

The Bromination of saturated 3-Ketosteroids with N-Bromo-Imides

In recent issues of this journal, reports have appeared on the reaction of unsaturated ketones with N-bromosuccinimide. BUU-HOI¹ reported that in aliphatic ketones (mesityl oxide type), the bromine entered the α -position, whereas MEYSTRE and WETTSTEIN² found that in Δ^4 -3-ketosteroids (e. g. testosterone or progesterone) bromination occurred preferentially in the allyl position. As far as we are aware, only two publications have appeared on the bromination of saturated ketones with N-bromo-imides. WOHL³ brominated acetoacetic ester and SCHMID and KARRER⁴ reported the successful bromination of cyclohexanone and of a ketopelargonic acid derivative.

We were interested in studying the bromination of saturated 3-ketosteroids with these reagents because (a) if successful, it would afford a means of brominating without the simultaneous liberation of hydrogen bromide which may cause subsequent rearrangements, and (b) to determine whether the conventional rules⁵ set forward for the reaction with bromine (substitution at C₂ in members of the *allo* and at C₄ in those of the *normal* series) would hold also for this type of reagent.

It was found that by refluxing equimolar quantities of steroid ketone and N-bromosuccinimide or N-bromophthalimide in carbon tetrachloride solution in strong light⁶, reaction was complete after one to two minutes as evidenced by sudden decolorization and quantitative recovery of the halogen-free imide. Evaporation of the filtrate to dryness *in vacuo* and recrystallization from a suitable solvent yielded the corresponding monobrominated steroid ketone, which in each case was found to be identical with the corresponding sample prepared by the conventional bromine-acetic acid method. The yields obtained by either method are comparable. In the absence of light, the reflux time had to be extended to about one-half hour to obtain similar results. Cholestanone-3, dihydrotestosterone hexahydrobenzoate, and methyl 3-ketoalloetiocholanate gave the corresponding 2-bromo derivatives whereas coprostanone-3 and methyl 3-keto-12-hydroxycholanate led to the respective 4-bromo compounds⁷. The above results indicate that bromination of saturated 3-ketosteroids by this method is feasible and that the substitution takes place at the same carbon atom and in the same stereochemical position as found for brominations in acetic acid⁵.

Furthermore, it was of interest to us to determine whether additional bromination of the bromoketones could be accomplished with these reagents. Refluxing

of 2-bromocholestanone with a slight excess over the equimolar amount of N-bromosuccinimide in carbon tetrachloride solution on exposure to strong light for one minute gave 51% of crude 2,2-dibromocholestanone. The purified product gave no depression in m.p. on admixture with an authentic sample¹. It is interesting to note that only starting material could be recovered when the same reaction was carried out in the absence of strong light, notwithstanding the fact that the reaction time was prolonged to one and one-half hours. This is in contrast to the above-mentioned monobromination of cholestanone, which was essentially complete after one-half hour in the dark.

CARL DJERASSI and CAESAR R. SCHOLZ

Research Department, Division of Chemistry, Ciba Pharmaceutical Products, Inc., Summit, New Jersey, U.S.A., January 6, 1947.

Zusammenfassung

Die Bromierung von gesättigten 3-Keto-steroiden mit N-Brom-succinimid oder N-Brom-phthalimid liefert die 2-Brom-3-keto-steroiden bei Verbindungen, die der *allo*-Reihe angehören, und die 4-Brom-3-keto-steroiden bei Vertretern der *normal*-Reihe. Die weitere Bromierung eines 2-Brom-3-ketons zum 2,2-Dibrom-3-keton ist möglich.

¹ 2,2-Dibromocholestanone-3, m. p. 145–147° C, $[\alpha]_D^{25} = +104^0$ (chloroform) was obtained by the recently described method (WILDS and DJERASSI, J. amer. chem. Soc. 68, 2125, footnote 22a (1946). Its structure has been proven by conversion to Δ^1 -2-bromocholestanone-3, m. p. 91.5–92.5° C, $[\alpha]_D^{25} = -37.4^0$ (chloroform), max. at 255.5 m μ (log $\Sigma = 3.93$ in ethanol). The details will appear in a subsequent publication from this laboratory.

Action de l'eau oxygénée sur un anaérobie strict

Au cours de leurs travaux sur l'action toxique de l'oxygène, ELLIOT et LIBET¹, STADIE², DICKENS³, MANN et QUASTEL⁴ ont montré que cette action s'expliquait par l'empoisonnement de certaines diastases. Nous avons de notre côté constaté que:

¹⁰ Lorsque l'on ajoute de faibles quantités d'eau oxygénée à une suspension de *Cl. saccharobutyricum* dans un tampon de phosphate renfermant du glucose, en atmosphère d'azote, on constate un arrêt de la production d'H₂ qui reprend, après un temps de latence, avec une vitesse égale à celle du témoin.

