

### 159. Sexualhormone XXVI<sup>1)</sup>.

#### Zur Kenntnis der Oxydation von Cholesterin-acetat-dibromid mit Chromtrioxyd

von L. Ruzicka und Werner H. Fischer.

(3. IX. 37.)

#### *Übersicht über die bisherigen Resultate der Oxydation von Dihalogeniden ungesättigter Sterinderivate mit Chromtrioxyd.*

Die Übertragung unserer Sterinabbaumethode<sup>2)</sup> auf ungesättigte Sterinderivate war von Interesse, um die Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen Konstitution und androgener Wirkung auch auf die ungesättigten Analoga des Androsterons ausdehnen zu können. Das Vorkommen des trans-Dehydro-androsterons<sup>3)4)</sup> (II) im Harn, und später die Überlegung, dass im Testeshormon eine  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Ketogruppierung vorliegen könnte<sup>5)</sup>, erhöhte die Bedeutung des oxydativen Abbaus ungesättigter Sterine. So kam es, dass solche Untersuchungen gleichzeitig in verschiedenen Ländern ausgeführt wurden.

*Ruzicka* und *Wettstein*<sup>6)</sup> beschreiben die Bildung des trans-Dehydro-androsterons<sup>7)</sup> bei der Oxydation von Cholesterin-acetat-dibromid (I) in Eisessig bei ungefähr 45°; es ist wichtig, dabei die Temperatur niedriger zu halten als bei der Bereitung des Androsterons. Wir erwähnen in einer gleichzeitig erscheinenden Abhandlung<sup>1)</sup>, dass umgekehrt die Ausbeute an Androsteron durch Senken der Temperatur bei der Oxydation des epi-Cholestanol-acetats stark herabgesetzt wird. Später führten *Ruzicka*, *Fischer* und *Meyer*<sup>8)</sup> die gleiche Oxydation zu II mit dem Stigmasterin-acetat-dibromid durch. Schon vorher wurde von *Oppenauer*<sup>9)</sup> in einer kurzen Mitteilung die Oxydation von Sitosterin-acetat-dichlorid zu II erwähnt.

<sup>1)</sup> XXV. Mitt. Helv. **20**, 1283 (1937).

<sup>2)</sup> Vgl. über deren Anwendung bei Derivaten gesättigter Sterine Helv. **20**, 1283 (1937).

<sup>3)</sup> *Schoeller*, *Serini* und *Gehrke*, Naturwiss. **23**, 337 (1935) erwähnen, dass *Logemann* eine Synthese des trans-Dehydro-androsterons ausgeführt habe, ohne Angabe des Weges.

<sup>4)</sup> *Butenandt* und *Dannenbaum*, Z. physiol. Ch. **229**, 192 (1934).

<sup>5)</sup> *Ruzicka* und *Wettstein*, Helv. **18**, 990 (1935).

<sup>6)</sup> Helv. **18**, 986 (1935).

<sup>7)</sup> Dieses Keton sowie die anderen Oxydationsprodukte, die hier aufgezählt werden, liegen natürlich zuerst in Form der Acetat-dibromide vor, die durch Entbromen und Verseifen in die ungesättigten Oxy-derivate übergehen.

<sup>8)</sup> Helv. **18**, 1483 (1935).

<sup>9)</sup> Nature (London) **135**, 1039 (1935).

Wallis und Fernholz<sup>1)</sup> sowie Butenandt, Dannenbaum, Hanisch und Kudzuszus<sup>2)</sup> beschreiben bei der Oxydation von Cholesterin-acetat-dibromid neben der Bildung von II noch die Entstehung der 3-Oxy-cholensäure. Letztere Autoren isolierten ferner bei der Oxydation des Stigmasterin-acetat-dibromids neben II auch die 3-Oxy-bis-nor-cholensäure. Dalmer, v. Werder, Honigmann und Heyns<sup>3)</sup> erwähnen in einer Anmerkung, dass ihnen bei der Oxydation von Sitosterin-acetat-dibromid neben II die Isolierung der 3-Oxy-nor-cholensäure gelungen sei.

