

bindungen als bequemes Demonstrations-Beispiel für den Ersatz eines Heteroatoms durch ein anderes dienen kann.

Ich habe also mit Hilfe einer katalytischen Reaktion zum erstenmal Furan in Pyrrol und Thiophen übergeführt. Sicherlich werden sich die Homologen des Furans ebenso leicht in die entsprechenden Pyrrol- und Thiophen-Homologen umwandeln lassen. Auch andere cyclische Oxyde dürften zu einem analogen Ersatz der Heteratome befähigt sein. Ich behalte mir das neu entdeckte Anwendungsgebiet der Katalyse, auf dem ich weiterarbeite, vor.

Vorliegende Arbeit ist meinem Lehrer Hrn. Prof. Dr. N. D. Zelinsky, Mitglied der Akademie der Wissenschaften der U. S. S. R., in Hochachtung gewidmet.

## 82. Adolf Butenandt und Ulrich Westphal: Einige Ergänzungen zur Chemie des Gelbkörper-Hormons.

[Aus d. Organ.-chem. Institut d. Techn. Hochschule Danzig-Langfuhr.]

(Eingegangen am 21. Januar 1936.)

Alle prinzipiell wichtigen Fragen in der Chemie des Corpus-luteum-Hormons Progesteron können als gelöst gelten; sie haben kürzlich ihre zusammenfassende Darstellung<sup>1)</sup> gefunden. Im Verlauf der 1934 im Danziger Laboratorium durchgeführten Arbeiten über die Reindarstellung, Konstitutions-Ermittlung und künstliche Herstellung des Progesterons sind aber einige Beobachtungen gemacht worden, deren experimentelle Klärung späterer Arbeit vorbehalten worden war. In der vorliegenden Notiz berichten wir ergänzend über einige dieser Fragen.

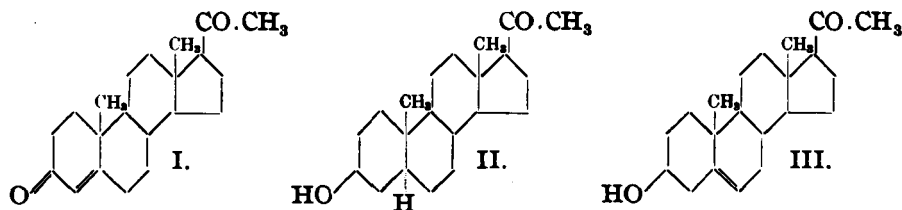
### 1. Zur Reindarstellung des Progesterons und seiner Begleitstoffe aus Schweine-Ovarien<sup>2)</sup>.

Das Progesteron läßt sich als Keton aus den Lipoid-Extrakten der Ovarien durch Umsetzung mit Semicarbazid abscheiden; das zunächst anfallende Roh-semicarbazon liefert nach der Spaltung mit verd. Säure ein von Krystallen durchsetztes Öl, aus dem durch fraktionierte Sublimation im Hochvakuum ein sehr gut krystallisiertes Keton-Gemisch (A) darzustellen ist. Aus 240 kg Schweine-Ovarien lassen sich nach unseren Erfahrungen etwa 1 g Roh-semicarbazon und daraus 300—340 mg des Stoffgemisches (A) bereiten. Es ist nicht leicht gewesen, dieses Gemisch (A) vollständig in seine Komponenten zu zerlegen; durch Fraktionierung mit Lösungsmitteln, Acetylierung und Hochvakuum-Sublimation ist es uns seinerzeit gelungen, aus mehreren Ansätzen insgesamt etwa 20 mg an reinem  $\alpha$ -Progesteron (I) (Schmp. 128.5°), 2—3 mg an reinem  $\beta$ -Progesteron (I) (Schmp. 120°) und etwa 70—80 mg an reinem, physiologisch inaktivem *allo*-Pregnanolon (II) (Schmp. 194°) aus dem Stoffgemisch (A) zu isolieren<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> U. Westphal, Über das Hormon des Corpus luteum, *Ergebn. Physiol.* **37**, 272 [1935].

