

Synthese von Testosteron-17 α -T und Hydrocortison-11 α -T

W. CHRIST •, M. WENZEL • und P. E. SCHULZE ◦

• Physiol.-Chemisches Institut der Freien Universität Berlin

◦ Hauptlaboratorium der Schering A. G., Berlin

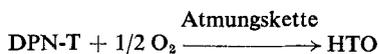
Eingegangen am 10 März 1967

SUMMARY

For the in vivo-measurements of the oxidation of steroid-alcohols to steroid-ketones testosterone-17 α -T and hydrocortison-11 α -T were synthesized by the reduction of the corresponding 17- or 11-ketones with LiBT₄ after ketalization of the other keto-groups with aethylenglycol. Purification from radioactive by-products in analytical and preparative scale was easily achieved by thin-layer-chromatography combined with automatic scanning of the radio-activity by the 2-dimensional Berthold-«Dünnschicht-Scanner».

EINLEITUNG.

Für die Bestimmung der *in vivo*-Oxydation von Hydroxy-Steroiden durch Messung der Tritium-Aktivität im Körperwasser benötigt man Steroide, die am C-Atom, das eine Hydroxylgruppe trägt, ebenfalls eine C-T-Bindung aufweisen ^(1, 2). Bei der Oxydation im Organismus wird das Tritium aus dem Molekül entfernt und auf die Wasserstoff übertragenden Coenzyme DPN oder TPN übertragen und letztlich zu Wasser [HTO] verbrannt nach für Hydrocortison angegebenem Schema :



Für derartige Untersuchungen wurden

Oestradiol-17 α -T

Testosteron-17 α -T und

Hydrocortison-11 α -T

mit möglichst hoher spezifischer Aktivität benötigt, um bei den *in vivo*-Versuchen mit physiologischen Dosen von Steroiden arbeiten zu können.

Die Herstellung von Oestradiol-17 α -T ist bereits früher beschrieben worden ^(1, 2).

Bisher sind erst wenige Arbeiten erschienen, die sich mit der Reduktion von Steroidketonen mit dem Ziel befassen, eine Tritium-Markierung an einem C-Atom, das eine Hydroxylgruppe trägt, zu erreichen.

K. J. H. Williams und R. S. Rosenfeld ⁽³⁾ berichten 1963 über die Darstellung von 3 α -T- Δ^5 -androgen-3 β -ol-17-on (spezifische Aktivität « 1660 Ipm/mg » ?) aus 17.17-Aethyldioxy- Δ^5 -androgen-3-on durch Reduktion mit LiAlT₄.

Von Baulieu *et al.* ^(4, 5) erschien 1963 eine Arbeit über die Synthese von 17 α -T- Δ^5 -androgen-3 β .17 β -diol (spezifische Aktivität 42,5 μ c/ μ Mol = 146 μ c/mg), durch Reduktion von Δ^5 -Androgen-3 β -ol-17-on mit NaBT₄.

ALLGEMEINER TEIL.

Bei der Synthese von Testosteron-17 α -T gingen wir einen anderen Weg, als den von Baulieu, Diczfalusy *et al.* ⁽⁶⁾ 1964 angegebenen. Letztere reduzierten Δ^4 -Androgen-3.17-dion mit Natriumbortritid und oxydierten das entstandene Reduktionsprodukt partiell am C-Atom 3 mittels MnO₂, wobei sie Testosteron-17 α -T (spezifische Aktivität 34,75 mc/mMol = 34,75 mc/290 mg = 120 μ c/mg) erhielten.

Das von uns hergestellte Testosteron-17 α -³H wies dagegen eine spezifische Aktivität von 171 mc/mMol = 171 mc/290 mg = 590 μ c/mg auf. Neben dem von P. E. Schulze ⁽²⁾ synthetisierten Oestradiol-17 α -T (spezifische Aktivität 640 μ c/mg) ist es die höchste spezifische Aktivität, die bisher bei der Synthese eines Steroidalkohols aus dem entsprechenden Keton durch Reduktion mit LiBT₄ oder NaBT₄ beschrieben wurde.

