

b) Saure Phosphatase des männlichen Urins bei verschiedenem pH: Ansätze wie oben ergeben mit 0,5 ml Urin bei:

pH	4,2	4,4	4,6	5,0	5,4	5,8
$\Delta E/\text{Min.}$	0,080	0,085	0,085	0,082	0,070	0,068

c) Saure Phosphatase des weiblichen Urins: Ansatz wie oben ergibt mit 0,5 ml Urin bei pH 5 ein $\Delta E/\text{Min.}$ von 0,010 und 0,013 (zwei verschiedene Fraktionen von der gleichen Person; Reihenmessungen liegen keine vor). Fluoridzusatz inaktiviert vollständig!

SUMMARY.

A rapid and very sensitive spectrophotometric method for the determination of the acid and alkaline phosphatases is given, using o-carboxyphenyl-phosphate as a substrate. This compound has been purified and characterized by its melting point and absorption spectra in aqueous solutions of different pH. Hydrolysis of the ester can be followed continuously by measuring the increase of extinction at 298 m μ .

Some data are given for acid phosphatase in urine.

Einer der Verfasser (*H. B.*) dankt der *Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie* für ein Stipendium, welches ihm die Durchführung dieser und zwei weiterer Arbeiten in USA. gestattet hat. Sein Dank gilt auch der Universität Wisconsin für die ihm erwiesene Gastfreundschaft sowie Herrn Prof. *P. P. Cohen* und den übrigen Mitgliedern des Departements für Physiologische Chemie für das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse. Einige wenige Messungen wurden im University Laboratory of Physical Chemistry, Harvard University, und im Department of Physiological Chemistry, Pennsylvania University, ausgeführt.

Department of Physiological Chemistry, Medical School,
The University of Wisconsin, Madison, Wis., U.S.A.

115. Zur Synthese von radioaktivem Progesteron

von Marcel Gut.

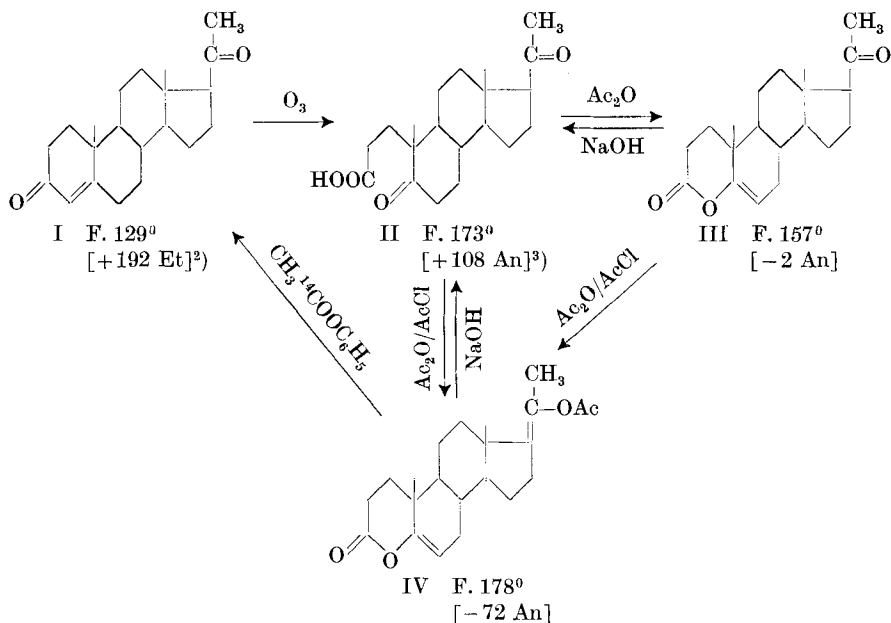
(12. V. 53.)

Für biologische Versuche benötigten wir in grösserer Menge radioaktives Progesteron, dessen radioaktives Kohlenstoffatom Glied eines Ringes sein sollte. 3- und 4-¹⁴C-Progesteron sind bereits von *Heard* und Mitarbeiter¹⁾ beschrieben worden, wobei die Radioaktivität in die Ätiocholensäure eingeführt und dann die Seitenkette auf bekanntem Weg aufgebaut wurde. In dieser Methode wurden

¹⁾ *R. D. Heard & P. Ziegler*, Am. Soc. **72**, 4328 (1950).

die letzten drei Stufen am radioaktiven Produkt ausgeführt, deren Ausbeute insgesamt ungefähr 50 % beträgt, was die Gesamtausbeute (auf radioaktives Ausgangsmaterial bezogen) auf ca. 20 % brachte.

In dem hier beschriebenen Verfahren erübrigte sich der Aufbau der Seitenkette. Öffnung des Ringes A von Progesteron (I) mit Ozon gab in guter Ausbeute die bekannte Ketosäure II¹⁾, die mit Essigsäureanhydrid und Acetylchlorid lactonisiert wurde, wobei gleichzeitig die 20-Ketongruppierung ins Enolacetat umgewandelt wird.



