

Dehydrierung von Steroiden, XII<sup>1</sup>

## Über die Behandlung von Cholesterin mit Floridin

(Ein Verfahren zum Nachweis von 9.10-*seco*-Steroiden)

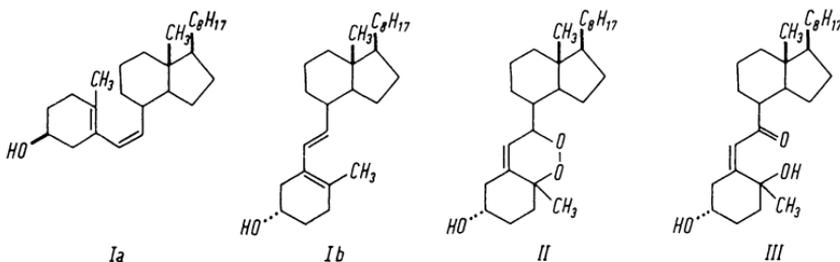
Von

Heinz Dannenberg und Klaus-Friedrich Hebenbrock

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Der Schriftleitung zugegangen am 4. Juni 1965)

Interesse an 9.10-*seco*-Verbindungen des Cholesterins veranlaßte uns, die von Raoul und Mitarbeitern<sup>2-6</sup> beschriebene „Floridin-Methode“ nachzuarbeiten. Nach diesen Autoren soll Cholesterin beim Erhitzen mit entsprechend vorbereitetem Floridin in Tetrachlorkohlenstoff als Primärprodukt 9.10-*seco*- $\Delta^5(10)$ -Cholestadienol-(3 $\beta$ ) (Ia, b) ergeben, das am Floridin unter der Einwirkung von Luftsauerstoff in ein Peroxyd (II) übergeht. Dieses soll bei der Behandlung mit Alkali ein antirachitisch wirksames Keton liefern, wahrscheinlich wohl 3 $\beta$ .10-Dihydroxy-9.10-*seco*- $\Delta^5$ -cholestenon-(7) (III) (auf Grund seines UV-Maximums bei 250m $\mu$  kurz „Keton 250“ genannt). „Keton 250“, das aus Thunfischlebertran<sup>7, 8</sup>



<sup>1</sup> XI. Mittel.: H. Dannenberg u. H.-H. Keller, Tetrahedron Letters [London] 1965, 1853.

<sup>2</sup> Y. Raoul, N. Le Boulch, A. Guerillot-Vinet, R. Dulou u. C. Baron, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 241, 1882 [1955].

<sup>3</sup> Y. Raoul, N. Le Boulch, C. Baron, J. Chopin u. A. Guerillot-Vinet, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 1265 [1954].

<sup>4</sup> Y. Raoul, N. Le Boulch, J. Chopin, P. Meunier u. A. Guerillot-Vinet, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 237, 439 [1953].

<sup>5</sup> C. Baron, Ann. Chimie (13) 1, 897 [1956].

<sup>6</sup> C. Baron u. N. Le Boulch, Bull. Soc. chim. France 1958, 300.

<sup>7</sup> Y. Raoul, N. Le Boulch, J. Chopin, P. Meunier u. A. Guerillot-Vinet, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 235, 1704 [1952].

<sup>8</sup> Y. Raoul, N. Le Boulch, C. Baron, R. Bazier u. A. Guerillot-Vinet, Bull. Soc. Chim. biol. 38, 495 [1956].

und verschiedenen Pflanzen<sup>4,9</sup> isoliert worden ist, soll sich auch aus Vitamin D<sub>3</sub>, das aus Thunfischlebertran gewonnen wurde (nicht aber aus synthetischem Vitamin D<sub>3</sub><sup>10</sup>) durch Behandlung mit Floridin und anschließende Einwirkung von Alkali bilden<sup>5, 11</sup>.

Irmscher und Mitarbeiter<sup>12</sup> konnten mit dem von ihnen verwendeten Floridin „Keton 250“ (III) weder aus Cholesterin noch aus (synthetischem) Vitamin D<sub>3</sub> erhalten. Auch unsere Versuche mit Cholesterin verliefen negativ, wobei wir handelsübliche Floridine verschiedener Korngröße (Florex XXS wie die französischen Autoren und Irmscher et al. und Floridin XXF) verwendeten, die durch einstündiges Erhitzen auf 280<sup>0</sup><sup>6</sup> aktiviert worden waren. Trotz weitgehender Fraktionierung des Reaktionsgemisches durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxyd und Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel und Charakterisierung der einzelnen Fraktionen durch ihre UV-Spektren konnten wir in entsprechend durchgeführten Ansätzen weder 9.10-*seco*-Δ<sup>5(10)</sup>-6-Cholestadienol-(3β) (Ia, b) noch „Keton 250“ (III) erhalten bzw. nachweisen; letzteres auch nicht als 2.4-Dinitro-phenylhydrazon<sup>13</sup>.

