

SYNTHESE VON (4,5,6-T)-5 α -DIHYDROTESTOSTERON.

Lutz Pitzel

Biol.-Chem. und Isotopenabteilung
Pharmazeutisches Institut der Freien Universität Berlin,
Berlin-Dahlem.

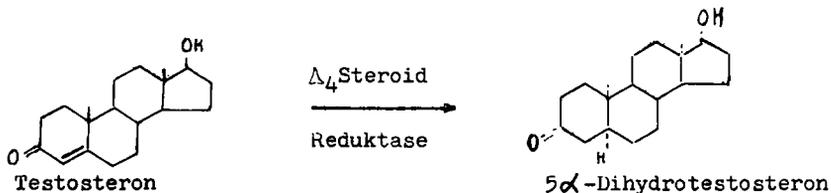
Received on July 7, 1972.

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Darstellung von (4,5,6-T)-5 α -Dihydrotestosteron bzw. (4,5,6-T)-5 α -Androstandion durch katalytische Hydrierung mit trägerfreien Tritiumgas beschrieben. Die spezifische Aktivität des tritiierten Steroids beträgt 4,73 Ci/mMol. Eine gleichzeitige Reduktion der 3-Ketogruppe konnte unter den gewählten Bedingungen nicht beobachtet werden. 5 β -Dihydrotestosteron-4,5,6-T entstand etwa 4 mal schneller als das 5 α -Analogon. Etwa 1/3 der Gesamtradioaktivität des 5 α -Dihydrotestosterons ist am Kohlenstoffatom 4 gebunden.

Einleitung

5 α -Dihydrotestosteron entsteht im Organismus durch enzymatische Reduktion des männlichen Sexualhormons Testosteron.



Dieser Abbau findet überwiegend in der Leber sowie im Prostata-Gewebe statt (1,2).

Obwohl die Bildung von 5 α -Dihydrotestosteron aus Testosteron eingehend untersucht worden ist, sind die Kenntnisse über den weiteren enzymatischen Abbau des hydrierten Androgens unvollständig.

Uns interessierten in diesem Zusammenhang die Veränderungen an den C-Atomen 4 und 5 des Steroidgerüsts; besonders im Hinblick darauf, ob eine enzymatische Rückwandlung in das Sexualhormon Testosteron möglich ist. Bisher konnte eine derartige Dehydrierung nicht gefunden werden (3).

Für diese Untersuchungen synthetisierten wir ein in den oben genannten Positionen mit Tritium markiertes 5α -Dihydrotestosteron und untersuchten anschließend dessen weiteren Abbau unter in vivo- und in vitro-Bedingungen (4).

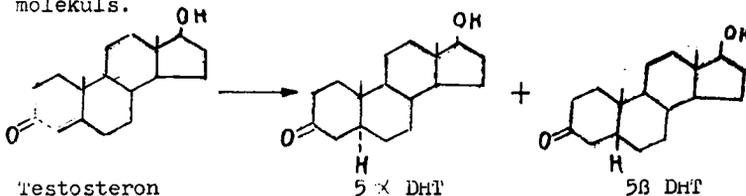
Allgemeine Beschreibung und Ergebnisse

Vorversuche zu katalytischen Reaktionen der Δ_4 -Doppelbindung beim Testosteron

Ausgangsprodukt der Synthese von 5α -Dihydrotestosteron war Testosteron, dessen Doppelbindung im Ring A katalytisch hydriert wurde. Da die katalytische Hydrierung der Δ_4 -Doppelbindung möglicherweise zu einer teilweisen Reduktion der Ketogruppe am C_3 -Atom führt, war es wichtig, zunächst das Ausmaß dieser Nebenreaktion zu kennen. Es wurden deshalb 129 mg Testosteron in äthanolischer Lösung mit 10%iger Palladiumkohle unter Wasserstoffatmosphäre hydriert. Der Wasserstoffverbrauch wurde kontrolliert und mit der Wasserstoffmenge verglichen, die einer ausschließlichen Hydrierung der Δ_4 -Doppelbindung des eingewogenen Testosterons entspricht. Dabei konnte eine nennenswerte Reduktion der benachbarten Ketogruppe ausgeschlossen werden.