Die spezifische Aktivität des analog reduzierten Hydrocortison-11 α -T betrug erstaunlicherweise nur 69,6 mc/mMol = 69,6 mc/364,5 mg = 191 μ c/mg. Diese geringere Aktivität, die nur ca. 40% derjenigen des Testosteron-17 α -T beträgt — obwohl bei der Reduktion jeweils die Hälfte der gleichen LiBT₄ Charge verwendet wurde — kann durch die starke sterische Behinderung der Ketogruppe am C-Atom 11 in Zusammenwirken mit dem Isotopieeffekt erklärt werden.

Wie bereits bei anderen Synthesen Tritium-markierter Steroide haben sich zur Reinigung und zur Reinheitskontrolle dünnschichtchromatographische Verfahren zusammen mit der direkten automatischen Messung der Aktivitätsverteilung auf der Dünnschichtplatte mit dem Berthold Dünnschicht-Scanner * besonders bewährt (Vergl. Abb. 1-3).

* Labor Prof. Dr. Berthold, 7547, Wildbad.

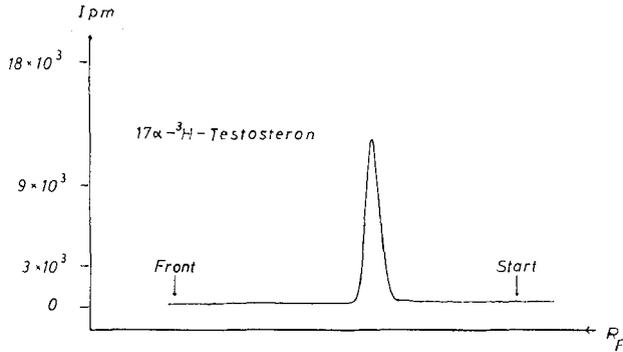


ABB. 1. Radiochromatogramm des dünnstichtchromatographisch gereinigten Testosteron-17 α -T. (Fließsystem : Chloroform/Aceton, 90 : 10). Kieselgel HF₂₅₄. Aktivitätsmessung mit « Dünnsticht-Scanner » LB 2571 der Firma Berthold.

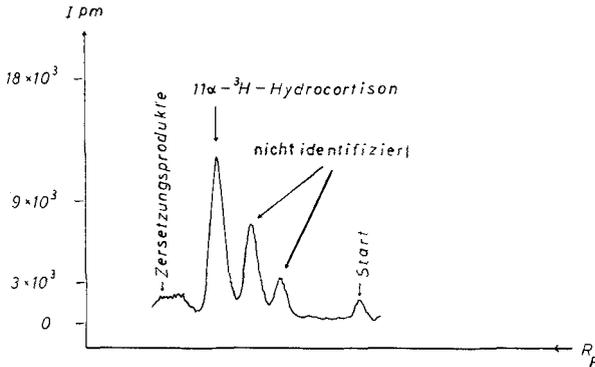


ABB. 2. Radiochromatogramm des Hydrocortison-11 α -T vor der dünnstichtchromatographischen Reinigung. (Fließsystem : Essigester/Xylol/Methanol, 90 : 10 : 10). Kieselgel HF₂₅₄.

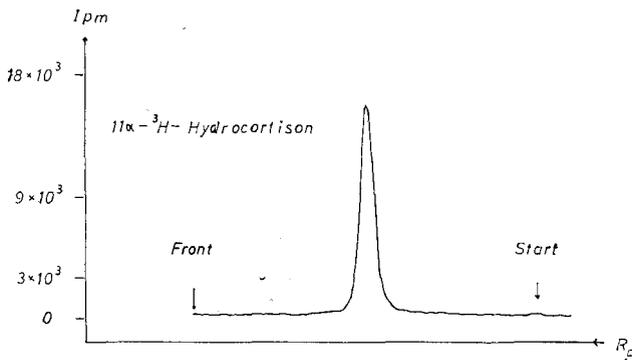


ABB. 3. Radiochromatogramm des Hydrocortison-11 α -T nach der zweiten dünnstichtchromatographischen Reinigung. (Fließsystem : Essigester/Xylol/Methanol, 90 : 10 : 10). Kieselgel HF₂₅₄.