Um zu entscheiden, ob bei den von uns durchgeführten Ansätzen überhaupt 9.10-*seco*-Steroide entstanden waren, haben wir ein Verfahren ausgearbeitet, mit dem sich zumindest beim Cholesterin (und ähnlichen Sterinen) geringe Mengen an 9.10-*seco*-Steroiden neben viel Anteilen von Verbindungen mit intaktem Sterinskelett nachweisen lassen sollten. Grundlage dieser Methode sind die Dehydrierung der Reaktionsprodukte mit Chloranil in siedendem Anisol und die anschließende Ozon-Spaltung der Dehydrierungskohlenwasserstoffe. Während die Chloranil-Dehydrierung von Steroiden mit intaktem Steroidskelett Kohlenwasserstoffe vom Typ des 17H-Cyclopenta[*a*]phenanthrens (z. B. IV) liefert<sup>14-17</sup>, entstehen aus 9.10-*seco*-Steroiden wie Vitamin D<sub>3</sub> dabei Styryl-inden-Derivate<sup>18</sup> (z. B. VI).

Kohlenwasserstoffe vom Typ IV werden von Ozon (und auch Osmiumtetroxyd) bevorzugt an der im Fünfring gelegenen Doppelbindung angegriffen<sup>14</sup>, weitere Oxydation würde zur Dicarbonsäure V führen (aber auch bei einem Angriff an der 9.10-Doppelbindung des

<sup>9</sup> Y. Raoul, N. Le Boulch, C. Baron, R. Bazier u. A. Guerillot-Vinet, Bull. Soc. Chim. biol. **38**, 885 [1956].

<sup>10</sup> Y. Raoul u. N. Le Boulch, Bull. Soc. Chim. biol. **45**, 145 [1963].

<sup>11</sup> C. Baron, N. Le Boulch u. Y. Raoul, Bull. Soc. chim. France **1955**, 948.

<sup>12</sup> K. Irmscher, H.-D. Wirts u. W. v. Daehne, diese Z. **317**, 49 [1959].

<sup>13</sup> Diese Versuche sind ausführlich beschrieben in der Dissertation von K.-F. Hebenbrock, München 1964.

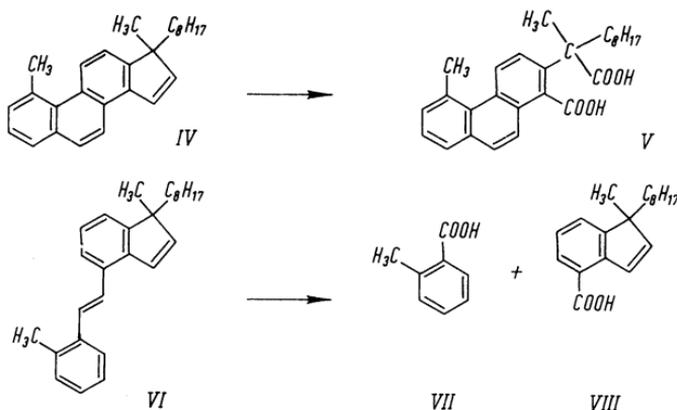
<sup>14</sup> H. Dannenberg u. H.-G. Neumann, Chem. Ber. **94**, 3085 [1961].

<sup>15</sup> H. Dannenberg u. H.-G. Neumann, Chem. Ber. **94**, 3094 [1961].

<sup>16</sup> H. Dannenberg, H.-G. Neumann u. D. Dannenberg-von Dresler, Liebigs Ann. Chem. **674**, 152 [1964].

<sup>17</sup> H. Dannenberg u. H.-G. Neumann, Liebigs Ann. Chem. **675**, 109 [1964].

<sup>18</sup> H. Dannenberg u. K.-F. Hebenbrock, Liebigs Ann. Chem. **662**, 21 [1963].



Phenanthren-Systems würde eine Dicarbonsäure entstehen). Kohlenwasserstoffe vom Typ VI werden dagegen vor allem an der Stilben-Doppelbindung angegriffen<sup>18</sup> und liefern *o*-Tolylsäure (VII) und voraussichtlich die Indencarbonsäure VIII bzw. weitere Oxydationsprodukte dieser Säure (Oxydation mit Osmiumtetroxyd und anschließende Bleitetraacetat-Spaltung liefert *o*-Tolylaldehyd und den VIII entsprechenden Aldehyd<sup>18</sup>). Die Ausbeute an *o*-Tolylsäure aus dem Styryl-inden VI beträgt 56% oder bezogen auf Vitamin D<sub>3</sub> 14% d. Theorie. *o*-Tolylsäure (VII) kann von Dicarbonsäuren (z. B. V) durch Ionenaustausch-Chromatographie an Ecteola-Cellulose sehr gut abgetrennt und quantitativ bestimmt werden.