²⁰ Pour des quantités plus fortes d'eau oxygénée, le temps de latence augmente et la reprise de la production d'H₂ se fait à une vitesse plus faible que celle du témoin.

³⁰ Enfin à partir d'une certaine concentration en eau oxygénée, l'arrêt de la production d'H₂ est définitif.

⁴⁰ On a donc une concentration provoquant un arrêt réversible et une concentration provoquant un arrêt irréversible. Ceci est à rapprocher des anciennes constatations de QUASTEL et STEPHENSON⁵ sur l'action de l'eau oxygénée dans la croissance de *Cl. sporogenes*.

⁵⁰ Les quantités d'eau oxygénée nécessaires pour produire le phénomène sont fonction du poids des bac-

¹ BUU-HOI, Exper. 2, 310 (1946).

² MEYSTRE and WETTSTEIN, Exper. 2, 408 (1946).

³ WOHL, Ber. 52, 51 (1919). – WOHL and JASCHINOWSKI, ib. 54, 476 (1921).

⁴ SCHMID and KARRER, Helv. chim. acta 29, 573 (1946).

⁵ Cf.: BUTENANDT and WOLFF, Ber. 68, 2091 (1935).

⁶ Cf.: MIESCHER and co-workers, Helv. chim. acta 28, 1252, 1497 (1945); ib. 29, 33, 627 (1946).

⁷ In the latter case the crude bromination product, which was difficult to purify, was dehydrobrominated with pyridine to give methyl Δ^4 -3-keto-12-hydroxycholanate, m. p. 145–147.5° C, $[\alpha]_D^{25} = +80.3^0$ (acetone), max. at 242 m μ (log $\Sigma = 4.28$ in ethanol), in ca. 30% overall yield. RIEGEL and MCINTOSH, J. amer. chem. Soc. 66, 1099 (1944) obtained this compound in 35% yield, m. p. 144–145° C by the conventional bromination method followed by treatment with pyridine. BURCKHARD and REICHSTEIN, Helv. chim. acta 25, 821 (1942) reported m. p. 150–152° C, $[\alpha]_D^{17} = +80.9^0$ (acetone).

¹ ELLIOT et LIBET, J. biol. Chem. 143, 227 (1942).

² STADIE, RIGGS et HANGAARD, Amer. J. med. Sci. 207, 84 (1944).

³ DICKENS, Bioch. J. 40, 145 et 171 (1946).

⁴ MANN et QUASTEL, Bioch. J. 40, 139 (1946).

⁵ QUASTEL et STEPHENSON, Bioch. J. 20, 1125 (1926).

téries. Mais les résultats sont cohérents. Pour 1 mg de bactéries (poids sec) la limite de réversibilité complète est atteinte avec 6 γ d'H₂O₂, celle de l'irréversibilité avec 11 à 13 γ dans un volume de 2 cm³.

6° Ces chiffres ne correspondent pas aux quantités maximum d'eau oxygénée que peuvent fixer les bactéries. Ces quantités sont variables: 80 à 180 γ par mg (poids sec) de bactéries vivantes, 60 à 140 γ de bactéries tuées par la chaleur.

7° L'eau oxygénée semble donc agir d'abord sur une substance X responsable du dégagement d'H₂ à partir du glucose ou de ses produits de dégradation, suivant un mécanisme tel que la fixation d'un équivalent d'oxygène donne une combinaison réversible, celle de deux une combinaison irréversible. Peut-être s'agit-il de la diastase de LIPMANN, qui libère aux dépens de l'acide pyruvique de l'H₂ et du CO₂. On constate en effet après addition d'eau oxygénée, lorsque le phénomène est réversible, une diminution de la vitesse de production de CO₂, suivi au bout d'un certain temps, d'une reprise à une valeur égale à celle du témoin.

Ceci concorde avec la suggestion de MANN et QUASTEL¹ qui pensent que dans le cerveau, la pyruvate oxydase, en tant que thiol-enzyme est le facteur qui est empoisonné par de hautes tensions d'oxygène ou par l'eau oxygénée.

E. AUBEL, A. J. ROSENBERG et J. SZULMAJSTER

Institut de biologie physico-chimique, Paris, le 15 janvier 1947.

Summary

A quantitative study on the action of H₂O₂ upon *Cl. saccharobutyricum* shows that the primary action is produced upon a first substance X, very likely an enzyme, following a mechanism such as one equivalent of oxygen gives a reversible combination, and two equivalents an irreversible combination.

¹ MANN et QUASTEL, *Bioch. J.* **40**, 139 (1946).