<sup>2)</sup> vergl. *Ztschr. physiol. Chem.* **227**, 84 [1934].

Da diese Mengen zur vollständigen Konstitutions-Ermittlung der Verbindungen ausgereicht haben, verzichteten wir zunächst darauf, die Darstellung des Progesterons und seiner Begleitstoffe aus Drüsen-Extrakten weiter auszugestalten. Erst kürzlich haben wir uns der noch ungeklärten Frage wieder zugewandt, ob in der krystallisierten Keton-Fraktion (A) aus Schweine-Ovarien neben Progesteron (I) und *allo*-Pregnanolon (II) noch andere Stoffe vorhanden sind. Anhaltspunkte dafür waren gegeben: Wir selbst<sup>3)</sup> wiesen auf die Abtrennung einer unter 100° schmelzenden Fraktion bei der Darstellung der Reinsubstanzen hin und betonten die Notwendigkeit der Charakterisierung dieses Stoffes, W. Allen und O. Wintersteiner<sup>4)</sup> beobachteten ein nicht näher untersuchtes Krystallisat vom Schmp. 70—74°, und Slotta, Ruschig und Fels<sup>5)</sup> haben einen „Luteosteron B“ genannten Stoff erwähnt, der dem *allo*-Pregnanolon nahe verwandt sein soll, bisher aber nur durch einige krystallographische Daten gekennzeichnet wurde.



Die endgültige Entscheidung nach der Zusammensetzung unseres Keton-Gemisches (A) war mit den verfügbaren Substanzmengen möglich durch die Anwendung einer neuen Trennungs-Methode. Diese wurde in der Umsetzung der einzelnen Fraktionen mit Chlor-sulfonsäure gefunden; in völliger Analogie zu dem für Sterine beschriebenen Verhalten<sup>6)</sup> bilden die entstehenden sauren Schwefelsäure-ester der in unserem Gemisch vorliegenden Keto-Alkohole sehr schwer lösliche Natriumsalze, die man leicht abtrennen und durch Behandlung mit Essigsäure oder alkohol. Schwefelsäure wieder spalten kann. Wir haben nach diesem Verfahren alle uns aus den früheren Versuchs-Reihen<sup>2)</sup> verbliebenen Keton-Gemische, sowohl solche vom Schmp. unter 100°, als auch höher (145—155°) schmelzende Fraktionen umgesetzt; die Hydroxylgruppen enthaltenden Stoffe wurden in Form der Natriumsalze ihrer sauren Schwefelsäure-ester zur Abscheidung gebracht und dadurch von den hydroxyl-freien Ketonen getrennt. Diese Methodik entspricht im Prinzip der von Hartmann und Wettstein<sup>7)</sup> zur Lösung derselben Aufgabe angewandten Veresterung des Keton-Gemisches mit Phthalsäure; wir glauben aber, daß in der leichten quantitativen Abscheidung der Schwefelsäure-ester als Natriumsalze ein besonderer Vorteil der von uns gewählten Umsetzung mit Chlor-sulfonsäure liegt.

Das Ergebnis unserer Trennungs-Versuche war eindeutig: Wir erhielten aus allen Fraktionen ein und dasselbe, durch Umkrystallisieren aus Wasser

<sup>3)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **227**, 92 Zeile 13 v. u. [1934].

<sup>4)</sup> Science **80**, 190 [1934]; Journ. biol. Chem. **107**, 321 [1934].

<sup>5)</sup> B. **67**, 1270 [1934].

<sup>6)</sup> Mandel u. Neuberg, Biochem. Ztschr. **71**, 188 [1915]; Natelson u. Sobel, Journ. biol. Chem. **109**, 687 [1935].

