

Über Testosteron.

Umwandlung des Dehydro-androsterons in Androstendiol und Testosteron; ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin.

Von

Adolf Butenandt und Günter Hanisch.

Mit 3 Figuren im Text und auf Tafel V.

(Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule Danzig-Langfuhr.)

(Der Schriftleitung zugegangen am 27. September 1935.)

Im Androstendion(II), das aus dem natürlich vorkommenden männlichen Prägnungsstoff Dehydro-androsteron(I) durch vorsichtige Dehydrierung entsteht, wurde ein Stoff aufgefunden, der im Hahnenkammtest eine etwa ebenso hohe physiologische Wirksamkeit zeigt wie Androsteron, an der Vesikular-drüse der Nager (bei Verabfolgung gleicher Kapaunen-Einheiten) jedoch die aus Männerharn gewonnenen Hormonkrystallisate weitgehend übertrifft¹⁾. Im Rahmen unserer chemischen Untersuchungen über die Genese der Keimdrüsenhormone²⁾ haben wir das Androstendion in verschiedener Weise weiter abgewandelt und uns unter anderem die Aufgabe gestellt, die Carbonylgruppe am C₁₇ in eine sekundäre Alkoholgruppe überzuführen, um auf diese Weise das Δ^4 -Androsten-ol-(17)-on-(3), C₁₉H₂₈O₂ (VI), darzustellen. Da wir gefunden hatten, daß in der Reihe des Androsterons durch Reduktion der Carbonylgruppe am C₁₇ eine wesentliche Erhöhung der physiologischen Aktivität hervorgerufen werden kann³⁾, war im Androstenolon(VI) ein Stoff mit sehr hoher Wirksamkeit zu erwarten, der auch im Hinblick auf die bereits im Androstendion ausgeprägte starke Wachstumsbeeinflussung des Genitaltrakts der Nager für die Untersuchung der im Hoden vorliegenden männlichen Prägnungsstoffe von Bedeutung sein konnte.

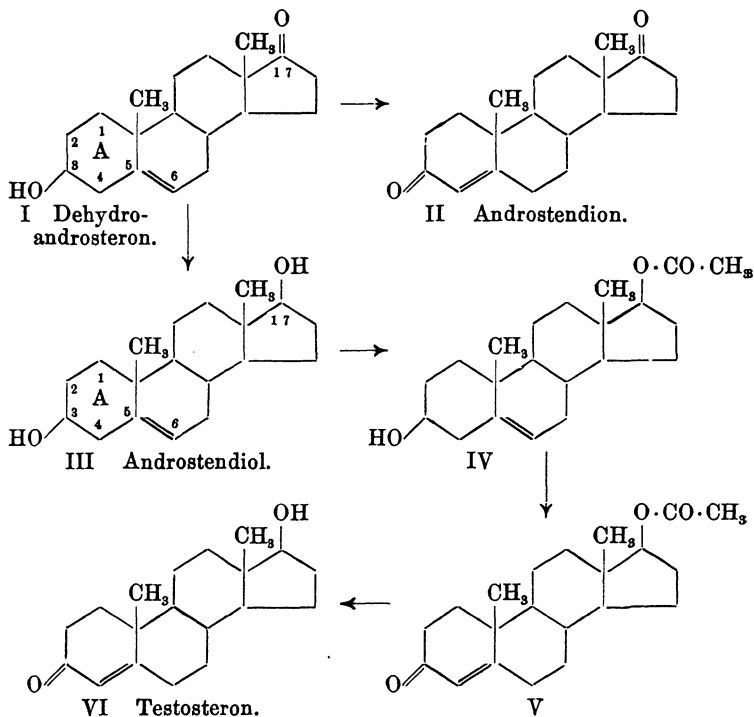
Die Versuche zur Darstellung des Androstenolons(VI) wurden bereits im Juni dieses Jahres begonnen; in Anbetracht der Arbeiten, die von vielen Seiten auf dem Gebiet des Androsterons durchgeführt werden, seitdem es chemisch erschlossen worden ist,

¹⁾ Vgl. voranstehende Mitteilung und die dort angegebene Literatur.

²⁾ Problemstellung und Arbeitsrichtung sind in der voranstehenden Mitteilung auseinandergesetzt.