Ac = CH₃CO—. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die auf ganze Grade auf- oder abgerundete spez. Drehung für Na-Licht in folgenden Lösungsmitteln an:

An = Aceton, E = Äthanol.

An diese Verbindung IV konnte nun nach dem Verfahren von *Turner*⁴⁾ Phenylacetat angelagert werden. Hydrolyse, Decarboxylierung und Ringschliessung wurden ohne Isolierung der Zwischenstufen am rohen Kondensationsprodukt ausgeführt, wobei schliesslich nach Reinigung durch Chromatographie Progesteron mit 25 % Ausbeute (bezogen auf Phenylacetat) erhalten wurde⁵⁾.

¹⁾ *T. Reichstein & H. G. Fuchs*, *Helv.* **23**, 676 (1940).

²⁾ *A. Butenandt & J. Schmidt*, *B.* **67**, 2088 (1934).

³⁾ *T. Reichstein & H. G. Fuchs*, *Helv.* **23**, 676 (1940).

⁴⁾ *R. B. Turner*, *Am. Soc.* **72**, 579 (1950).

⁵⁾ Inzwischen hat Dr. *G. I. Fujimoto* uns freundlichst mitgeteilt, dass er seine Methode⁶⁾ auf das Lacton IV angewendet hat, was die Ausbeute an 4-¹⁴C-Progesteron auf 45% (berechnet auf ¹⁴CH₃J) brachte.

⁶⁾ *G. I. Fujimoto*, *Am. Soc.* **73**, 1856 (1951).

Die Ausführung dieser Arbeit wurde teilweise durch Mittel der *American Cancer Society (Massachusetts Division, Inc.)*, Public Health service, Grant No. A—427, und des *Damon Runyon Memorial Fund for Cancer Research, Inc.* ermöglicht.

Experimenteller Teil.

(Alle Smp. sind auf dem *Fisher John's*-Block unter dem Mikroskop bestimmt. Trocknung von Substanzproben zur Analyse und Drehung immer 4 Std. im Hochvakuum bei 50°.)

5, 20-Diketo-3, 5-seco-4-norpregnan-3-carbonsäure (II)¹⁾. 10 g Progesteron²⁾ wurden in einem Gemisch von 12 cm³ Chloroform und 30 cm³ Äthylacetat gelöst, 1,5 cm³ mit Eisessig versetzt und bei -75° mit 1,3 Mol Ozon oxydiert (Strömungsgeschwindigkeit 50 cm³/Min.). Dann wurden dem Gemisch 5 cm³ 30-proz. Hydrogenperoxydlösung zugegeben und 15 Std. unter gelegentlichem Schütteln im Eiskasten stehen gelassen. Die Mischung färbte Kaliumjodid-Stärke-Papier noch blau und wurde hierauf bei 25° im Vakuum zur Trockne gedampft. Der ölige Rückstand wurde in Chloroform-Äther gelöst und die Lösung mit kleinen Portionen 2-n. Sodalösung ausgezogen, bis diese beim Ansäuern keine Ausscheidung mehr gaben. Aus der Chloroform-Ätherlösung wurden nach Eindampfen und Umkristallisieren 1,5 g Progesteron erhalten. Die Sodalösung wurde mit 4-n. Schwefelsäure angesäuert, wobei die rohe Ketosäure ausgefällt wurde. Diese wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und schliesslich aus Aceton-Äther unter Zugabe von Pentan zweimal umkristallisiert. Die Ausbeute an farblosen Prismen vom Smp. 172—174° betrug 5,9 g.

5-Oxy-20-keto-3, 5-seco-4-norpregnen-(5)-3-säure-lacton : (3 : 5) (III). Die Lösung von 3 g Ketosäure II in 25 cm³ Essigsäureanhydrid und 2,5 g wasserfreiem Natriumacetat wurde unter Feuchtigkeitsausschluss 2 Std. unter Rückfluss zum Sieden erhitzt, wobei die Apparatur mit Stickstoff gespült wurde. Hernach wurde das Essigsäureanhydrid bei 60° im Vakuum weggedampft, der Rückstand in Äther aufgenommen, die Ätherlösung mit 2-n. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und schliesslich zur Trockne gedampft. Der kristallisierte hellbraune Rückstand wurde über Silica Gel³⁾ chromatographiert, wobei die Fraktionen mit Benzol-Äther (20 : 1) 1,76 farblose Prismen vom Smp. 157—158° lieferten. $[\alpha]_D^{24} = -2,20 \pm 2^{\circ}$ ($c = 0,929$ in Aceton).

18,601 mg Subst. zu 2,0021 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{24} = -0,020 \pm 0,02^{\circ}$

5,050 mg Subst. gaben 14,065 mg CO₂ und 4,010 mg H₂O

C₂₀H₂₈O₃ (316,43) Ber. C 75,91 H 8,92% Gef. C 75,98 H 8,88%

Ketosäure II aus III. 100 mg III wurden mit wenig Methanol benetzt, mit 15 cm³ 1-n. Natronlauge versetzt und auf dem Wasserbad erwärmt, bis die Lösung klar war. Dann wurde angesäuert, die ausgefällte Säure mit Äther ausgezogen und der Ätherextrakt mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Nach zweimaligem Umlösen wurden 91 mg Ketosäure erhalten, die bei 172—173° schmolzen; Misch-Smp. mit authentischem Material ebenso.