Dieses Ergebnis war deshalb von Bedeutung, da die dünnschichtchromatographische Überprüfung des Reaktionsansatzes neben Dihydrotestosteron als Hauptprodukt eindeutig Androstandiole anzeigte.

Die Hydrierung der Doppelbindung von Testosteron führt zur Bildung eines asymmetrischen C-Atoms in der Position 4 des Androgenmoleküls.



Da durch zahlreiche biologische Versuche bewiesen ist, daß nur die 5 α -Form androgene Eigenschaften besitzt (6), sollte ein weiterer Vorversuch klären, in welchem Ausmaß die uns interessierende Verbindung unter den gewählten Reaktionsbedingungen entsteht.

¹⁴C-markiertes Testosteron wurde deshalb unter diesen Bedingungen mit Wasserstoff hydriert. Nach dünnschichtchromatographischer Trennung konnte eine quantitative Analyse des Reaktionsansatzes mit dem "Dünnschicht-Scanner"* durchgeführt werden. Danach wurde 5 β -Dihydrotestosteron etwa 4 mal häufiger gebildet als das 5 α -Analoge, das damit maximal in einer Ausbeute von 20 % gewonnen werden konnte.

Katalytische Reduktion von Testosteron mit Tritiumgas

Im nun folgenden Versuch wurden in einer Tritierapparatur (8) 13mg Testosteron mit 4 Ci trägerfreiem Tritiumgas katalytisch hydriert. Nach Aufarbeitung und dünnschichtchromatographischer Reinigung des Hydrieransatzes konnte eine Gesamtaktivität von 36 mCi 5 α -Dihydrotestosteron gemessen werden. Die spezifische Aktivität errechnete sich durch Acetylierung eines Aliquots der tritiierten Verbindung mit ¹⁴C-markiertem Acetanhydrid bekannter spezifischer Aktivität. Aus dem T/¹⁴C-Verhältnis ergab sich der Wert für die spezifische Aktivität von 4,73 Ci/mMol 5 α -Dihydrotestosteron.

Nach Untersuchungen von Shoppe und Hajj (5,7) bei der Reduktion ähnlicher Androgenmoleküle mit Deuterium und Tritium soll die Tritierung der Δ_4 -Doppelbindungen von Testosteron auch zu einer Markierung des Kohlenstoffatoms 6 führen. Zur Bestimmung des Tritiumanteils an C-4 wurde die Verbindung mit methanolischer Kalilauge behandelt. Da bei dem hier hergestellten Tritiummarkierten 5 α -Dihydrotestosteron sich dabei nur 33 % des Tritiums und nicht 50 % der Gesamtaktivität labilisieren ließen, ist auch bei dieser Synthese zu erwarten, daß Tritium sich nicht nur an C₄ und C₅ sondern auch an C₆ befindet. Die Aktivitätsverteilung in den Positionen 5 und 6 wurde nicht untersucht.

*"Dünnschicht-Scanner" LB 2770 der Fa. Berthold, Wildbad (Schwarzwald)

Präparativer Teil:

Herstellung von (^{14}C)-5 α -Dihydrotestosteron

Es wurden 2,5 μCi 4- ^{14}C -Testosteron mit 15 mg inaktiver Substanz in 5,5 ml Äthanol gelöst. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde mit 1 ml Katalysator-Suspension aufgenommen und mittels einer Pipette in ein 2 ml Hydrierkölbchen überführt (die Katalysator-Suspension enthielt 10 mg Katalysator pro ml Äthanol). Es wurde mit ca. 0,5 ml Äthanol nachgewaschen, dann das Kölbchen mit einem ca. 0,5 cm langen Magnetrührstäbchen versehen und an die Tritier-Apparatur angeschlossen. Der Inhalt des Kölbchens wurde mit flüss. Stickstoff eingefroren und anschließend evakuiert. Durch eine Töpler-Pumpe wurde Wasserstoff aus dem Vorratsgefäß in das Hydrierkölbchen gepumpt. Die Hydrierung wurde bei einem Druck von 420 mm Hg begonnen. Nach 14 Minuten betrug der Druck 170 mm Hg, der sich während weiteren 11 Minuten nicht mehr veränderte. Der Hydrieransatz wurde anschließend durch Watte filtriert und der Rückstand mit ca. 8 ml Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 3 ml Methanol aufgenommen. Anschließend wurden innerhalb einer Versuchsreihe geeignete Laufmittel zur Trennung der Reaktionsprodukte gewonnen.