³⁾ Butenandt u. Tscherning, Diese Z. 234, 224 (1935).

wollen wir darauf hinweisen, daß zu jener Zeit von anderer Seite noch keine Mitteilung über Androstendion und seine physiologische Wirkung erschienen und über das von dem Amsterdamer Arbeitskreis⁴⁾ aus Hoden bereitete „Testosteron“ noch nichts Näheres bekannt war.



In einer vorläufigen Mitteilung⁵⁾ haben wir bereits darüber berichtet, auf welchem Wege uns die Umwandlung des Dehydroandrosterons in Δ^4 -Androsten-ol-(17)-on-(3) geglückt ist; wir haben alle Zwischenstufen unserer Methode in ihren Eigenschaften charakterisiert, das Endprodukt der Reaktion durch Derivate gekennzeichnet und gezeigt, daß es identisch sein muß mit dem Testosteron aus Stierhoden. Damit wurde ein abschließender Beitrag zur Konstitution des Testosterons geliefert und ein einfacher Weg gezeigt, diesen Prägestoff aus Cholesterin künstlich darzustellen. Die vor-

⁴⁾ David, Dingemans, Freud, Laqueur, *Diese Z.* **233**, 281 (1935) (7. Juni 1935).

⁵⁾ *Ber. chem. Ges.* **68**, 1859 (1935) (eingegangen am 24. August 1935).

läufige Mitteilung⁵⁾ ist am 11. September erschienen. Nur 3 Tage später hat A. Wettstein⁶⁾ in einer kurzen Notiz eine gleichartige Umwandlung des Dehydro-androsterons in Testosteron bekanntgegeben, so daß die Ergebnisse durch die gleichzeitig und unabhängig durchgeführten Arbeiten zweier Laboratorien gesichert sind. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir ausführlich über unsere Versuche^{6a)}.

1. Über Δ^5 -Androstendiol-(3,17).

Die erste Stufe in der Umwandlung des Dehydro-androsterons in Androstenolon (VI) besteht in einer Reduktion der Carbonylgruppe am C_{17} des Dehydro-androsterons zum Δ^5 -Androstendiol-(3,17), $C_{19}H_{30}O_2$ (III). Bei der Reduktion der Carbonylgruppe am C_{17} des Oestrans wurde früher beobachtet, daß die Reaktion bei Verwendung von Natrium und Propylalkohol praktisch einheitlich verläuft und von den beiden zu erwartenden Diolen nur das höher wirksame, in der Natur vorkommende Isomere liefert; auch beim Androsteron geht die Reduktion nach dieser Methode bevorzugt in einer Richtung. Wir haben auf Grund dieser Erfahrungen zur Darstellung des Androstendiols (III) ebenfalls die Reduktion des Dehydro-androsterons mit Natrium und Propylalkohol durchgeführt. Das Reduktionsprodukt wurde in guter Ausbeute in Gestalt von Blättchen erhalten, die einen Schmelzpunkt von 178° (unkorr.) und eine optische Drehung $[\alpha]_D^{18} = -55,5^\circ$ (in Propylalkohol) zeigen. Bei der Behandlung mit siedendem Essigsäureanhydrid läßt sich das Androstendiol in ein gut krystallisiertes Diacetat [Schmelzp. $159,5^\circ$ (unkorr.), $[\alpha]_D^{18} = -56,5^\circ$ in Äthanol] überführen.

Es hat uns überrascht, daß das Androstendiol und sein Diacetat im Hahnenkammtest eine äußerst geringe Wirksamkeit zeigen. Nach unseren bisherigen Versuchen ist mit 600 γ als Injektionsdosis (1,2 mg als Gesamtdosis) in unserem Testverfahren⁷⁾ noch kein eindeutiges Wachstum des Kammes zu erzielen. Hier müssen weitere Versuche vorgenommen werden, denn dieser Befund ist insofern unerwartet, als das Dehydro-androsteron mit 600 γ eindeutige Entwicklung des Kammes

⁵⁾ Schweiz. med. Wschr. 1935, 912; Vortrag am 10. September 1935 in Montreux.

^{6a)} Zusatz bei der Korrektur: Inzwischen ist auch die Untersuchung von A. Wettstein in ausführlicher Mitteilung erschienen: L. Ruzicka u. A. Wettstein, Helv. chim. acta 18, 1264 (1935).