Im Hinblick auf die Chloranil-Dehydrierung sei auf die Reaktionsprodukte eingegangen, mit denen bei der Floridin-Reaktion zu rechnen ist. Nach Baron und Le Boulch<sup>6</sup> sollten sich aus Cholesterin bei entsprechender Durchführung der Reaktion bilden: etwa 50% Dicholesteryläther, etwa 40% 9.10-*seco*- $\Delta^{5(10)}$ -Cholestadienol-(3 $\beta$ ) (Ia, b), etwas Peroxyd III und etwas  $\Delta^{3.5}$ -Cholestadien (Cholesterylen). Wir haben nach der gleichen Vorschrift erhalten: 65% Dicholesteryläther, 5% Cholesterin, 5%  $\Delta^{3.5}$ -Cholestadien, 1,5% einer Fraktion, welche dem UV-Spektrum nach aus  $\Delta^4$ -Cholestenon-(3) (vgl. auch l. c.<sup>12</sup>) und  $\Delta^{4.6}$ -Cholestadienon-(3) besteht, und ölige nicht zuzuordnende Fraktionen<sup>13</sup>. Die Dehydrierung von Steroiden mit Chloranil zu Kohlenwasserstoffen vom Typ IV läßt sich nach unseren Erfahrungen sicher durchführen mit Steroidalkoholen und Steroiden mit mindestens einer Doppelbindung<sup>17</sup>, bei Steroidketonen wie  $\Delta^4$ -Cholestenon-(3) scheinen keine Verbindungen vom Typ IV zu entstehen; das Verhalten von Äthern und Peroxyden ist noch nicht bekannt. Es schien uns daher wichtig, Ketone und Peroxyde vor der Chloranil-Dehydrierung in Alkohole überzuführen, wozu sich nach Untersuchung an Modellverbindungen (s. u.) die Reduktion mit Lithiumalanat in Pyridin<sup>19</sup> als brauchbar erwies.

<sup>19</sup> P. T. Lansbury, J. Amer. chem. Soc. **83**, 429 [1961].

## Nachweisverfahren

Die Umsetzung von gereinigtem Cholesterin (keine UV-Absorption oberhalb  $220\text{ m}\mu$ ) mit aktiviertem Floridin in Tetrachlorkohlenstoff erfolgte nach l. c.<sup>6</sup>. Dann wurde folgender Weg eingeschlagen:

1. Reduktion der vereinigten getrockneten Rückstände der abfiltrierten Reaktionslösung und der Äther- und Aceton-Extrakte der violett roten Erde mit Lithiumalanat in Pyridin-Lösung (zur Reduktion von gebildeten Peroxyden und Ketonen).

2. Dehydrierung des Reduktionsproduktes mit Chloranil in siedendem Anisol und Abtrennung der Kohlenwasserstoff-Fraktion durch Chromatographie an Aluminiumoxyd (Elution mit Benzin).

3. Umsetzung der Kohlenwasserstoff-Fraktion mit Ozon (in Benzin-Lösung) und anschließende Oxydation mit Silberoxyd in verdünnter Natronlauge\*.

4. Abtrennung der *o*-Tolylsäure durch Chromatographie der Carbonsäure-Fraktion an Ecteola-Cellulose (Elution mit Wasser-Ameisensäure nach der Gradienten-Methode); Nachweis und quantitative Bestimmung der *o*-Tolylsäure durch Auswertung des UV-Spektrums entsprechender Fraktionen.

## Ergebnis

In vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen mit jeweils 10 g Cholesterin haben wir keine *o*-Tolylsäure (VII) nachweisen können (eine geringe Fraktion an der Stelle des Chromatogramms, s. Abb. 1 (S. 205), an welcher sich *o*-Tolylsäure befinden sollte, zeigte nicht das UV-Spektrum von *o*-Tolylsäure).

Wie sich aus den Grenzen des Nachweisverfahrens ergibt (s. u.), können unsere Floridin-Ansätze nur weniger als 10 mg 9.10-*seco*-Steroide (weniger als 0,1% bezogen auf Cholesterin) enthalten haben.

## Einwände zum Nachweisverfahren und ihre Entkräftung

a) Da die Reduktion mit Lithiumalanat in Pyridin<sup>19</sup> bisher weder auf Steroidperoxyde noch auf Steroidketone angewendet worden ist, wurde sie an Modellsubstanzen, und zwar an Ergosterinperoxyd und an  $\Delta^4$ -Cholestenon-(3) durchgeführt.