5-Oxy-20-acetoxy-3, 5-seco-4-norpregnadien-(5, 17)-3-säure-lacton-(3 : 5) (IV) aus II. 3,0 g der Ketosäure II wurden mit 20 cm³ Essigsäureanhydrid und 10 cm³ Acetylchlorid während 28 Std. (Feuchtigkeitsausschluss, Stickstoff) unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum bei 50° abgedampft und der bräunliche, kristalline Rückstand über Silica Gel chromatographiert. Die mit Benzol-Äther (5 : 1) erhaltenen Fraktionen gaben nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther 1,5 g farblose Prismen vom Smp. 170—180°. Wiederholtes Umlösen verbesserte den Smp. kaum.

1) *T. Reichstein & H. G. Fuchs, Helv.* **23**, 676 (1940).

2) Der *Chemical Specialties Co., Inc.*, New York, sei hier nochmals für die Überlassung des Progesterons gedankt.

3) *The Davison Chemical Corp.*, Kerngrösse 100—200.

Eine kleine Probe wurde durch Destillation im Molekularkolben in ein Sublimat und einen Rückstand getrennt. Der Rückstand gab aus Aceton-Äther lange Prismen vom Smp. 172—175°. Das Sublimat (0,03 Torr, 180°) kristallisierte aus Aceton-Äther-Pentan in derben, farblosen Prismen vom Smp. 178—180°. Die IR.-Spektren¹⁾ des Sublimats und des Rückstandes waren identisch und beide Präparate gaben gleiche Analysenwerte und Drehungen. $[\alpha]_D^{25} = -71,91^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,084$ in Aceton).

21,710 mg Subst. zu 2,0021 cm³; $l = 1$ dm; $\alpha_D^{24} = -0,78^\circ \pm 0,02^\circ$

4,210 mg Subst. gaben 11,300 mg CO₂ und 3,220 mg H₂O

C₂₂H₃₀O₈ (358,46) Ber. C 73,71 H 8,44% Gef. C 73,94 H 8,45%

5-Oxy-20-acetoxy-3,5-seco-4-norpregnadien-(5,17)-3-säure-lacton-(3:5) (IV) aus III. 500 mg III wurden mit 5 cm³ Essigsäureanhydrid und 3 cm³ Acetylchlorid unter Feuchtigkeitsausschluss 36 Std. unter Rückfluss gekocht. Die Aufarbeitung war genau dieselbe wie oben beschrieben. Nach dem Chromatographieren wurden 340 mg farblose Prismen vom Smp. 171—182° erhalten.

Ketsäure II aus IV. 100 mg IV wurden unter den gleichen Bedingungen verseift, wie sie für die Verseifung von III beschrieben sind (siehe weiter oben). Aus Aceton-Äther wurden 87 mg Säuren isoliert, die bei 172-174° schmolzen; Misch-Smp. mit authentischem Material ebenso.

Progesteron (I) aus IV. 180 mg Natriumhydrid, 500 mg Lacton-enolacetat IV und 230 mg 1-¹⁴C-Phenylacetat²⁾ mit einer Aktivität von 981 Imp./Min./mg wurden unter Feuchtigkeitsausschluss in einem 7 cm³ Benzol enthaltenden Rundkolben eingewogen. Das Gemisch wurde 48 Std. unter Stickstoff magnetisch gerührt; dann wurde unter Kühlung mit 2-n. Salzsäure angesäuert, mit Äther extrahiert, der Ätherextrakt mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und schliesslich im Vakuum eingedampft. Flüchtige Reaktionsprodukte wurden im Vakuum entfernt¹⁾. Der Rückstand wurde mit 15 cm³ Eisessig und 1,5 cm³ konzentrierter Salzsäure versetzt und drei Tage unter Stickstoff bei 35° stehengelassen. Hierauf wurden Salzsäure und Eisessig bei 20° im Vakuum abgedampft und der Rückstand in Äther aufgenommen. Die Ätherlösung wurde mit 2-n. Sodalösung und mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der ölige Rückstand wurde dann über Silica Gel chromatographiert, wobei aus den Benzol-Äther-Fractionen (6:1) 134 mg 3-¹⁴C-Progesteron vom Smp. 129—131° erhalten wurden, deren Aktivität 373 Imp./Min./mg betrug. Die Mischprobe mit authentischem Progesteron gab keine Smp.-Erniedrigung und die IR.-Spektren der beiden Proben stimmten überein.

Die Mikroanalysen wurden vom *Schwarzkopf Microanalytical Laboratory*, Woodside 77, N.Y. ausgeführt.

SUMMARY.

A synthesis for radioactive progesterone is described.

The Worcester Foundation for Experimental Biology,
Shrewsbury, Mass.

¹⁾ *H. Rosenkrantz & M. Gut*. Manuskript zum Druck eingesandt.

²⁾ *R. B. Turner*, *Am. Soc.* **72**, 579 (1950).