SYNTHESE UND REINDARSTELLUNG VON TESTOSTERON-17 α -T.

Testosteron wurde durch Ketalisierung mit Aethylenglykol⁽⁷⁾ bzw. durch Transketalisierung mit 2-Aethyl-2-methyl-1,3-dioxolan (Dauben u. Ringold⁽⁸⁾) in 3,3-Aethylendioxy- Δ^5 -androsten-17 β -ol (F. 181-183 °C) umgewandelt, welches am C-Atom 17 mit Hilfe des Chromtrioxyd-Pyridin-Komplexes⁽⁹⁾ oxydiert wurde. 70 mg des entstandenen 3,3-Aethylendioxy- Δ^5 -androsten-17-on (F. 199 °C) wurden mit 9 mg LiBT₄ (27 mg LiBH₄ wurden in einer Wilzbach-Apparatur 5 Tage einer Tritium-Gasatmosphäre von 10 c bei 200 °C ausgesetzt) in 10 ml abs. Tetrahydrofuran 6 Stunden unter Rückfluß erhitzt, wobei ständig ein schwacher Stickstoffstrom durch die Apparatur geleitet wurde. Das quantitativ entstandene 3,3-Aethylendioxy-17 α -T- Δ^5 -androsten-17 β -ol wurde nicht isoliert, sondern in Lösung durch säurekatalysierte Hydrolyse in Testosteron-17 α -T überführt. Zur Abspaltung der Aethylendioxy-Gruppe wurden zu der Tetrahydrofuran-Lösung 1,3 ml 1 *n* wäßrige HCl zugetropft und das Reaktionsgemisch, welches auf pH 3 eingestellt war, 3 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das erkaltete Gemisch wurde mit 10 ml gesättigter Na₂SO₄-Lösung versetzt und das Testosteron-17 α -T 6 mal mit Dichlormethan extrahiert. Das unreinigte Testosteron-17 α -T (83 mg) wurde auf eine 2 mm stark mit Kieselgel HF₂₅₄ (Firma E. Merck AG, Darmstadt) beschichtete Dünnschichtplatte (20 × 20 cm) aufgetragen. Die Platte wurde 4mal im Dünnschichtsystem Cyclohexan/Essigester, 90 : 30, entwickelt. Das Testosteron-17 α -T-Band wurde abgeschabt und mit 50 ml Aceton in einer Glassäule eluiert.

Ausbeute : 60 mg = 100% d.Th. (bezogen auf 3,3-Aethylendioxy- Δ^5 -androsten-17 α -on) chromatographisch und radiochemisch völlig reines Testosteron-17 α -T (Abb.1).

SYNTHESE DES HYDROCORTISON-11 α -T.

Aus Cortison und Aethylenglykol wurde durch direkte Ketalisierung das 3,3; 20,20-Bis-(äthylendioxy)- Δ^5 -pregnen-17 α ,21-diol-11-on (F. 233-240 °C) analog zu den Arbeiten von R. Antonucci, S. Bernstein u. W. S. Allen^(10, 11) gewonnen. 70 mg davon wurden mit 9 mg LiBT₄ (es wurde dieselbe Charge verwendet wie bei der Synthese des Testosteron-17 α -T) in 10 ml abs. Tetrahydrofuran 16 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das quantitativ gebildete Reduktionsprodukt wurde nicht isoliert, sondern in Lösung in Hydrocortison-11 α -T umgewandelt. Zur Abspaltung der Aethylendioxy-Gruppen wurden zu der Tetrahydrofuran-Lösung langsam 1,2 ml 1 *n* wäßrige HCl zugegeben und das Reaktionsgemisch, welches auf pH 3 eingestellt war, 16 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Ein Testchromatogramm ergab 4 radioaktive Maxima neben einer Startverunreinigung (Abb. 2).

Das erkaltete Gemisch wurde mit 10 ml gesättigter Na₂SO₄-Lösung versetzt und das Hydrocortison-11 α -T 7mal mit Chloroform extrahiert.