Die Reduktion von Ergosterinperoxyd<sup>20, 21</sup> (IX) nach dieser Methode\*\* liefert in einer Ausbeute von 30% das von Windaus und

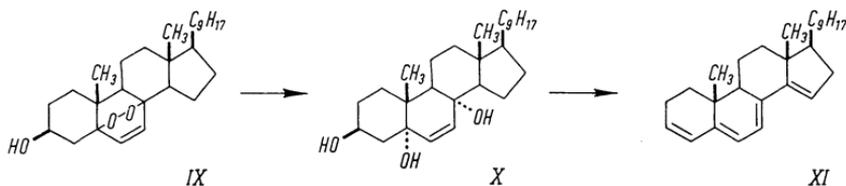
\* Wir haben auch an Stelle der oxydativen Spaltung mit Ozon/Silberoxyd zu Carbonsäuren diejenige mit Osmiumtetroxyd/Bleitetraacetat zu Aldehyden untersucht, um evtl. entstandenen *o*-Tolylaldehyd als 2.4-Dinitro-phenylhydrazon abzutrennen und quantitativ zu bestimmen; diese Methode lieferte aber keine befriedigenden Resultate, s. l. c.<sup>13</sup>.

\*\* Die Reduktion mit Lithiumalanat in Äther (Reaktionszeit 1 bzw. 8 Stdn.) liefert unbefriedigende Ergebnisse; nach der Aufarbeitung erhält man noch größere Anteile an Ausgangsmaterial.

<sup>20</sup> A. Windaus u. J. Brunken, Liebigs Ann. Chem. **460**, 225 [1928].

<sup>21</sup> L. F. Fieser u. M. Fieser, Chemistry of Natural Products Related to Phenanthrene, 1. Auflage, Chapman & Hall, London, New York 1936.

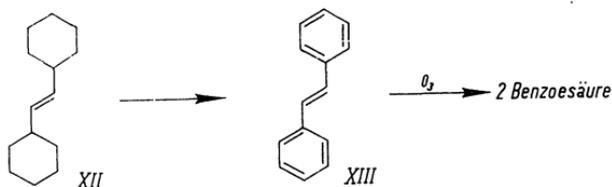
Mitarbeitern<sup>22</sup> durch Behandlung mit Zink in äthanolischer Kalilauge erhaltene „Ergostadienriol I“ (X), wenn der Reaktionsansatz auf Eis gegossen und ausgeäthert wird und das Pyridin dann aus der ätherischen Lösung durch Ausschütteln mit verd. Salzsäure entfernt wird. Gibt man jedoch den Reaktionsansatz in eisgekühlte verd. Salzsäure und arbeitet



dann auf, so erhält man in einer Ausbeute von 17% eine Verbindung vom Schmp. 257°, die auf Grund von  $R_F$ -Wert, optischer Drehung, UV- und IR-Spektrum mit X isomer sein dürfte. Beide Verbindungen ergeben beim Erhitzen mit Salzsäure-Äthanol eine sehr unbeständige Verbindung mit UV-Maxima oberhalb von 300 m $\mu$  bei (330), 340 und (355) m $\mu$ , die wir für  $\Delta^{3.5.7.14.22}$ -Ergostapentaen (XI) halten\*. Die Chloranil-Dehydrierung von X liefert in einer Ausbeute von etwa 10% eine Kohlenwasserstoff-Fraktion vom Typ IV, wie sie auch bei der Dehydrierung von Ergosterin erhalten wird.

Die Reduktion von  $\Delta^4$ -Cholestenon-(3) mit Lithiumalanat in Pyridin ergibt zu 64% ein Gemisch von  $\Delta^4$ -Cholestenol-(3 $\beta$ ) und  $\Delta^4$ -Cholestenol-(3 $\alpha$ ), ferner ein Gemisch von Cholestadienen und eine Verbindung, die wir auf Grund ihrer IR- und KMR-Spektren für Bis- $[\Delta^4$ -cholestenyl-(3)]-äther halten. Die beiden Alkohole und die Diene sollten sich auf Grund unserer Erfahrungen<sup>16, 17</sup> zu Kohlenwasserstoffen vom Typ IV dehydrieren lassen.

b) Da bisher nur das 9.10-*seco*-Steroid Vitamin D<sub>3</sub> (drei Doppelbindungen und eine als potentielle Doppelbindung zu betrachtende alkoholische Hydroxylgruppe) mit Chloranil zu einem Styryl-inden-



Derivat bzw. Stilben-Derivat dehydriert worden ist, war sicherzustellen, daß auch ein hydroaromatisches System mit nur einer Doppelbindung

\* Ein Kohlenwasserstoff mit gleichem UV-Spektrum entsteht auch bei der Dehydrierung von 7-Dehydro-cholesterin mit Chloranil (Molverhältnis 1:1) in einer Ausbeute von 70%.

<sup>22</sup> A. Windaus u. O. Linsert, Liebigs Ann. Chem. **465**, 148 [1928]; A. Windaus, W. Bergmann u. A. Lüttringhaus, ebenda **472**, 195 [1929].

unter diesen Bedingungen dehydriert wird. Die Modellsubstanz *trans*-1.2-Dicyclohexyl-äthyl-*en* (XII) ergibt bei der Dehydrierung mit Chloranil in einer Ausbeute von 35% *trans*-Stilben (XIII), dessen Behandlung wie im Nachweisverfahren mit Ozon und alkalischem Silberoxyd zu 83% Benzoesäure (29% d. Th. bezogen auf XII) liefert.