Marker, Whitmore, Kamm, Oakwood und Blattermann<sup>4)</sup> gehen vom Dibromid des Cholesteryl-chlorids aus und erhalten bei der Oxydation und Entbromung 3-Chlor-dehydro-androsteron.

Besonderes Interesse verdient die Mitteilung von Fujii und Matsukawa<sup>5)</sup>, dass ihnen bei der Oxydation von Cholesterin-acetat-dibromid auch die Isolierung von Pregnen-3-ol-20-on (III) gelungen ist.

#### Übersicht über unsere neuen Versuche.

Aus den entbromten Neutralteilen von der Oxydation des Cholesterin-acetat-dibromids (I) mit Chromtrioxyd in Eisessig bei 28—30° wurde in üblicher Weise die Hauptmenge des Acetats des trans-Dehydro-androsterons (II) als Semicarbazon abgetrennt. Aus der Mutterlauge wird ein unscharf bei ungefähr 220° schmelzendes Gemisch von Semicarbazonen erhalten, das zweckmässigerweise nacheinander mit Säure und dann mit Alkali behandelt wurde zur Abspaltung des Semicarbazonrestes und Verseifung der Acetatgruppe. Das vollständig erstarrende Gemisch der so erhaltenen Oxyketone liefert beim Krystallisieren aus Methanol grosse Mengen (fast die Hälfte des Gemisches) eines bei 125—127° schmelzenden Oxyketons C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>. Dieses wurde durch Überführung in ein Monoacetat und Benzoat, sowie durch Oxydation (über das Bromid) zu einem Diketon C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub> charakterisiert. Aus Analogie mit dem um 2 H-Atome reicheren Oxyketon, das ausgehend von epi-Cholestanol-acetat isoliert und in seiner Konstitution völlig aufgeklärt wurde<sup>6)</sup>, war für das Oxyketon vom Smp. 125—127° die Formel IV des  $\Delta^5$ -Nor-cholesten-3-trans-ol-25-on sehr wahrscheinlich. Bei der katalytischen Hydrierung des letzteren entstand ein Gemisch des gesättigten Oxyketons und des entsprechenden Diols, das durch Oxydation mit Chromtrioxyd in das gesättigte Diketon (V) umgewandelt wurde, welches mit dem Präparat identisch war, das wir ausgehend von epi-Cholestanol-acetat<sup>6)</sup> erhielten. Damit ist Formel IV für ungesättigte Oxyketon einwandfrei bewiesen.

<sup>1)</sup> Am. Soc. 57, 1379, 1504 (1935).

<sup>3)</sup> B. 68, 1814 (1935).

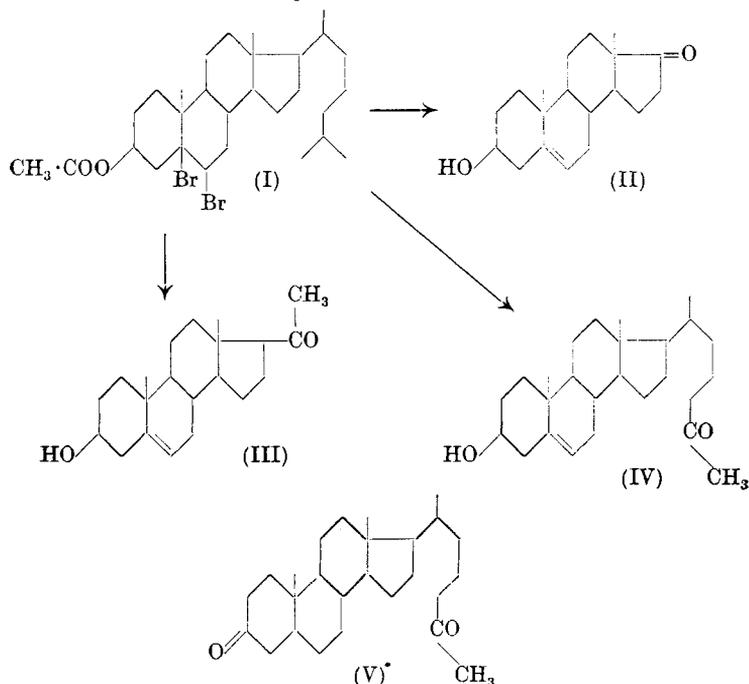
<sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. 237, 57 (1935).