⁷⁾ Diese Z. 229, 170 (1934).

hervorrufen und nach den bisherigen Erfahrungen die Alkohole höhere Aktivität zeigen als die Ketone^{7a)}!

2. Überführung des Androstendiols in Δ^4 -Androstenol-(17)-on(3) (Testosteron).

Um das Androstenolon (VI) zu bereiten, mußte im Androstendiol (III) die Alkoholgruppe am C₃ (unter Erhalt der Hydroxylgruppe am C₁₇) zur Ketogruppe oxydiert werden. Um diese Umwandlung vornehmen zu können, haben wir uns bemüht, das Monoacetat-(17) (IV) zu bereiten. Hier standen uns Erfahrungen am Pregnandiol zur Verfügung; bei seiner Überführung in das Pregnan-ol-(20)-on-(3)⁸⁾ war vor 1 Jahr die gleiche Aufgabe zu lösen, und es wurde damals in zahlreichen Versuchsreihen ein Weg ermittelt, um das Pregnandiol-diacetat einer partiellen Verseifung zu unterwerfen, die nur zur Abspaltung der Acetylgruppe im Ring A führt. Die Methodik besteht in der Einwirkung

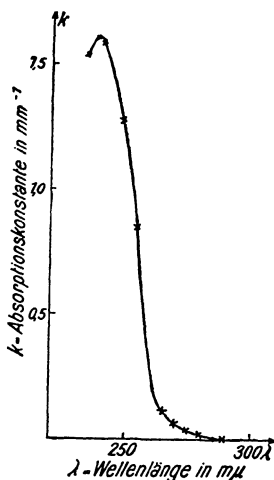


Fig. 1.
Absorptionsspektrum
des Testosterons
[Δ^4 -Androsten-ol(17)-on(3)];
0,01%ige Lösung in CHCl_3 .

von wenig Alkali auf eine stark verdünnte (0,3%) Lösung des Diesters in der Kälte. Die Übertragung dieser Methode auf das Androstendiol-diacetat führte zum Androstendiol-monoacetat-(17) (IV), das aus verdünntem Aceton in filzigen Nadeln vom Schmelzp. 148° (unkorr.) erhalten wurde.

Das Androstendiol-monoacetat-(17) wurde nach der üblichen Methode vorsichtig dehydriert: nach Schutz der Doppelbindung durch Brom wurde mit kalter Chromsäurelösung oxydiert und nach beendeter Reaktion mit Zinkstaub in Eisessig oder mit Natriumjodid in Methanol entbromt. Es resultierte das Acetat des Δ^4 -Androsten-ol-(17)-on-(3) (V), das bei 138° (unkorr.) schmilzt, eine optische

Drehung $[\alpha]_D^{20} = +87,8^\circ$ (in Äthanol) zeigt und nach der Ver-

^{7a)} Zusatz bei der Korrektur: Nach inzwischen durchgeführten Versuchen liegt die Kapaunen-Einheit des Androstendiols zwischen 1 und 1,3 mg; es ist also im vorliegenden Fall das Diol nur etwa $\frac{1}{2}$ so wirksam wie das Oxyketon!

⁸⁾ A. Butenandt u. J. Schmidt, Ber. chem. Ges. 67, 1893 (1934).

seifung das Δ^4 -Androstenol-(17)-on-(3) (VI) liefert. Dieses ungesättigte Oxy-Keton $C_{19}H_{28}O_2$ krystallisiert in gefiederten Nadeln vom Schmelzpt. 151° (unkorr.), zeigt eine optische Drehung $[\alpha]_D^{18} = +104^\circ$ und liefert eine Absorption im Ultraviolett bei $238\text{ m}\mu$, die der des Androstendions⁹⁾ völlig entspricht und in Fig. 1 wiedergegeben ist. Zur weiteren Charakterisierung haben wir sein Oxim bereitet, das bei 215° (unkorr.) schmilzt.