Die Darstellung von XII erfolgte durch Pyrolyse von 1.2-Dicyclohexyl-äthanol-stearat. Die *trans*-Konfiguration von XII ergibt sich aus dem IR-Spektrum ( $\gamma$ -Schwingungsbande bei 10,33  $\mu$ ) und KMR-Spektrum (Quartett bei 5,25 ppm und  $J = 3,5$  und 1,5 Hz).

c) Eine wesentliche Stufe des Nachweisverfahrens ist die Abtrennung von *o*-Tolylsäure aus dem Carbonsäure-Gemisch und ihre quantitative Bestimmung. Die dafür verwendete Ionenaustausch-Chromatographie an Ecteola-Cellulose ist im Versuchsteil beschrieben. Die Retentionsvolumina für *o*-Tolylsäure verschiedener Chromatographien sind an der gleichen Säule konstant. An einer 20 g Ecteola-Säule chromatographiert, läßt sich noch 1 mg *o*-Tolylsäure sehr gut als scharfe Zone nachweisen. Man kann *o*-Tolylsäure nicht nur in wäßriger Lösung, sondern auch als Ammoniumsalz oder in einer Neutralsalz-Lösung auf die Säule auftragen. In letzteren beiden Fällen sind die Retentionsvolumina gegenüber der Auftragung in wäßriger Lösung um einen konstanten Betrag verringert. Diese Verringerung ist unabhängig von der Konzentration des Salzes. Ist diese jedoch zu hoch, so wird ein Teil der *o*-Tolylsäure bei der Elution bereits in den allerersten Fraktionen gefunden, d. h. es hat praktisch keine Adsorption stattgefunden. Durch entsprechende Verdünnung läßt sich dieser Effekt aber ausschalten. Die Konzentration, mit welcher *o*-Tolylsäure oder ihr Ammoniumsalz auf die Säule gegeben wird, kann zwischen 1 mg/1 ml und 1 mg/125 ml variieren. Unter den angewendeten Bedingungen läßt sich ein Gemisch der Mono-, Di- bzw. Tricarbonsäuren *o*-Tolylsäure, Phthalsäure und Hemimellithsäure glatt voneinander trennen.

Gebildete *o*-Tolylsäure läßt sich bei dieser Chromatographie sicher auffinden. Um dieses zu beweisen, wurde die Carbonsäure-Fraktion, die aus einem Cholesterin-Floridin-Ansatz durch Dehydrierung und Ozonisierung erhalten worden war, halbiert. Einer Hälfte wurden 4 mg *o*-Tolylsäure zugesetzt. Diese ließen sich in den erwarteten Fraktionen der Ecteola-Chromatographie quantitativ wiederfinden, während in der anderen Hälfte bei der Chromatographie keine *o*-Tolylsäure gefunden wurde.

d) Um die Wirksamkeit des Verfahrens zu prüfen, haben wir eine Mischung von 4,950g Cholesterin und 0,050g der 9.10-*seco*-Verbindung Vitamin D<sub>3</sub> (Verhältnis 99:1) eingesetzt. In zwei voneinander unabhängigen Versuchen betrug die Ausbeute an *o*-Tolylsäure (mehrfache Rechromatographie an Ecteola) 7,8 bzw. 8,0 mg entsprechend 45% d. Th. bezogen auf das zugesetzte Vitamin D<sub>3</sub>; Elutionsdiagramm für einen Versuch s. Abb. 2.