<sup>4)</sup> Am. Soc. 58, 338 (1936).

<sup>5)</sup> J. pharm. Soc. Japan 56, 24 (1936), nach C. 1936, II, 1354.

<sup>6)</sup> Helv. 20, 1283 (1937).

Sowohl das Oxyketon wie das Diketon sind nach den Versuchen von Herrn Dr. *E. Tschopp* im biologischen Laboratorium der *Gesellschaft für Chemische Industrie* in Basel im Kapaunen- und Ratten-Test sowie im *Corner-Clauberg-Test* unwirksam.



Aus den methylalkoholischen Mutterlaugen des Oxyketons vom Smp. 125—127° wurde das darin noch reichlich enthaltene trans-Dehydro-androsteron durch Überführung des Gemisches ins Acetat oder Benzoat abgetrennt. Die aus den Mutterlaugen regenerierten Ketoverbindungen wurden in das Gemisch der Semicarbazone der Acetate umgewandelt und diese einer systematischen fraktionierten Krystallisation nach dem Dreieckschema unterzogen. Wegen der Einzelheiten verweisen wir auf die Beschreibung im experimentellen Teil. Schliesslich konnte das  $\Delta^5$ -Pregnenolon (III) erhalten werden, das zur weiteren Charakterisierung ins Acetat verwandelt wurde. Damit erhält die Angabe von *Fujii* und *Matsukawa* eine Bestätigung.

Dass ausgehend vom gesättigten und ungesättigten Sterinderivat bisher noch nicht alle einander entsprechenden Oxydationsprodukte isoliert werden konnten, hängt zum Teil wohl zusammen mit den Löslichkeitsverhältnissen und den eingeschlagenen Wegen der Trennung der Gemische. Die Arbeiten zur weitergehenden Analyse der in den Gemischen noch enthaltenen Verbindungen werden fortgesetzt.

Wir danken der *Gesellschaft für Chemische Industrie* in Basel und besonders Herrn Dr. *K. Miescher*, in dessen Abteilung die beschriebenen Versuche ausgeführt wurden, für die Förderung dieser Arbeit.

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

#### *Aufarbeitung der Semicarbazone.*

Die Oxydation von Cholesterin-acetat-dibromid mit Chromtrioxyd, aus der das untersuchte Material stammte, war bei einer Temperatur von 28—30° ausgeführt worden. Nach üblicher Aufarbeitung und Abtrennung des Semicarbazons des trans-Dehydroandrosteron-acetats blieb die wässrig-alkoholische Semicarbazon-Mutterlauge monatelang stehen. Das ausgeschiedene hellbraune Krystallinat wurde abgesaugt, vorerst mit heissem Wasser, dann mit kaltem Äthylalkohol gründlich ausgewaschen und hierauf mehrmals mit Äther ausgekocht. Aus den ätherlöslichen Produkten konnte u. a. Cholesterin-acetat zurückgewonnen werden. Die derart gereinigten Semicarbazone sind hellgelb und schmelzen um 220° unter Zersetzung.