<sup>7)</sup> Helv. chim. Acta **17**, 1365 [1934].

zu reinigende Natriumsalz der Zusammensetzung  $C_{21}H_{33}O_2 \cdot SO_2 \cdot ONa$ , das durch Spaltung mit verd. Essigsäure oder alkohol. Schwefelsäure reines *allo*-Pregnanolon (Schmp. 194<sup>9</sup>) lieferte. Aus den nicht mit Chlorsulfonsäure reagierenden Anteilen krystallisierte beim Versetzen mit Alkohol ohne jede Schwierigkeit Progesteron. Alle von uns aus Ovarial-extrakten über das Semicarbazon dargestellten Roh-krystallisate erwiesen sich bei Verwendung dieser einfachen Trennungsmethode als Gemische von *allo*-Pregnanolon (II) und  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Progesteron<sup>8</sup>) (I) in wechselndem Mengen-Verhältnis. Aus den durch Spaltung von 1 g Roh-semicarbazon gewonnenen 320 mg Keton-Gemisch (A) wurden auf diese Weise insgesamt 135 mg Progesteron erhalten; da 1 g des Semicarbazons aus 4.8 g des hochgereinigten Öles, entsprechend 1000 K. E. an Corpus-luteum-Hormon, dargestellt wird, beträgt die Ausbeute an krystallisiertem Progesteron (135 mg, entsprechend 180 K. E.) 18%.

Anhaltspunkte für das Vorliegen weiterer Stoffe in dem von uns beschriebenen Keton-Gemisch (A)<sup>2</sup>) haben wir nach Anwendung der neuen Trennungsmethode auf den von uns verarbeiteten Gelbkörper-Extrakt nicht mehr gefunden. Wir glauben mit Sicherheit sagen zu können, daß in den von uns beobachteten Krystallisaten mit einem Schmelzpunkt unter 100<sup>0</sup> kein einheitlicher Stoff vorliegt; eine Substanz, die dem „Luteosteron B“ von Slotta, Ruschig und Fels<sup>5</sup>) entsprechen würde, haben wir bei unseren Untersuchungen nicht beobachtet.

Die größte Schwierigkeit in der Rein-darstellung des Corpus-luteum-Hormons aus Ovarien bestand bisher in der quantitativen Trennung der nahe verwandten Ketone; durch die vorstehend beschriebene Methode dürfte diese Schwierigkeit behoben sein; man könnte durch ihre Verwendung die Darstellung des Progesterons aus natürlichem Ausgangsmaterial sehr vereinfachen und in der Ausbeute wesentlich verbessern, falls die Aufbereitung der Drüse auf Corpus-luteum-Hormon (trotz der leicht durchführbaren künstlichen Herstellung<sup>9</sup>) dieses Wirkstoffes) aus irgendwelchen Gründen wieder Interesse finden sollte.

## 2. Über die Oxydation des Pregnenolons zu Progesteron.

Das aus Stigmasterin darzustellende Pregnenolon (III)<sup>10</sup>) vom Schmp. 190<sup>0</sup> dient bisher als wichtigstes Ausgangsmaterial für die künstliche Bereitung des Progesterons (I). Die oxydative Umwandlung des Pregnenolons in Progesteron ist auf mehreren Wegen durchgeführt worden, entweder durch direkte Oxydation mit Chromsäure<sup>10</sup>) oder Kupferoxyd<sup>11</sup>), oder nach vorübergehendem Schutz der Doppelbindung durch Addition von Brom unter Verwendung von saurer Kaliumpermanganat-Lösung<sup>12</sup>) oder von Chromsäure<sup>11</sup>).