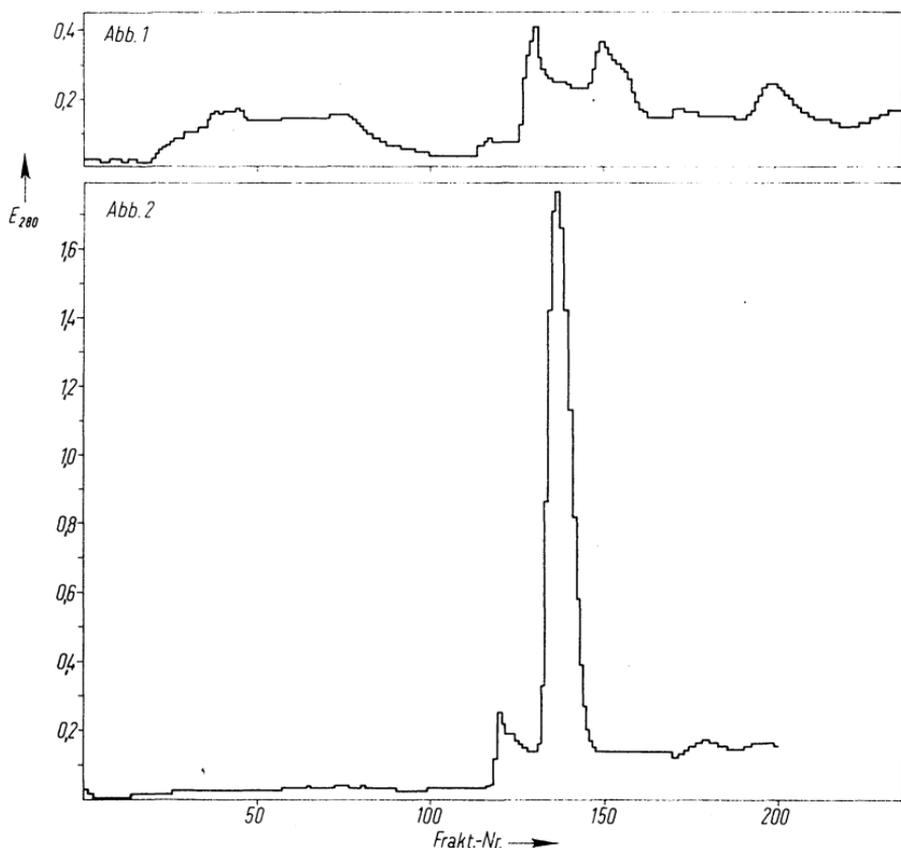


Abb. 1 und 2. Ecteola-Chromatographie. Elutionsdiagramm der im Nachweisverfahren erhaltenen Säurefraktion zur Bestimmung von *o*-Tolylsäure. Ordinate: Extinktion der Fraktionen bei 280 m $\mu$ .

Abb. 1. Aus einer Floridin-Reaktion von 10 g Cholesterin (Text s. S. 202).

Abb. 2: Aus einem Gemisch von 4,95 g Cholesterin und 0,05 g Vitamin D<sub>3</sub>.

Hierbei ist die Ausbeute an *o*-Tolylsäure sogar noch höher, als nach den Ergebnissen der Chloranil-Dehydrierung von Vitamin D<sub>3</sub> zu erwarten ist. Der Grund dafür ist wohl, daß *o*-Tolylsäure bereits bei der Ozonisierung einer Verbindung entstehen kann, welche nur ein Styrol-System enthält. Ein solches (aromatischer Ring A und 6.7-Doppelbindung) kann sich aber beim Vitamin D<sub>3</sub> bereits ohne Dehydrierung allein durch Dehydratisierung und Wanderung der vorhandenen Doppelbindungen bilden.

#### Grenze der Nachweismethode

Über die Nachweisgrenze für 9.10-*seco*-Steroide bei der verwendeten Methode (s. S. 201) lassen sich folgende Aussagen machen:

Stufe 1: Ausbeute an dehydrierbaren Verbindungen aus Peroxyden und Ketonen nach den Modellversuchen an Ergosterinperoxyd und  $\Delta^4$ -Cholestenon-(3) etwa 80%.

Stufe 2: Nach den Ergebnissen der Dehydrierung von Vitamin D<sub>3</sub> (etwa 25%) und *trans*-1.2-Dicyclohexyl-äthylen (etwa 35%) dürfte die Ausbeute an Styryl- oder Stilben-Verbindungen aus vorhandenen 9.10-*seco*-Steroiden bei der Chloranil-Dehydrierung etwa 25% betragen.

Stufe 3: Die Ozonisierung und Oxydation von Styryl-inden (VI) zu *o*-Tolylsäure (VII) verläuft zu 56% d. Th., diejenige von *trans*-Stilben zu Benzoesäure zu 83%. Für diese Stufe kann als Ausbeute daher mindestens 56% angesetzt werden.

Stufe 4: Bei der Chromatographie an Ecteola-Cellulose ist sicher noch 1 mg *o*-Tolylsäure nachweisbar (s. Abb. 2).

Da 1 mg *o*-Tolylsäure theoretisch 2,8 mg 9.10-*seco*-Steroid entspricht, liegt die Nachweisgrenze des Verfahrens unter Berücksichtigung einer Gesamtausbeute von 11% für die Stufen 1–3 bei etwa 0,25% 9.10-*seco*-Steroid (bezogen auf einen Floridin-Ansatz von 10 g Cholesterin). Im Modellversuch Cholesterin/Vitamin D<sub>3</sub> (99:1) betrug die Ausbeute der Stufen 2 + 3 jedoch 45%; bei Einbeziehung der Ausbeute von 80% für die Stufe 1 wäre das sogar eine Gesamtausbeute von 36% für die Stufen 1–3. Wahrscheinlich dürfte dieser Wert den tatsächlichen Verhältnissen besser entsprechen und die Nachweisgrenze der Methode für 9.10-*seco*-Steroide demnach um 0,1% liegen (bei Durchführung eines Floridin-Ansatzes mit 10 g Cholesterin).