3. Identität des Δ^4 -Androstenol-(17)-ons-(3) mit Testosteron.

Wie wir eingangs erwähnten, war zur Zeit der Durchführung unserer Arbeit zunächst nichts über die Zusammensetzung und den Bau des von David, Dingemans, Freud und Laqueur⁴⁾ aus Stierhoden isolierten Testosterons bekannt, das anfänglich nur durch Schmelzpunkt, Drehung und seine hohe physiologische Wirksamkeit gekennzeichnet war. Während wir mit der Synthese des Δ^4 -Androstenol-(17)-ons-(3) beschäftigt waren, ist im Amsterdamer Laboratorium die analytische Konstitutionsermittlung des Testosterons durchgeführt worden. Herr Laqueur hat uns freundlicherweise über die Ergebnisse dieser Arbeiten unterrichtet, bevor sie in der Literatur erschienen waren, so daß wir sie bereits in unserer vorläufigen Mitteilung⁵⁾ verwenden und die aus den Resultaten beider Laboratorien folgende Identität unseres Androstenolons mit dem Testosteron betonen konnten. Inzwischen sind die Ergebnisse der analytischen Untersuchung des Testosterons von K. David¹⁰⁾ veröffentlicht worden; wir stellen sie im folgenden zusammen: Testosteron vom Schmelzpt. $154\text{--}154,5^\circ$ (korr.) und der optischen Drehung $[\alpha]_D = +109^\circ$ zeigt große Ähnlichkeit mit Androsteron und Dehydroandrosteron; es ist ein Oxyketon der Formel $C_{19}H_{30}O_2$ oder $C_{19}H_{28}O_2$, liefert ein Acetat vom Schmelzpt. $140\text{--}141^\circ$ (korr.), ein Oxim vom Schmelzpunkt $221\text{--}222,5^\circ$ (korr.) und weist — dem Cholestenon ähnlich — im Ultraviolett eine charakteristische Absorption auf. Durch milde Oxydation liefert Testosteron das Diketon Androstendion (II) der Formel $C_{19}H_{26}O_2$ ¹¹⁾.

Schon aus diesen Versuchsergebnissen geht mit Sicherheit hervor, daß Androstenol (VI) und Testosteron identisch sind;

⁹⁾ Vgl. diese Z. 237, 75 (1935). ¹⁰⁾ Acta Brevia Neerl. 5, 85 (1935).

¹¹⁾ In der Arbeit von David ist die Frage der Identität des Diketons mit Androstendion offen gelassen worden; wie uns Herr Laqueur vor einigen Tagen mitteilte, ist inzwischen festgestellt worden, daß das Oxydationsprodukt des Testosterons mit Androstendion sicher identisch ist.

es wird weiterhin bestätigt durch die physiologischen Eigenschaften und durch den von A. Wettstein⁶⁾ mitgeteilten Befund, daß das Naturprodukt mit dem Androstenolon keine Depression beim Mischschmelzpunkt liefert.

Es ist somit durch diese Untersuchungen die Konstitution des Testikelhormons Testosteron in allen Einzelheiten sichergestellt und ein Weg gewiesen worden, diesen wichtigen Naturstoff leicht künstlich zu bereiten.

4. Zur physiologischen Wirksamkeit des Testosterons.

Testosteron übertrifft sowohl im Hahnenkammtest, wie an der Samenblase der Nager alle bisher bekannten männlichen Prägungstoffe weitgehend in der physiologischen Aktivität. Der Amsterdamer Arbeitskreis hat angegeben, daß etwa 10 γ als Tagesdosis über 4 Tage (2 mal 5 γ täglich) verabreicht, ein Flächenwachstum des Kapaunenkamms um durchschnittlich 15% hervorrufen¹²⁾. Wir haben das Androstenolon (VI) nach der gleichen Technik ausgewertet, um einen genauen Vergleich der Wirksamkeiten zu ermöglichen. Wie aus der im Versuchsteil wiedergegebenen Tabelle (S. 97) ersichtlich ist, stehen die Befunde von 3 Auswertungsreihen mit den Angaben Laqueurs in bester Übereinstimmung.

Nach unserer Auswertungstechnik¹³⁾ (je einmalige Injektion an 2 Tagen; durchschnittliches Kammwachstum um 20%) sind die notwendigen Stoffmengen naturgemäß etwas größer. Wir führten bisher 18 Auswertungsreihen durch; die Ergebnisse haben Schwankungen gezeigt und sind daher noch nicht als abgeschlossen zu bezeichnen. Mit großer Wahrscheinlichkeit liegt die „Einheit“ nach unserer Technik zwischen 25 und 30 γ ¹⁴⁾, was in Übereinstimmung wäre mit dem Befund, daß unsere „Einheit“ stets etwa 3 mal so groß ermittelt worden ist, wie die der Amsterdamer Gruppe.