Größere Schwierigkeiten als beim Testosteron-17 α -T bereitete die Rein-

darstellung des Hydrocortisons-11 α -T, da die beiden Äthylenketalgruppen am C-Atom 3 bzw. 20 unter den gewählten Bedingungen offensichtlich nicht quantitativ abgespalten wurden. Das verunreinigte Hydrocortison-11 α -T wurde auf eine präparative Dünnschichtplatte (s.o.) aufgetragen. Die Platte wurde einmal im Dünnschichtsystem Essigester/Xylol/Methanol, 90 : 10 : 10, entwickelt. Das Hydrocortison-11 α -T-Band wurde abgeschabt und mit 50 ml Aceton eluiert.

Ausbeute : 22,8 mg = 38 % d.Th. (bezogen auf 3.3; 20.20-Bis-(äthylendioxy)- Δ^5 -pregnen-17 α .21-diol-11-on) eines zwar chromatographisch, jedoch noch nicht radiochemisch reinen Produkts. Die völlige radiochemische Reinigung gelang durch Rechromatographie kleiner Mengen (ca. 500 μ g bis 1 mg) des vorgereinigten Produktes auf 0,5 mm dick beschichteten Dünnschichtplatten (7 \times 20 cm). Die Platten wurden einmal im Dünnschichtsystem Essigester/Xylol/Methanol, 90 : 10 : 10, entwickelt (Abb. 3).

Der Versuch, das 3.3; 20.20-Bis-(äthylendioxy)- Δ^5 -pregnen-17 α .21-diol-11-on durch Transketalisierung aus Cortison und 2-Aethyl-2-methyl-1.3-dioxolan darzustellen, mißlang. Bei dieser Umsetzung entstand das von S. Bernstein *et al.*, 1961 ⁽¹²⁾ beschriebene 3.3; 21.21-Bis-(äthylendioxy)- Δ^5 -pregnen-11.20-dion (F. 178-182 °C), was durch Elementaranalyse, Infrarot-Kernresonanz- und Massenspektroskopie bewiesen wurde*.

* Für die Durchführung der Elementaranalyse und die Aufnahme der Kernresonanz- und Massenspektren sind wir Herrn Dr. Schulz von der physikalischen Abteilung der Firma Schering AG, Berlin, zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

1. FISHMAN, J., BRADLOW, H. L., ZUMOFF, B., HELLMAN, L. und GALLAGHER, T. F. — *Acta endocrinologica*, **37** : 57-62 (1961).
2. WENZEL, M., KLEUKER, H. und SCHULZE, P. E. — *Z. Naturforschung*, **21b** : 1178 (1966). SCHULZE, P. E. — Unveröffentlichte Arbeiten.
3. WILLIAMS, K. J. H., ROSENFELD, R. S. *et al.* — *Steroids*, **1**, Nr. 4 : 377 (1963).
4. BAULIEU, E.-E. *et al.* — *J. Biol. Chem.*, **238** : 1316 (1963).
5. BAULIEU, E.-E. *et al.* — *Steroids*, **4**, Nr. 5 : 613 (1964).
6. BAULIEU, E.-E., MAUVAIS-JARVIS, P., DICZFALUSY, E. *et al.* — *J. Biol. Chem.*, **239** : 1569 (1964).
7. ANTONUCCI, R., BERNSTEIN, S. *et al.* — *J. Org. Chem.*, **17** : 1341 (1952).
8. DAUBEN, H. J. jr., LÖKEN, B. und RINGOLD, H. J. — *J. Am. chem. Soc.*, **76** : 1359 (1954).
9. LUKES, R. M., POOS, G. J., BEYLER, R. E., JOHNS, W. F. und SARETT, L. H. — *J. Am. chem. Soc.*, **75** : 1707 (1953).
10. ANTONUCCI, R., BERNSTEIN, S. *et al.* — *J. Org. Chem.*, **18** : 70 (1953).
11. ALLEN, W. S., BERNSTEIN, S. und LITTEL, R. — *J. Am. chem. Soc.*, **76** : 6116 (1954).
12. BERNSTEIN, S. *et al.* — *J. Org. Chem.*, **26** : 1333 (1961).