Da *o*-Tolylsäure nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, können sich bei der Cholesterin-Floridin-Reaktion mit dem von uns verwendeten Floridin nur weniger als 0,1% 9.10-*seco*-Steroid gebildet haben.

Nach Baron und Le Boulch<sup>6</sup> soll die zu 9.10-*seco*-Steroiden führende Öffnung des Ringsystems des Cholesterins bei der „Floridin-Reaktion“ auf die Aktivierung der 9.10-Bindung durch die allylständige  $\Delta^5$ -Doppelbindung beruhen. Wenn dieses zutrifft, sollte diese Reaktion leichter verlaufen bei  $\Delta^{5.7}$ -Dien-steroiden, bei welchen die 9.10-Bindung durch eine weitere allylständige Doppelbindung noch stärker aktiviert ist (vgl. die photochemische Bildung von 9.10-*seco*-Steroiden aus  $\Delta^{5.7}$ -Dien-steroiden). Wir führten daher die Floridin-Reaktion auch mit 7-Dehydro-cholesterin und mit Ergosterin durch. In beiden Fällen ließ sich nach unserer Methode keine *o*-Tolylsäure nachweisen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß wir die Ergebnisse der französischen Autoren mit dem von uns verwendeten Floridin nicht bestätigen konnten. Möglicherweise sind aber auch andere, aus ihren Arbeiten nicht ersichtliche Faktoren die Ursache für die Diskrepanz (vgl. auch l. c.<sup>12</sup>).

Wir danken Fräulein I. Ehrhardt, Fräulein I. Köhler und Fräulein Ch. Poppe sowie Fräulein G. Schild für die Aufnahme der UV-, IR- bzw. KMR-Spektren. 7-Dehydro-cholesterin und Vitamin D<sub>3</sub> wurden uns von der Firma E. Merck AG, Darmstadt, zur Verfügung gestellt, wofür wir besonders danken.

### Beschreibung der Versuche

Die UV-Spektren wurden mit dem selbstregistrierenden Beckman-Spektrophotometer (Modell DK-2) gemessen, die IR-Spektren mit dem selbstregistrierenden Perkin-Elmer-Spektrophotometer (Modell 21), die Kernresonanzspektren mit dem selbstregistrierenden Varian-Modell A 60 (Bezugssubstanz Tetramethyl-silan).

Die Mikroanalysen wurden von Dr. A. Schoeller, Kronach/Ofr., ausgeführt. Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

**Cholesterin:** Die Reinigung von käuflichem Cholesterin (Merck) erfolgte durch Chromatographie in Chloroform-Lösung an Kieselgel. Die dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen wurden einzeln aus Chloroform-Methanol umkristallisiert (Schmp. 147°). Das Produkt war frei von oberhalb 220 m $\mu$  absorbierenden Verunreinigungen.

**Floridin** ist ein Tonmineral mit saurer Oberfläche<sup>23</sup>; auf letztere wird die katalytische Wirkung dieser Erde zurückgeführt. Der Handelsname ist Florex, wobei die Zusätze XXS und XXF die Korngröße bezeichnen. Das Material (bezogen von der Firma Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde im Trockenschrank langsam auf 280° erhitzt und 1 Stde. bei dieser Temperatur belassen. Nach langsamem Abkühlen auf etwa 140° wurde es in einen mit CaCl<sub>2</sub>-beschickten Exsikkator übergeführt und nach vollständigem Erkalten sofort verwendet.

**Lösungsmittel:** Sämtliche verwendeten Lösungsmittel waren sorgfältig getrocknet und destilliert; Äther war zur Entfernung von Peroxyden vorher über SnCl<sub>2</sub>/KOH destilliert worden.

#### Verfahren zum Nachweis von 9.10-*seco*-Steroiden

a) In zwei gleichlaufenden Versuchen wurden 10 g Cholesterin mit 180 g bei 280° aktiviertem Floridin in 3 l CCl<sub>4</sub> 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abdekantiert und die Erde 5mal mit je 500 ml Aceton, dann im Soxhlet mit 1 l Äther mehrfach extrahiert.

1. Der gründlich getrocknete Rückstand der Reaktionslösung sowie der Extrakte (10,96 g bzw. 10,78 g) wurde in 150 ml Pyridin (über BaO getrocknet) gelöst und zu der Lösung unter Kühlung 2 g LiAlH<sub>4</sub> in mehreren Portionen gegeben. Nach 20 Stdn. wurde die Reaktionslösung mit Eis zersetzt, mit HCl neutralisiert und mit 2 l Äther extrahiert. Die Ätherlösung wurde bis zur Entfernung des Pyridins mit verd. HCl gewaschen, dann mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und destilliert.