Nach diesen Ergebnissen übertrifft Testosteron das Androsteron um etwa den 6fachen, das Androstandiol um etwa den doppelten Betrag in der physiologischen Wirkung am Hahnenkamm.

¹²⁾ Definition der „Einheit“ des Amsterdamer Arbeitskreises.

¹³⁾ Diese Z. 229, 170 (1934).

¹⁴⁾ Der in der vorläufigen Mitteilung angegebene Wert von 15–20 γ ist sicher zu niedrig.

In der Wirksamkeit auf die Vesikulardrüse der infantilen Ratten übertrifft Testosteron alle bisher geprüften Stoffe noch wesentlich stärker. In den auf Tafel V dargestellten Bildern ist die Wachstumswirkung von 100 γ Testosteron über 9 Tage (Gesamtdosis: 900 γ) wiedergegeben: die Vesikulardrüsen sind zur vollen Sekretionsbereitschaft aufgebaut worden; der Effekt ist ein weit besserer als mit der 5 fach größeren Dosis an Androstendion oder der 10 fach größeren Dosis an Androsteron. Die in diesem Testverfahren gültigen quantitativen Beziehungen müssen in weiteren Versuchsreihen geklärt werden.

Die physiologischen Versuche wurden von Fr. D. v. Dresler und Fr. U. Meinerts in der biochemischen Abteilung unseres Institutes durchgeführt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Rockefeller Foundation und der Schering-Kahlbaum A.-G., Berlin sprechen wir unseren Dank für die Unterstützung unserer Arbeiten aus.

Beschreibung der Versuche.

4⁵-Androstendiol-(3,17). 204 mg Dehydro-androsteron wurden mit 50 ccm n-Propanol unter Sieden so lange mit kleinen Stückchen Natrium versetzt, bis sich das Metall nicht mehr löste. Die heiße Lösung wurde in Wasser gegossen und ausgeäthert, die ätherische Lösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen, getrocknet (über Na₂SO₄) und abdestilliert. Der Rückstand wurde im Hochvakuum bei 140° destilliert. Es sublimierten 194 mg vom Schmelzpt. 175—178°. Durch Umkrystallisieren aus Aceton-Petroläther wurden 183 mg Androstendiol in Blättchen vom Schmelzpt. 177 bis 178° (unkorr.) erhalten.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} = -55,5^\circ$ (in Propylalkohol).

2,887 mg Subst.: 8,280 mg CO₂, 2,757 mg H₂O.

C₁₉H₃₀O₂ Ber. C 78,55 H 10,42 Gef. C 78,22 H 10,68.

4⁶-Androstendiol-diacetat-(3,17). 183 mg Androstendiol wurden durch $\frac{3}{4}$ stündiges leichtes Sieden mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach der Destillation im Hochvakuum bei 180° und Krystallisation aus reinem Methanol wurden 180 mg Androstendiol-diacetat in Blättchen vom Schmelzpunkt 159,5° (unkorr.) erhalten.

Optische Drehung $[\alpha]_D^{25} = -56,5^\circ$ (in Alkohol).

5,002 mg Subst.: 13,540 mg CO₂, 4,100 mg H₂O, 0,004 mg Rest.

C₂₃H₃₄O₄ Ber. C 73,75 H 9,16 Gef. C 73,88 H 9,17.

4⁶-Androstendiol-(3,17)-monoacetat-(17). 180 mg Androstendiol-diacetat wurden mit 0,8 Mol KOH (21,5 mg) in 65 ccm Methanol 15 Stunden

stehen gelassen, mit verdünnter Salzsäure angesäuert, in Wasser gegossen und ausgeäthert. Die ätherische Lösung wurde gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde einmal aus reinem Petroläther und danach bis zum konstanten Schmelzpunkt von 148° (unkorr.) aus verdünntem Aceton umkrystallisiert. Ausbeute an reinstem Mono-acetat in Gestalt von filzigen Nadeln: 102,9 mg.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} = -62,4^{\circ}$.

4,309 mg Subst.: 11,945 mg CO_2 , 3,680 mg H_2O .

$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_3$ Ber. C 75,83 H 9,72 Gef. C 75,60 H 9,56.