Für die dünnschichtchromatographische Trennung von 5 α - und 5 β -Dihydrotestosteron eigneten sich Chloroform/Aceton 9:1 (3 Stunden Durchlaufchromatographie) bzw. Äther/ Dimethylformamid 99:1 (2 Stunden). Durch Ausmessen der radioaktiven Peaks mit dem "Dünnschicht-Scanner" wurde die 5 β -Verbindung etwa 4 mal häufiger als das 5 α -Steroid ermittelt. Für den folgenden Versuch der Synthese von 5 α -Dihydrotestosteron konnte deshalb mit einer maximalen Ausbeute von etwa 20% gerechnet werden.

Herstellung von T-markiertem 5 α -Dihydrotestosteron

4 Ci Tritiumgas (trägerfrei) wurden aus einer Brechsigelampulle in das Vorratsgefäß der Tritierapparatur (8) gebracht. Anschließend wurden 10 mg Testosteron in 1 ml Katalysator-Suspension (10 mg Katalysator) und 0,5 ml Äthanol gelöst und in ein 2 ml

fassendes Hydrierkölbchen überführt. Die weitere Prozedur ist identisch mit der des oben beschriebenen Vorversuchs. Der Druckabfall in der Apparatur blieb nach 90 Minuten konstant.

Der Tritieransatz wurde anschließend durch Watte filtriert und zur Entfernung des labil gebundenen Tritiums 3 mal mit je 15 ml Methanol verdünnt, die darauf am Rotationsverdampfer abdestilliert wurden. Der Rückstand wurde auf 3 Dünnschicht-Platten aufgetragen (Kieselgel HF₂₅₄, Schichtdicke 0,75 mm) und 3 Stunden im Fließmittelsystem Chloroform/Aceton 9:1 chromatographiert. Mit dem Dünnschicht-Scanner wurde die Aktivitätsverteilung auf den Dünnschicht-Platten bestimmt, anschließend die 5 α -Dihydrotestosteron-Bande vorsichtig abgeschabt und in einer Glassäule mit Essigester/Methanol 1:1 erschöpfend eluiert. Ein Testchromatogramm zeigte eine noch geringe Verunreinigung von Tritiummarkiertem 5 β -Dihydrotestosteron, so daß eine nochmalige dünn-schichtchromatographische Reinigung notwendig wurde.

Die anschließend durchgeführte Verdünnungsanalyse zeigte auch nach mehrmaligem Umkristallisieren keine Änderung der spezifischen Aktivität.

Tabelle 1

Ergebnis der Umkristallisation von 5 α -Dihydrotestosteron-4,5,6-³H

	spez. Aktivität	Lösungsmittel
1. Umkristallisation	52 435 IpM/mg	Essigester
2. "	52 993 IpM/mg	Essigester
3. "	52 900 IpM/mg	hexan
4. "	52 400 IpM/mg	hexan

Die Gesamt-Radioaktivität wurde durch Messen eines Aliquots im Flüssig-Szintillationszähler LS 15 (Fa. Beckmann) bestimmt. Zur Ermittlung der Substanzausbeute und der spezifischen Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) wurde tritiertes 5 α -Dihydrotestosteron mit ¹⁴C-markiertem Acetanhydrid bekannter spezifischer Aktivität ($\mu\text{Ci}^{14}\text{C}/\mu\text{Mol}$) in Pyridin acetyliert. Aus dem ermittelten Tritium/¹⁴C-Verhältnis errechnete sich eine spezifische Aktivität des 5 α -Dihydrotestosterons von 4,73 Ci/ μmol und damit eine Substanzausbeute von 2,21 mg.