#### *Spaltung der Semicarbazone.*

Die Spaltung geschah in üblicher Weise durch Erwärmen mit wässrig-alkoholischer Schwefelsäure z. B. in folgenden Mengen:

12 g Semicarbazon werden mit 450 cm<sup>3</sup> einer Mischung aus 75 cm<sup>3</sup> Äthanol, 10 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure und 15 cm<sup>3</sup> Wasser eine Stunde auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen wird mit 1½ Liter Wasser verdünnt, mit Kochsalz gesättigt und mit Äther erschöpfend extrahiert. Die vereinigten Ätherauszüge wäscht man mit Lauge und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und acyliert durch Stehenlassen mit Acetanhydrid oder Benzoylchlorid in Pyridin, oder aber man verseift mit Pottasche in wässrig-alkoholischer Lösung nach folgendem Beispiel, je nachdem man zur fraktionierten Krystallisation die Ester oder die freien Oxyketone verwenden will. 10 g Spaltprodukte werden mit 80 cm<sup>3</sup> Methanol und 5 g Pottasche in 20 cm<sup>3</sup> Wasser 1 Stunde am Rückfluss gekocht. Durch vorsichtiges Versetzen mit Wasser kann das Verseifungsprodukt quantitativ in krystallinem Zustande erhalten werden.

#### *Isolierung von Nor-cholestenolon (IV).*

Zur fraktionierten Krystallisation der Spaltprodukte eignen sich nach unseren Erfahrungen die freien Oxyketone infolge grösserer Löslichkeitsunterschiede besser als die Acylderivate. Die durch Spaltung der rohen Semicarbazone und nachträgliche Verseifung erhaltenen, zwischen 100—150° schmelzenden Anteile der Oxyketone werden aus Methylalkohol nach dem Dreieckschema fraktioniert krystallisiert. Dabei wird in den schwerlöslichen Fraktionen schon nach 2—3 Krystallisationen ein um 110° sinterndes und bei 125—127° schmelzendes Produkt isoliert, das seidenglänzende Blättchen bildet.

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

Benzoat. 0,5 g dieses Produktes werden mit 0,8 cm<sup>3</sup> Benzoylchlorid in 8 cm<sup>3</sup> Pyridin durch Stehenlassen benzoiliert. Man erhält Blättchen, die aus Äthylalkohol umkrystallisiert bei 144—145<sup>o</sup> schmelzen.

|  |                           |         |                           |
|--|---------------------------|---------|---------------------------|
| 5,053 mg Subst. gaben                          | 14,960 mg CO <sub>2</sub> | und     | 4,280 mg H <sub>2</sub> O |
| C <sub>33</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub> | Ber. C 80,76              | H 9,46% |                           |
|  | Gef. „ 80,73              | „ 9,48% |                           |

Es liegt somit wahrscheinlich das Benzoat eines Oxyketons C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub> vor. Diese Formel wird durch die Analysen des Acetats, des Semicarbazons des Acetats und des Verseifungsproduktes des Acetats bestätigt.

Acetat. Dasselbe wird in üblicher Weise durch Stehenlassen des Oxyketons mit Essigsäure-anhydrid in Pyridinlösung dargestellt und aus Methyl- oder Äthylalkohol in seidenglänzenden Blättchen gewonnen, die bei 141,5—142<sup>o</sup> schmelzen.

|  |                           |          |                           |
|--|---------------------------|----------|---------------------------|
| 4,991 mg Subst. gaben                          | 14,360 mg CO <sub>2</sub> | und      | 4,540 mg H <sub>2</sub> O |
| C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub> | Ber. C 78,44              | H 10,35% |                           |
|  | Gef. „ 78,46              | „ 10,18% |                           |

Semicarbazon des Acetates. Man erhält aus absolutem Alkohol kleine Nadeln, die bei 237—238<sup>o</sup> unter Zers. schmelzen. Das Semicarbazon ist in reinem Zustand in Alkohol schwerer löslich als dasjenige des trans-Dehydro-androsteron-acetates. Die Löslichkeit in absolutem Alkohol beträgt etwa 1:1000, diejenige des trans-Dehydro-androsteron-acetat-semicarbazons etwa 1:500.