<sup>8</sup>) vergl. Butenandt u. Schmidt, B. **67**, 2088 [1934]. Daß  $\alpha$ - und  $\beta$ -Progesteron mit Sicherheit nur Modifikationen von ein und derselben Substanz mit völlig gleicher physiologischer Wirksamkeit sind, kann nicht zweifelhaft sein. Zu einer Arbeit von Fels (Centralbl. Gynäkol. **59**, 2420 [1935]), in der nochmals in wenig überzeugender Weise ein physiologischer Unterschied zwischen beiden Formen betont wird, nehmen Hohlweg u. Schmidt in der Klin. Wchschr. unter Darlegung neuer Versuchs-Ergebnisse Stellung.

<sup>9</sup>) B. **67**, 1611, 1901, 2085 [1934].

<sup>10</sup>) B. **67**, 1611 [1934].

<sup>11</sup>) B. **67**, 1903, 2085 [1934].

<sup>12</sup>) Fernholz, B. **67**, 2029 [1934].

Durch eine Reihe von Parallel-versuchen haben wir uns bemüht, die günstigsten Bedingungen für die Umwandlung des Pregnenolons in Progesteron ausfindig zu machen. Die besten Resultate lieferte uns die Oxydation des Pregnenolon-dibromids mit Chromsäure; im Versuchs-Teil führen wir ein Beispiel für diese Arbeitsweise an, die (ohne Aufarbeitung der Mutterlaugen nach der weiter unten angegebenen Methode) aus 200 mg Pregnenolon direkt 73 mg reines Progesteron darzustellen gestattet.

Bei allen übrigen Methoden beobachteten wir stets das Auftreten von schwer trennbaren Substanz-Gemischen mit wechselndem Schmelzpunkt zwischen 129° und 163°. Wir haben auf diese Tatsache schon früher hingewiesen<sup>13)</sup> und die nähere Charakterisierung dieser schwer trennbaren Oxydationsprodukte in Aussicht gestellt<sup>11)</sup>. Wir fanden nunmehr, daß sie sich durch Umsetzung mit Chlor-sulfonsäure in der oben beschriebenen Weise genau so leicht trennen lassen, wie die natürlichen Ketone aus Corpora lutea. Die Vermutung, daß durch Oxydation des Pregnenolons neben dem Progesteron noch weitere, ihm ähnliche Umwandlungsprodukte entstehen, hat sich nicht bewahrheitet; alle früher<sup>13)</sup> aufgefundenen Krystallisate haben sich als Gemische von Pregnenolon und Progesteron erwiesen. Da das Pregnenolon sich nach der Umsetzung mit Chlor-sulfonsäure leicht als schwer lösliches Natriumsalz seines Schwefelsäure-esters abtrennen läßt, hat diese neue Methode auch zur Trennung des „synthetischen“ Progesterons von unverändertem Pregnenolon Bedeutung.

Es sei noch erwähnt, daß wir das Pregnenolon (III) durch seine optische Drehung  $[\alpha]_D^{20} = +30^\circ$  und ein gut krystallisiertes Oxim vom Schmp. 219° (unkorr.) näher charakterisiert haben.

### Beschreibung der Versuche.

Beispiel für die Trennung von Progesteron und *allo*-Pregnanolon (bzw. Pregnenolon).

106 mg eines aus Ovarial-extrakt nach der früher<sup>2)</sup> angegebenen Methode dargestellten Krystall-Gemisches vom Schmp. 80—100° werden sorgfältig getrocknet, in 3 ccm Chloroform und 1.5 ccm absol. Pyridin gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung unter 0° wird eine ebenfalls gekühlte Mischung von 0.5 ccm Chlor-sulfonsäure und 2 ccm Chloroform langsam hinzugefügt; das Reaktionsgut wird erwärmt und  $\frac{1}{2}$  Stde. auf dem Wasserbade zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten werden etwa 25 ccm Äther und 20 ccm 2-n. Soda hinzugefügt, und es wird kräftig geschüttelt; das Natriumsalz des sauren Sulfates fällt aus, es wird noch einige Male mit Äther, in dem es völlig unlöslich ist, durchgeschüttelt, abfiltriert und mit Äther gewaschen. Die vereinigten ätherischen Lösungen werden mit verd. Schwefelsäure und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es hinterbleiben 77 mg Progesteron, das nach dem Umkrystallisieren aus reinem Alkohol einen Schmp. von 128.5° zeigt.