Herstellung von (4,5,6-T)-5 α -Androstandion

Ein Teil des synthetisierten 5 α -Dihydrotestosterons-4,5,6-T wurde zu 5 α -Androstandion-4,5,6-T oxydiert. Die spezifische Aktivität des Oxydationsproduktes wurde durch Zugabe inaktiven 5 α -Androstandions gesenkt. Die Identität des Androgens wurde durch Vergleich der spezifischen Aktivitäten ($\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) des 5 α -Androstandions mit der seines Dinitrophenylhydrazons, die identisch sein müssen, bewiesen.

50 mg authentisches 5 α -Androstandion wurden mit wenigen μg durch vorherige Dünnschichtchromatographie gereinigtem 5 α -Androstandion (8 μCi) versetzt und aus Isopropyläther mehrfach umkristallisiert. Das nach 2-facher Umkristallisation gewonnene Kristallat wurde mit Dinitrophenylhydrazin zum Dinitrophenylhydrazon des 5 α -Androstandion umgesetzt und das Dinitrophenylhydrazon ebenfalls mehrfach aus Äthanol/Wasser 1:1 umkristallisiert.

Tabelle 2

Beweis für die Identität von (4,5,6-T)-5 α -Androstandion-4,5,6-T

Umkristallisiert als: spez. Akt. ($\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$)

5 α -Androstandion

1. Kristallisat	$8,5 \times 10^{-2}$
2. "	$8,2 \times 10^{-2}$

Dinitrophenylhydrazon

1. Kristallisat	$8,5 \times 10^{-2}$
2. "	$9,8 \times 10^{-2}$
2. "	$9,2 \times 10^{-2}$

Labelisierung des Tritiums an C₄ beim 4,5,6-T-5 α -Dihydrotestosteron

Die Bestimmung der Tritiumaktivität am Kohlenstoffatom 4 von

5 α -Dihydrotestosteron erfolgte durch Behandlung des Steroids mit methanolischer KOH. 20 μ Ci 5 α -Dihydrotestosteron-4,5,6-T wurden 12 Stunden bei 60°C mit 5%iger methanolischer KOH am Rückfluß erhitzt. Durch anschließendes Extrahieren mit Hexan konnte das Steroid aus der mit Wasser angereicherten Phase entfernt werden. Aus dem wässrigen Rückstand wurde durch Gefrierdestillation der HTO-Anteil bestimmt. Dabei wurden in 4 Versuchen 30,8%, 35,3%, 31,1% und 32,8% (Mittelwert 32,5%) der Gesamaktivität als HTO bestimmt. Damit sind etwa 1/3 der Tritiumaktivität des Steroidmoleküls am Kohlenstoffatom 4 gebunden. Vergl. auch die Abbildungen der entsprechenden "Szintigramme", hergestellt mit Hilfe des "Dünnschicht-Scanners" und des Punktdruckers in (4).

Herrn Prof. Wenzel und Herrn Trautmann danke ich für das Interesse bei der Herstellung des Steroids und der Fa. Schering AG Berlin für die materielle Unterstützung. Erl. Bollert gilt mein Dank für die technische Assistenz bei den durchgeführten Versuchen.

Literatur:

- (1) E. Baulieu, J. Lasnitzki und P. Robel: Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 575 (1968)
- (2) N. Bruchovsky und J.D. Wilson: J. Biol. Chem. 243, 2012 (1968)
- (3) J.S. McGuire, V. Hollis und G. Tomkins: J. Biol. Chem. 235, 3112 (1960)
- (4) M. Wenzel, L. Pitzel und B. Bollert: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, (1972)
- (5) C.W. Shoppe, D.B. Agashae und G.H.R. Summers: J. Chem. Soc. 3017 (1957)
- (6) H.J. Mübner und H. Staib: "Biochemie der Nebennierenrindenhormone" S. 77, Verlag G. Thieme, Stuttgart 1965
- (7) Yusuf J. Abul-majj: J. lab. Comp. 7, 33 (1971)
- (8) M. Wenzel und P.E. Schulze: "Tritium-Markierung" Walter De Gruyter u. Co., Berlin 1962, Seite 22