

SYNTHESE DES TRITIUMMARKIERTEN EBERRIEROMONS



H. Wagner und J. Römer

Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, DDR-69 Jena, Beuthenbergstraße 11

Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für

Kernforschung Rossendorf, DDR-8051 Dresden

Received May 25, 1977

Revised August 8, 1977

SUMMARY: The synthesis of $[5\alpha, 6\alpha-^3\text{H}]-5\alpha\text{-androst-16-en-3-one}$, starting with the catalytic tritiation of 3 β -acetoxy-androst-5-en-17-one, is described. The so-called "boar taint ketone" was obtained with high specific activity (21 Ci/mmol) and radiochemical purity better than 98 %.

KEY WORDS: 5 α -Androst-16-en-3-one, Boar Taint, Tritium, Synthesis, Radioimmunoassay

EINLEITUNG

Nach der Entdeckung von drei 16-ungesättigten C19-Steroiden (3 α -Hydroxy-, 3 β -Hydroxy- und 3-Keto-5 α -androsten) im Hodengewebe unkastrierter männlicher Schweine durch Prelog und Ruzicka im Jahr 1944 [1] beschäftigte man sich ab 1960 erneut mit diesen Verbindungen [2]. Es war erkannt worden, daß diese unangenehm moschus- bzw. urinartig riechenden Substanzen eine physiologische Rolle beim Schwein spielen [3, 4]. Sie wirken als "sex-attractants" (Pheromone) und fördern auf olfaktorischem

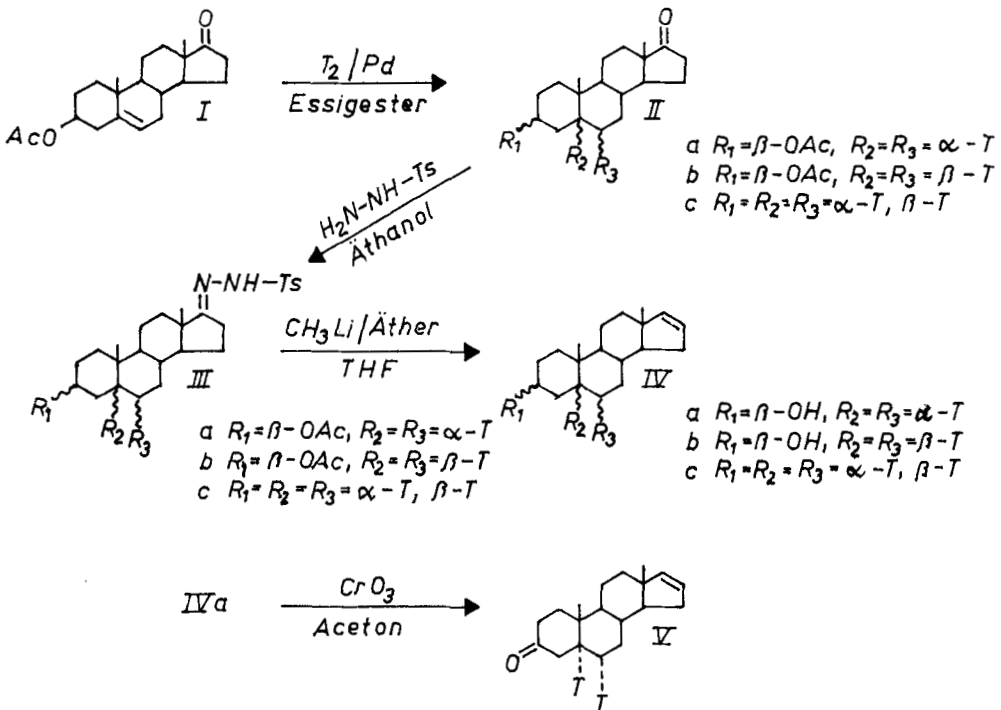
Wege die Kopulationsbereitschaft der weiblichen Tiere ("back-pressure test") [5].