|   |                                      |                                |                           |
|---|--------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 5,001 mg Subst. gaben   | 13,150 mg CO <sub>2</sub>            | und                            | 4,380 mg H <sub>2</sub> O |
| 3,335 mg Subst. gaben   | 0,247 cm <sup>3</sup> N <sub>2</sub> | (21,5 <sup>o</sup> und 755 mm) |                           |
| C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub> N <sub>3</sub> | Ber. C 71,70                         | H 9,76                         | N 8,65%                   |
|   | Gef. „ 71,70                         | „ 9,80                         | „ 8,52%                   |

Oxyketon. Eine Probe des analysenreinen Acetates wird in oben beschriebener Weise mit Pottasche in wässrig-methylalkoholischer Lösung verseift. Das Produkt, das in schönen Blättchen krystallisiert, zeigt wie das aus dem Spaltungsgemisch direkt isolierte Oxyketon einen unscharfen Schmelzpunkt (Sintern bei ca. 114<sup>o</sup>, Smp. 126—127<sup>o</sup>), da es Lösungsmittel zurückhält. Gemischt ergeben die beiden Produkte keine Depression. Zur Analyse wurde es im Hochvakuum nacheinander bei 80<sup>o</sup>, 100<sup>o</sup> und 110<sup>o</sup> getrocknet und sofort eingeschmolzen, da es in lösungsmittelfreiem Zustand hygroskopisch ist.

|  |                         |          |                          |
|--|-------------------------|----------|--------------------------|
| 2,914 mg Subst. gaben                          | 8,61 mg CO <sub>2</sub> | und      | 2,85 mg H <sub>2</sub> O |
| C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> | Ber. C 80,76            | H 10,96% |                          |
|  | Gef. „ 80,58            | „ 10,94% |                          |

Es liegt somit ein Oxyketon C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub> vor, das die Konstitution eines  $\Delta^5$ -Nor-cholesten-3-ol-25-ons besitzt. Es zeigt bei der Farbreaktion nach *Liebermann-Burchardt* denselben Farbübergang wie Cholesterin, von violett über blau in grün. Das isolierte Oxyketon gibt bei der milden Oxydation seines Dibromides mit Chromtrioxyd nach der Entbromung ein Diketon vom Smp. 128—129<sup>o</sup>.

Überführung in das gesättigte Diketon (V). 1 g Oxyketon vom Smp. 126—127° wurde in 50 cm<sup>3</sup> Eisessig in Gegenwart von Platinoxid-Katalysator hydriert. Das erhaltene gesättigte Gemisch wurde mit 0,5 g Chromtrioxyd in 50 cm<sup>3</sup> Eisessig und 10 cm<sup>3</sup> Wasser 20 Stunden stengelassen. Das erhaltene Oxydationsprodukt schmolz nach Umkrystallisieren aus Methanol bei 139,5—140° und war nach der Mischprobe identisch mit dem schon beschriebenen Präparat<sup>1)</sup>.

*Abtrennung von trans-Dehydro-androsteron (II).*

In den methylalkoholischen Mutterlaugen der fraktionierten Krystallisation sammelt sich das leichter lösliche trans-Dehydro-androsteron neben anderen auf diese Art nicht rein isolierbaren Produkten an. Das trans-Dehydro-androsteron wird vorteilhaft über das Acetat oder Benzoat von den Begleitstoffen befreit. Insgesamt konnte bei der geschilderten Fraktionierung von 10 g Oxyketon-Gemisch 4,8 g Nor-cholestenolon und 3,2 g trans-Dehydro-androsteron isoliert werden.

*Isolierung von Pregnenolon (III).*

Da die Trennung der am leichtesten löslichen Anteile des Gemisches der Oxyketone durch fraktionierte Krystallisation grossen Schwierigkeiten begegnete, versuchten wir die aus den leicht löslichen Oxyketonen bereiteten Semicarbazone der Acetate zu fraktionieren. Diese zwar mühevollere Methode gestattete die Auffindung des Pregnenolons.