**Hemmungswirkungen
verschiedener Indophenole auf die Wasserstoff-
peroxydzersetzung durch Blutkatalase**

Schon im Jahre 1928 wurde von ALEXEJEW und RUSSINOWA¹ gezeigt, daß verschiedene Wasserstoffakzeptoren, z. B. Methylenblau, α -Dinitrophenol und Chinon, die Aktivität der Blutkatalase zu hemmen imstande sind. Wir haben die Angaben dieser Autoren nachgeprüft und konnten sie weitgehendst bestätigen. In einer früheren Arbeit² haben wir dann eine Anzahl verschieden substituierter Chinone auf ihre Hemmwirkung gegenüber der Blutkatalase untersucht und konnten dabei feststellen, daß bei sonst ähnlicher Konstitution das Oxydations-Reduktions-Potential dieser Stoffe einen Einfluß auf die Stärke der Hemmung besitzt. Allerdings konnten wir keine völlige Proportionalität nachweisen; es müssen also auch andere Faktoren bestimmend wirken.

Wir haben nunmehr eine Anzahl verschiedener Indophenole, die wir für einen anderen Zweck dargestellt hatten, auf ihre Hemmwirkung auf die Aktivität der

¹ A. ALEXEJEW und K. RUSSINOWA, *Bull. Inst. Rech. biol. Perm.* **6**, 425 (1928).

² O. HOFFMANN-OSTENHOF und E. BIACH, *Mh. Chem.* (im Druck).

Katalase untersucht. Bei der nahen Verwandtschaft der Indophenole mit den Chinonen war ein Hemmeffekt von vornherein zu erwarten und wir konnten einen solchen auch nachweisen. Die gefundenen Hemmwirkungen waren in vielen Fällen sehr beträchtlich und überstiegen bei einigen Indophenolen die stärksten der bei den Chinonen gefundenen Hemmwerte. Eine Abhängigkeit vom Oxydations-Reduktions-Potential konnte nicht festgestellt werden; allerdings ist diese Größe nicht bei allen untersuchten Stoffen bekannt.

Bei diesen Messungen wurde die gleiche Methodik und ein gleichartiges Blutkatalasepräparat wie in der oben zitierten Arbeit¹ verwandt; die prozentuellen Hemmungswerte sind mit einer Fehlergrenze von höchstens $\pm 2\%$ reproduzierbar. In der Tabelle geben wir die erhaltenen Werte nur für eine einzige Konzentration an; zum Vergleich ist auch der entsprechende Hemmungswert eines der stärksten wirksamen Chinone (*p*-Benzochinon) bei derselben Konzentration angeführt.

Tabelle I

Hemmung der Aktivität von Blutkatalase durch verschiedene Indophenole in 10⁻⁴molarer Konzentration im Versuchsansatz ($p_H = 7$).

Substanz	Prozentuelle Hemmung
Phenol-indophenol	25
Phenol-indokresol	42
Phenol-indothymol	19
2-Chlorphenol-indophenol	20
2, 6-Dichlorphenol-indophenol	3
2, 6-Dibromphenol-indophenol	18
2, 6-Dichlorphenol-indokresol	12
2, 6-Dibromphenol-indokresol	7
2, 6-Dichlorphenol-indogajakol	22
2, 6-Dibromphenol-indogajakol	20
2, 6-Dichlorphenol-3'-bromindophenol	25
2, 6-Dibromphenol-3'-bromindophenol	32
2, 6-Dichlorphenol-indothymol	0
2, 6-Dibromphenol-indothymol	5
2, 6-Dichlorphenol-indonaphthol	12
2, 6-Dibromphenol-indonaphthol	15
<i>p</i> -Benzochinon	24

Es scheint nicht möglich zu sein, die durch Indophenole oder auch durch Chinone bewirkte Hemmung durch Zugabe von Reduktionsmitteln rückgängig zu machen. Hierbei muß allerdings bemerkt werden, daß Reduktionsmittel ebenfalls imstande sind, eine beträchtliche Hemmwirkung auf die Katalaseaktivität auszuüben. So wurde unser Blutkatalasepräparat von Natriumhydrosulfit in 10⁻⁴molarer Konzentration in seiner Wirkung um 20% gehemmt. Auch organische Wasserstoffdonatoren zeigen eine Hemmwirkung; so hemmte Hydrochinon in 10⁻⁴molarer Konzentration die Blutkatalase zu 31%; SEIDE² berichtet über größenordnungsmäßig entsprechende Hemmungen von kristallisierter Leberkatalase durch Phenylhydroxylamin, Aminophenole und ähnliche Substanzen. Vielleicht lassen sich auch die in der älteren Literatur beschriebenen Katalasehemmungen durch Ferri-, Cupro- und Manganosalze als Oxydations- bzw. Reduktionswirkungen deuten.

¹ O. HOFFMANN-OSTENHOF und E. BIACH, *Mh. Chem.* (im Druck).

² G. SEIDE, *Biochem. Z.* **308**, 175 (1941).