Die 3-Keto-Verbindung konnte auch im peripheren Plasma und im Fettgewebe des Ebers nachgewiesen werden [6]. Sie ist daher das eigentliche Pheromon, welches für den typischen Ebergeruch und die Un genießbarkeit des Eberfleisches verantwortlich ist. Der Eber liefert aber infolge der anabolen Wirkung seiner Androgene unter gleichen Ernährungs- und Aufzuchtbedingungen mehr und besseres Fleisch als Sauen und Kastraten [7]. Daraus ergibt sich bei industriemäßiger landwirtschaftlicher Produktion die dringende Aufgabe, das Eberfleisch geruchsfrei und damit genießbar zu machen. Ansätze dafür bieten die Biosynthesehemmung und die immunologische Neutralisation des Pheromons [8]. Da das Pheromon nur in Konzentrationen von wenigen ng/ml im Plasma vorkommt, erfordert sein Nachweis eine sehr empfindliche Methode. Hierfür eignet sich am besten ein Radioimmunoassay (RIA), wie er von verschiedenen Autoren bereits beschrieben [9, 10, 11] wurde. Über die Herstellung des dabei benutzten [5α - ^3H]-Androstenons wurden keine Angaben gemacht. Um durch höhere spezifische Aktivität des Tracers die Nachweisempfindlichkeit zu verbessern, gingen wir von einem [$5\alpha, 6\alpha$ - ^3H]-Androstanderivat aus [12]. Zur Einführung der 16-Doppelbindung benutzten wir das Verfahren von Shapiro und Heath [13] unter Berücksichtigung der Arbeit von Bose und Steinberg [14].

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ausgangsprodukt unserer Synthese war das leicht zugängliche 3 β -Acetoxy-androst-5-en-3-on (Denhydroepiandrosteronacetat) I. Katalytische Hydrierung mit T_2 ($p > 400$ Torr) und Palladiummohr

in Essigsäureäthylester ergab als Hauptprodukt [$5\alpha, 6\alpha\text{-}^3\text{H}$]- 3β -Acetoxy- 5α -androst-17-on IIA neben geringen Mengen IIB und IIC. Umsetzung mit Tosylhydrazid und Behandlung der Tosylhydrazone III mit Lithiummethyl führte unter Entacetylierung zu den 16-Olefinen IV. Aus diesem Gemisch wurde durch Säulenchromatographie das [$5\alpha, 6\alpha\text{-}^3\text{H}$]- 5α -Androst-16-en- 3β -ol IVA isoliert und zum gewünschten [$5\alpha, 6\alpha\text{-}^3\text{H}$]- 5α -Androst-16-en-3-on V oxydiert.



Bei der katalytischen Hydrierung verbrauchten wir für 0,5 mmol I nahezu 0,6 mmol T_2 . Der Mehrverbrauch rührte daher, daß 1 mg Pd in der Lage ist, maximal 3 μmol H_2 zu binden, und daß sich im Lösungsmittel infolge Austauschreaktionen [15] 8,8 Ci Tritiumaktivität befanden. Die quantitative Umsetzung von I wurde dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen. Wenn auch I, IIA und IIB die

gleichen R_F -Werte besitzen, so färbt sich das Olefin I nach dem Besprühen mit Vanillinschwefelsäure bereits in der Kälte orange, während die hydrierten Produkte IIa und IIb erst durch Erwärmen sichtbar werden. Einzelheiten über die Nebenreaktionen, die zu IIb und IIc führten, und über die Radiodünnschicht- und Radiosäulenchromatographie als wichtige Hilfsmittel zur Aufklärung der anliegenden Trennprobleme wurden in einer gesonderten Arbeit dargestellt [16]. Das markierte Keton IIa (im Gemisch mit IIb und IIc) wurde vor der Umsetzung zum Tosylhydrazon mit 165 mg inaktivem IIa verdünnt. Beabsichtigt war dabei, die Substanzmenge für die nächsten Synthesestufen zu verdoppeln, wobei eine spezifische Aktivität - reines Tritiumgas vorausgesetzt - von 29 Ci/mMol resultieren sollte. Infolge der erwähnten Nebenreaktionen war der Verdünnungsfaktor jedoch >2 , so daß schließlich für das Endprodukt eine geringere spezifische Aktivität ermittelt wurde. Nach Umsetzung des Ketongemisches II mit Tosylhydrazid wurde das entstandene Tosylhydrazongemisch III ohne weitere Reinigung mit Lithiummethyl behandelt. Diese Reaktion verlief nicht vollständig. Etwa 18 % der Aktivität blieben auf der Stufe der intermediären β -Hydroxy-tosylhydrazone stehen [16]. So ergab sich nach drei Reaktionsschritten ein komplexes Substanzgemisch mit 7 chromatographisch nachweisbaren Komponenten. Die säulenchromatographische Auftrennung dieses Gemischs lieferte 64 mg IVa (= 23,3 % bezogen auf IIa).

