurde in Wasser-Alkohol aufgenommen und durch Versetzen mit verdünnter Salzsäure die freie Sulfosäure hergestellt. Diese konnte aber nicht in kristalliner Form erhalten werden.

#### Oestradiol-(3, 17)-3-monoacetat.

0,4 g Oestradiol wurden in einem Wägegläschen in 4 cm<sup>3</sup> absolutem Pyridin gelöst. Dann wurden 0,15 g Acetanhydrid eingewogen und das Gemisch 36 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es wurde dann in Äther aufgenommen und mit verdünnter Salzsäure, verdünnter Sodalösung und mit Wasser gewaschen. Die Ätherlösung wurde mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther abgedampft. Der Rückstand wurde aus Essigester-Hexan umkrystallisiert, wobei 0,3 g Monoacetat in Form von spießigen Nadeln vom Smp. 130—132° erhalten wurden. Nach nochmaligem Umlösen aus Essigester-Hexan schmolz die Substanz bei 135—136°.

Verseifungsversuch: 32 mg Oestradiol-3-monoacetat wurden in einer Mischung von 2 cm<sup>3</sup> Dioxan und 1 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und mit 1 cm<sup>3</sup> einer verdünnt-alkoholischen Sodalösung (hergestellt durch Lösen von 500 mg Soda in 16 cm<sup>3</sup> 50-proz. Alkohol) versetzt. Die Lösung wurde während 15 Minuten auf dem Dampfbad erhitzt, dann in Wasser gegossen und der Niederschlag ausgeäthert. Die ätherische Lösung wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet und der Äther abgedampft. Das zurückgewonnene Oestradiol schmolz bei 174—175,5°.

#### Oestradiol-(3, 17)-17-(4'-nitro-2'-sulfosäure)-benzoat (XIV).

314 mg Oestradiol-3-monoacetat und 230 mg Nitro-sulfo-benzoesäureanhydrid wurden in 40 cm<sup>3</sup> absolutem Benzol gelöst und auf dem Wasserbad während 1 ½ Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wurde alles Benzol im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit 6 cm<sup>3</sup> verdünnt-alkoholischer Sodalösung (hergestellt aus 500 mg kalz. Soda und 16 cm<sup>3</sup> 50-proz. Alkohol) 20 Minuten auf dem Wasserbad unter Rückfluss

gekocht. Anfangs ging alles in Lösung; gegen Ende der Reaktion schied sich ein gallertiger Niederschlag aus. Der Sodaüberschuss wurde mit einigen Tropfen Eisessig neutralisiert und das Ganze im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand war in verdünntem Alkohol löslich, in Wasser unlöslich. Der Nitro-ester wurde daher viermal mit ca. 80 cm<sup>3</sup> Wasser digeriert, wobei jedesmal die gallertige Suspension durch Zentrifugieren geklärt wurde. Der gewaschene Niederschlag wurde aus Methanol umkrystallisiert, wobei sich nach einigen Tagen das Natrium-Estersalz in kugeligen Krystallen ausschied.

3,772 mg Subst. gaben 7,922 mg CO<sub>2</sub> und 1,739 mg H<sub>2</sub>O  
 C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>NSNa Ber. C 57,35 H 5,01% Gef. C 57,31 H 5,16%

Bei der Reduktion mit Nickel und Wasserstoff in Feinsprit wurden 3 Mol Wasserstoff aufgenommen. Das isolierte Produkt gab nach dem Diazotieren mit R-Salz einen roten Farbstoff, konnte aber nicht zur Krystallisation gebracht werden.

#### Δ<sup>5</sup>-Androsten-3β,17β-diol-17-(4'-nitro-1')-phtalat (XVII).

1 g Androstendiol-3-monoacetat und 0,59 g Nitro-phtalsäureanhydrid wurden in 10 cm<sup>3</sup> absolutem Pyridin gelöst und im Ölbad 6 Stunden bis zum gelinden Sieden des Pyridins erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Hauptmenge des Pyridins im Vakuum abgedampft und der Rückstand in Äther aufgenommen. Die Ätherlösung wurde mit verdünnter Salzsäure und mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der nach dem Entfernen des Äthers zurückbleibende Ester war in Aceton, Äther, Alkohol, Benzol und Chloroform löslich, in Benzin und Ligroin schwerlöslich. Es gelang nicht, schöne Krystalle zu erhalten, sodass direkt verseift wurde.

1 g des obigen rohen Δ<sup>5</sup>-Androsten-3β,17β-diol-17-(4'-nitro-1')-phtalsäurehalbesters wurde mit 25 cm<sup>3</sup> Methanol und 25 cm<sup>3</sup> einer 5-proz. wässrigen Kaliumhydrogencarbonatlösung versetzt und 1½ Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde der grösste Teil des Methanols im Vakuum abgedampft und mit verdünnter Salzsäure kongosauer gemacht. Der Halbester, der in fast allen organischen Lösungsmitteln schwer löslich ist, wurde abgenutzt und mit Wasser gewaschen. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Dioxan-Wasser konnten feine Nadelchen vom Smp. 266,5<sup>0</sup> (Zers.) erhalten werden.

3,903 mg Subst. gaben 9,603 mg CO<sub>2</sub> und 2,405 mg H<sub>2</sub>O  
 C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>O<sub>7</sub>N Ber. C 67,06 H 6,88% Gef. C 67,14 H 6,90%

Das Natriumsalz ist in Wasser praktisch unlöslich, löslich jedoch in 50-proz. Alkohol. Die Reduktion des Natriumsalzes in verdünntem Alkohol erfolgte unter Aufnahme der theoretischen Menge Wasserstoff. Nach Ansäuern mit Essigsäure fiel ein mikrokrystalliner Niederschlag aus, der aus verdünntem Dioxan Krystalle vom Smp. 190—193<sup>0</sup> gab. Diese konnten durch mehrmaliges Umkrystallisieren nicht gereinigt werden und waren jedesmal schwerer abzuscheiden.

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

#### Zusammenfassung.

Δ<sup>5</sup>-3-Chlor-androsten-17β-ol und Oestradiol wurden in 17-Stellung mit 4-Nitro-2-sulfo-benzoesäure verestert. In beiden Fällen konnten die durch Reduktion der Nitrogruppe erhältlichen 4-Amino-2-sulfo-benzoesäureester nicht analysenrein erhalten werden.

Die Verwendung von 4-Amino-phtalsäure zur Herstellung von diazotierbaren Steroidderivaten bietet keinen Vorteil.

Allgemein erwies sich die Diazoniummethode zur Herstellung von Steroid-konjugierten Proteinen als nicht besonders geeignet.

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