Oxydation mit Chromsäure: Testosteron-acetat. 102,9 mg Androstendiol-monoacetat wurden in 15 ccm Eisessig gelöst, mit 49,55 mg Brom in 1,57 ccm Eisessig bromiert, mit 30,9 mg CrO_3 in 12 ccm Eisessig versetzt und 15 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde in Wasser gegossen und ausgeäthert. Die ätherische Lösung wurde gewaschen (mit 1 n-NaOH, verdünnter Salzsäure und Wasser), getrocknet und ohne Erwärmen eingedampft. Der Rückstand der Oxydation wurde in 20 ccm Eisessig gelöst und portionsweise unter Umschwenken mit 1 g Zinkstaub versetzt, danach 10 Minuten auf siedendem Wasserbad erwärmt und vom Zinkstaub abgenutscht. Der Zinkstaub wurde 1 mal mit Eisessig und 3 mal mit Äther gewaschen; die vereinigten Filtrate wurden mit Wasser verdünnt und ausgeäthert, die ätherische Lösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand stellte ein hellgelbes Öl dar, das durch Destillation im Hochvakuum (0,001 mm) bei 120° gereinigt und aus verdünntem Aceton umkrystallisiert wurde. Es krystallisierte das Testosteron-acetat in Nadeln vom Schmelzp. 138° (unkorr.). Ausbeute: 51,6 mg.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} = +87,5^{\circ}$ (in Alkohol).

4,468 mg Subst.: 12,470 mg CO_2 , 3,630 mg H_2O .

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$ Ber. C 76,31 H 9,16 Gef. C 76,18 H 9,09.

Testosteron [Δ^4 -Androstenol-(17)-on-(3)]. 51,6 mg Testosteron-acetat wurden mit 15 ccm 1 n-methylalkoholischer Kalilauge 30 Minuten zum Sieden erhitzt, mit Wasser verdünnt und in der üblichen Weise aufgearbeitet. Das Verseifungsprodukt wurde aus verdünntem Aceton umgelöst; es krystallisiert in gefiederten Nadeln vom Schmelzp. 151° (unkorr.). Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} = +104^{\circ}$ (in Alkohol). Maximum der Absorption bei 238μ (Fig. 1). Ausbeute: 50 mg.

3,453 mg Subst.: 10,010 mg CO_2 , 3,000 mg H_2O .

$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2$ Ber. C 79,11 H 9,79 Gef. C 79,06 H 9,72.

Testosteron-oxim. Es wurde in der üblichen Weise durch Erwärmen mit überschüssigem Hydroxylamin-acetat in alkoholischer Lösung gewonnen und aus verdünntem Alkohol umgelöst. Kleine Nadeln vom Schmelzpunkt 215° (unkorr.).

2,699 mg Subst.: 0,109 ccm N_2 (24° , 758 mm).

$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{N}$ Ber. N 4,62 Gef. N 4,63.

Auswertung des Testosterons im Hahnenkammtest.
(Dosierung: 4 Tage lang 2 mal täglich 1 Dosis in 0,2 ccm Sesamöl.)

Datum	Dosis in γ	Tier Nr.	Gewicht des Kapauns in g	% Flächenwachstum des Kammes am			% Höchst- wachs- tum	% durch- schnittl. Wachs- tum
				3. Tag	4. Tag	5. Tag		
2. IX. 1935	1	421	1625	0	8,4	6,7	8,4	8,9
		429	1375	0	3,9	8,3	8,4	
		488	1475	0	6,1	9,9	9,9	
2. IX. 1935	5	417	2050	0,9	10,9	20,0	20,0	13,7
		343	2175	10,0	13,6	11,8	13,6	
		276	2225	3,3	2,4	6,5	6,5	
9. IX. 1935	5	491	1700	5,2	16,5	16,5	16,5	18,8
		496	1650	9,1	22,7	16,4	22,7	
		423	1750	7,1	14,1	17,2	17,2	
16. IX. 1935	5	26	2375	15,3	21,2	20,4	21,2	16,5
		174	2200	1,0	9,4	10,3	10,3	
		288	2350	4,2	15,8	17,9	17,9	
16. IX. 1935	10	183	2375	22,0	28,0	37,3	37,3	22,8
		123	2325	9,7	14,2	22,1	22,1	
		81	2375	7,5	8,1	9,0	9,0	