Das gereinigte IVa konnte quantitativ zum $[5\alpha, 6\alpha\text{-}^3\text{H}]-5\alpha\text{-Androst-16-en-3-on}$ oxidiert werden. Nach Umkristallisation wurden 17 mg V (= 6,25 %, bezogen auf II) mit hoher radiochemischer Reinheit und einer spezifischen Aktivität von 21,3 Ci/mMol erhalten.

EXPERIMENTELLES

Geräte, Chemikalien, Hilfsmittel

Alle aktiven Versuche wurden in Boxen durchgeführt. Die Hydrierung mit T_2 erfolgte in einer Markierungsapparatur [17], die bereits bei früheren Arbeiten [18, 19] zum Einsatz kam. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten wurde das Flüssigkeitsszintillationsspektrometer LS - 233 (Beckman, USA), zur Auswertung von Radiodünnschichtchromatogrammen der Scanner II (Berthold - Friesecke, BRD) verwendet. Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. Als Laufmittel auf Kieselgelplatten (Merck, BRD) oder Silufolplatten (Kavalier, CSSR) dienten Benzol : Aceton = 20 : 1 für die 1. und 2. Reaktionsstufe und Benzol : Essigester = 7 : 3 für die 3. und 4. Reaktionsstufe. Die Platten wurden nach der Entwicklung mit Vanillinschwefelsäure besprüht und zur Sichtbarmachung der Flecke auf 180°C erhitzt.

 $5\alpha, 6\alpha\text{-}^3\text{H}$ -3 β -Acetoxy- 5α -androst-17-on IIa

165 mg (0,5 mMol) I wurden in einem 10ml-Kölbchen mit 5 ml wasserfreiem Essigester und 50 mg Palladiummohr versetzt und unter Rühren bei Zimmertemperatur mit T_2 von $p > 400$ Torr hydriert. Die Tritiumaufnahme war nach ca. 1 h beendet. Es wurde noch 30 min weitergerührt, dann vom Katalysator abfiltriert, Katalysator und Filter mit einer benzolischen Lösung von 165 mg inaktivem 5α -Androstanolonacetat gewaschen, mit Benzol nachgewaschen und die vereinigten Filtrate gefriergetrocknet. Ausbeute: 330 mg Substanz mit $A_s = 28,5$ Ci/mMol. Der Tritiumverbrauch betrug fast 0,6 mMol. Das Kondensat enthielt 8,8 Ci Tritium.

[$5\alpha, 6\alpha$ - ^3H]-3 β -Acetoxy-5 α -androstan-17-tosylhydrazon IIIa

330 mg (1 mMol) II wurden mit einer Lösung von 400 mg (2,15 mMol) Tosylhydrazid in 4 ml Äthanol versetzt und die Mischung 2,5 h unter Argon am Rückfluß gekocht. Das Äthanol wurde durch Gefriertrocknen entfernt, 10 ml Benzol zugefügt und abermals gefriergetrocknet. Der kristalline Rückstand wurde ohne weitere Aufarbeitung oder Bestimmung der spezifischen Aktivität in die nächste Stufe eingesetzt. Im Kondensat befanden sich insgesamt 140 mCi.