Die Menge des Natriumsalzes beträgt 20 mg; es läßt sich aus Wasser umkrystallisieren und zeigt einen Schmp. um 193°.

7.632 mg Sbst.: 3.885 mg BaSO<sub>4</sub>.

C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>O<sub>5</sub>Na. Ber. S 7.6. Gef. S 7.0.

<sup>13)</sup> s. unsere Angaben B. 67, 1611 [1934].

Die beste Spaltungsmethode besteht nach unseren Erfahrungen im Erwärmen des Natriumsalzes mit Alkohol-5-n. Schwefelsäure (2:1), nach der für die Spaltung der Semicarbazone angegebenen Methode<sup>14)</sup>. 20 mg Natrium-*salz* liefern nach der Spaltung 10—11 mg *allo*-Pregnanolon.

In völlig analoger Weise kann die Trennung von anders zusammengesetzten Mischungen aus Progesteron und *allo*-Pregnanolon bzw. von Gemischen aus Progesteron und Pregnenolon, wie sie bei der Darstellung des Corpus-luteum-Hormons aus Stigmasterin anfallen können, durchgeführt werden; so wurden z. B. aus 220 mg des über die Semicarbazone aus Gelbkörper-Extrakt erhaltenen Keton-Gemisches vom Schmp. 145—155° (A<sub>1</sub>)<sup>2)</sup> 60 mg Progesteron gewonnen.

#### Überführung von Pregnenolon (III) in Progesteron (I).

200 mg Pregnenolon, Schmp. 189—190°,  $[\alpha]_D^{20} = +30^{\circ}$  (in Alkohol), werden in 15 ccm reinem Eisessig gelöst, unter Kühlung in Eis tropfenweise mit einer Lösung von 101.2 mg Brom (= 2 Atome) = 0.032 ccm Brom in 5 ccm Eisessig und anschließend mit einer 30.5 mg Sauerstoff entsprechenden Menge Chromsäure-Eisessig-Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei etwa 20° 48 Stdn. sich selbst überlassen, anschließend in Wasser gegossen und mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wird nach dem Waschen mit Wasser über Natriumsulfat getrocknet und unter Zusatz von etwas Zinkstaub eingedampft. Der Rückstand wird mit etwa 0.5 g Zinkstaub versetzt und nach Zugabe von 10 ccm Eisessig 10 Min. auf dem Wasserbade erwärmt. Die mit Wasser verdünnte Lösung wird mit Äther ausgeschüttelt, die in Äther löslichen Anteile werden aus verd. Alkohol umkrystallisiert. Impfen der Krystallisations-Lösung und Kühlung auf —8° erleichtern die Abscheidung des Progesterons. Ausbeute 73 mg. Schmp. 128.5°.

#### Oxim des Pregnenolons (III).

20 mg reines Pregnenolon vom Schmp. 190° wurden 1½ Stdn. in alkohol. Lösung mit überschüssigem Hydroxylamin-Acetat gekocht. Die Lösung wurde eingedampft und mit Wasser gefällt. Das gut krystallisierte Rohprodukt zeigte einen Schmp. von 215—218°, der nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus verd. und reinem Alkohol bei 218—219° lag.

3.926 mg Sbst.: 10.955 mg CO<sub>2</sub>, 3.500 mg H<sub>2</sub>O. — 2.997 Sbst.: 0.112 ccm N (25°, 775 mm Hg).

C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub>N. Ber. C 76.07, H 10.04, N 4.23.

Gef. „ 76.10, „ 9.98, „ 4.37.

Wir danken der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft und der Schering-Kahlbaum A.-G., Berlin für die Unterstützung unserer Arbeiten.

<sup>14)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **227**, 95 [1934].