Nach der Reinigung mit Äther werden die Semicarbazone fünfmal nacheinander mit absolutem Äthylalkohol ausgekocht und jeweils heiss filtriert. Die aus den Alkoholauszügen A—E beim Abkühlen ausfallenden ersten Krystallisationen (a) zeigen von 229 auf 253° steigende Schmelzpunkte (siehe Tabelle), während der schwerlösliche Rückstand F bei 229—230° schmolz.

| Alkohol-<br>auszug | Auskristallisierte Semicarbazone |                |                |                               |                      |
|--------------------|----------------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|----------------------|
|                    | a                                | c <sub>1</sub> | d <sub>2</sub> | e <sub>2</sub> f <sub>3</sub> | mit tiefstem<br>Smp. |
| A                  | 229—231°                         |                | 262—264°       | 240—248°                      | 170—180°             |
| B                  | 233—235°                         |                | 255—257°       | 243—249°                      | 200—203°             |
| C                  | 248—250°                         | 274—277°       |                |                               | 221—223°             |
| D                  | 246—248°                         | 273—274°       |                |                               | 227—228°             |
| E                  | 251—253°                         | 277—278°       |                |                               | 225—228°             |
| Rückstand F        | 229—230°                         |                |                |                               |                      |

<sup>1)</sup> Helv. 20, 1283 (1937).

Die Krystallisate a wurden nun getrennt nach dem Dreieck-schema fraktioniert krystallisiert. Dabei konnte nur in den Krystallisaten aus C, D und E Semicarbazon des trans-Dehydro-androsteron-acetates angereichert werden. Die saure und nachher alkalische Spaltung der Spitzenfraktionen  $c_1$  vom Smp. 274—278° ergab denn auch trans-Dehydro-androsteron in 90-proz. Ausbeute. Die andern Krystallisate, hauptsächlich diejenigen aus A und B, sind Gemische. Die saure und nachher alkalische Spaltung der Krystallisate  $d_2$  aus A und B ergab Produkte, deren fraktionierte Krystallisation aus Methanol Nor-cholestenolon und trans-Dehydro-androsteron in wechselnden Mengen lieferte. Aus den leichtest-löslichen Anteilen konnte jedoch keine einheitliche Verbindung isoliert werden. Ferner wurden auch Proben des Rückstandes F gespalten und das erhaltene Produkt fraktioniert krystallisiert, wobei etwa 60% Nor-cholestenolon neben trans-Dehydro-androsteron festgestellt wurden.

Schliesslich wurden die Fraktionen  $e_2$  und  $f_3$  aus A und B vom Smp. 240—249° einer eingehenden Untersuchung unterworfen. Dieselben wurden sauer und nachher alkalisch gespalten und das erhaltene Gemisch fraktioniert krystallisiert. Nach Abtrennung von Nor-cholestenolon und trans-Dehydro-androsteron konnte endlich aus der wässrig-methylalkoholischen Mutterlauge eine bei 185—188° schmelzende Verbindung isoliert werden. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus wässrigem Alkohol schmolz das Produkt bei 190—191°. Es liegt somit  $\Delta^4$ -Pregnen-3-ol-20-on vor, was durch Überführung ins Acetat bewiesen wurde.

Acetat. Man gewinnt es in feinen Nadeln vom Smp. 147 bis 147,5° aus wässrigem Alkohol.

|  |   |         |
|--|---|---------|
| 5,151 mg Subst.                                | gaben 14,575 mg CO <sub>2</sub> und 4,440 mg H <sub>2</sub> O |         |
| C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> | Ber. C 77,04  | H 9,57% |
|  | Gef. „ 77,16  | „ 9,65% |

Die noch leichter löslichen Fraktionen vom Smp. 220—228° enthielten ebenfalls kleine Mengen Pregnenolon, deren Isolierung jedoch grössere Mühe verursachte.

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Techn.  
Hochschule Zürich und Wissenschaftliches Laboratorium  
der *Gesellschaft für Chemische Industrie* in Basel.