[$5\alpha, 6\alpha$ - ^3H]-5 α -Androst-16-en-3 β -ol IVa

Das trockene Tosylhydrazongemisch III wurde in 8 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst und unter Argon und kräftigem Rühren ätherische Lithiummethyl-Lösung zugetropft, bis die Lösung eine orange-braune Farbe annahm. Nach sechsständigem Rühren wurde der Ansatz durch Zugabe von kaltem Wasser zersetzt. Die organische Schicht wurde abgetrennt, alkalifrei gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und die Lösungsmittel durch Gefriertrocknen entfernt. Es wurden 107 mg (= 39 %, bezogen auf IIIa) Rohprodukt erhalten. Weil das Radio-TLC eine größere Anzahl Nebenprodukte zeigte, wurde eine säulenchromatographische Reinigung durchgeführt [16], die 64 mg (= 23,3 %, bezogen auf II) reines IVa mit einer spezifischen Aktivität von 20,7 Ci/mMol lieferte.

[$5\alpha, 6\alpha$ - ^3H]-5 α -Androst-16-en-3-on V

63 mg IVa wurden in 10 ml Aceton von 0 °C gelöst und unter Rühren mit wenigen Tropfen JONES-Reagens [20] bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach Zersetzen des Reagensüberschusses mit einigen Tropfen Isopropanol wurden 20 ml Wasser

zugegeben. Das ausgefallene Keton wurde mit 10 ml Benzol extrahiert und die benzolische Phase nach Waschen gefriergetrocknet. Ausbeute: 62 mg V (= 22,7 %, bezogen auf II) mit 97 % radiochemischer Reinheit. Umkristallisieren aus 1 ml Äthanol : Wasser = 4:1 ergab 17 mg (= 6,25 %, bezogen auf II) kristallines Produkt mit einer radiochemischen Reinheit > 98 % und einer spezifischen Aktivität von 21,3 Ci/mMol.

LITERATUR

- [1] Prelog, V. und Ruzicka, L. - *Helv. Chim. Acta* 27: 61 (1944)
- [2] Gower, D.B. - *J. Steroid Biochem.* 3: 45 (1972)
- [3] Sink, J. D. - *J. Theoret. Biol.* 17: 174 (1967)
- [4] Melrose, D.R., Reed, H.C.B. und Patterson, R.L.S. - *Brit. Vet. J.* 127: 497 (1971)
- [5] Altmann, M. - *J. comp. Psychol.* 31: 481 (1941)
- [6] Patterson, R.L.S. - *J. Sci. Fd. Agric.* 19: 31 (1968)
- [7] Claus, R. - *Dr. agr. Dissertation Techn. Hochschule München* (1970)
- [8] Claus, R. - *Immunisation with Hormones in Reproduction Research*, ed. E. Nieschlag, North-Holland Publishing Company Amsterdam The Netherlands (1975)
- [9] Andresen, Ø. - *Acta Endocrin.* 76: 377 (1974)
- [10] Claus, R. - *C. R. Acad. Sci. (Paris), Serie D* 278: 299 (1974)
- [11] Andresen, Ø. - *Acta Endocrin.* 79: 619 (1975)
- [12] Brodie, H.J., Baba, S., Gut, M. und Hayano, M. - *Steroids* 6: 659 (1965)
- [13] Shapiro, R.H. und Heath, M.J. - *J. Amer. Chem. Soc.* 89: 5734 (1967)
- [14] Bose, A.K. und Steinberg, N.G. - *Synthesis* 1970: 595
- [15] Hanus, J., Cerny, B. und Benes, J. - *J. lab. Comp.* 10: 523 (1974)

- [16] Römer, J. und Wagner, H. - Radiochem. Radioanal. Lett.
(in Vorbereitung)
- [17] Römer, J. - ZfK-Report 251: (1973)
- [18] Ponsold, K., Römer, J. und Wagner, H. - J. lab. Comp. 10:
533 (1974)
- [19] Römer, J. und Wagner, H. - Radiochem. Radioanal. Lett.
25: 255 (1976)
- [20] Bowden, K., Heilbron, I.M., Jones, E.R.H. und Weedon, B.L.C.
J. Chem. Soc. 1946: 39