2. Der Rückstand (9,37 g bzw. 9,78 g) wurde mit 50 g (umkristallisiertem) Chloranil in 300 ml Anisol 3 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Eindunsten des Lösungsmittels im Vak. wurde der Rückstand 4mal mit je 250 ml Benzin (Sdp. 60—70°) unter Erwärmen extrahiert. Die Lösung wurde auf 50 ml eingeeengt und an 200 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert. Mit dem gleichen Lösungsmittel wurde so lange eluiert, bis die auslaufende Lösung keine Fluoreszenz mehr zeigte (4—5 l Benzin).

3. Zu der Lösung des Rückstandes des Benzineluates (1,24 g bzw. 1,49 g) in 100 ml Benzin (Sdp. 60—70°, dest. nach Ausschütteln mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wurden bei —15° 260 mg bzw. 330 mg Ozon (berechnet auf 2 Mol O<sub>3</sub> pro Mol Kohlenwasserstoff) eingeleitet. Nach Versetzen mit Wasser wurden nach einiger Zeit 0,66 g bzw. 0,94 g NaOH und 3,48 g bzw. 4,10 g Ag<sub>2</sub>O (je 4 Mol pro Mol Kohlenwasserstoff) zugegeben und nach 14stdg. Erhitzen auf dem Dampfbad das Benzin vorsichtig abdestilliert. Nach weiterem 5stdg. Sieden unter Rückfluß wurde die Lösung mit HNO<sub>3</sub> angesäuert und mit 500 ml Äther extrahiert. Die sauren Bestandteile wurden mit 5proz. NaOH ausgeschüttelt, die alkalische Lösung angesäuert und ausgeäthert. Die über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknete äther. Lösung hinterließ einen braunen Rückstand, welcher nach Trocknung über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und NaOH in 450 ml Wasser suspendiert wurde. (Die Löslichkeit von *o*-Tolylsäure in Wasser beträgt 143 mg/100 ml bei 22,5°).

<sup>23</sup> C. Walling, J. Amer. chem. Soc. **72**, 1164 [1950].

4. Die gelbe Lösung wurde filtriert und das Filtrat an der großen Ecteola-Säule (s. S. 211) chromatographiert. In Gradientenelution (0,1*n* HCO<sub>2</sub>H zu 750 cm<sup>3</sup> Wasser, s. S. 211) wurde in 10-ml-Fractionen unterteilt und von jeder Fraktion die Intensität auf Grund der UV-Absorption bei 280 mμ (Maximum von *o*-Tolylsäure: 278 mμ) bestimmt. Die erhaltenen Zonen beider Versuche waren klein und unscharf (s. Abb. 1). Sie wurden in 3 Gruppen zusammengefaßt:

1. Frakt. 21—95 2. Frakt. 96—167 3. Frakt. 168—218.

Die Lösungen 1—3 wurden getrennt mit Ammoniak neutralisiert und eingedunstet. Die Rückstände wurden mit Salzsäure versetzt und ausgeäthert, die äther. Lösungen nach Zusatz von einem Überschuß Ammoniak im Vak. zur Trockne gebracht. Die Rückstände wurden jeweils in 50 ml Wasser aufgenommen und an kleinen Ecteola-Säulen (s. S. 211) chromatographiert. In Gradientenelution wurden wiederum nur kleine unscharfe Zonen erhalten, in denen nach Auswertung ihrer UV-Spektren keine *o*-Tolylsäure (VII) mit Sicherheit nachzuweisen war.

b) Das Nachweisverfahren wurde in einem erneuten Versuch mit 10 g Cholesterin in folgenden Punkten geändert:

zu 1. Die Extraktion der Erde erfolgte je 15mal mit Äther und Aceton im Soxhlet.

zu 3. Ozonisierung des Benzineluates (Rückst. 3,515 g): 920 mg O<sub>3</sub> und Oxydation: 10 g Ag<sub>2</sub>O/1,6 g NaOH. Eindunsten der äther. Lösung der Carbonsäuren unter Zusatz von einem Überschuß Ammoniak. Der Rückstand wurde in 500 ml Wasser gelöst (fast vollständige Lösung) an der großen Ecteola-Säule chromatographiert. Die mehrfache Rechromatographie der in Gruppen unterteilten Eluate führte nicht zum Nachweis von *o*-Tolylsäure.

c) In einem weiteren Versuch mit 10 g Cholesterin wurde folgendermaßen verfahren (Extraktion nach b):

zu 2. Chromatographie des Benzinextraktes an 150 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; Elution mit 3 l Benzin (Sdp. 60—70°): Rückstand 1,727 g.

zu 3. Ozonisierung: 505 mg Ozon, anschließende Oxydation mit 6 g Ag<sub>2</sub>O/1 g NaOH.

zu 4. Die Carbonsäure-Lösung wurde vor der Chromatographie geteilt, wobei der einen Hälfte 4 mg *o*-Tolylsäure (VII) zugesetzt wurde. Jede Lösung wurde an der großen Ecteola-Säule (s. S. 211) chromatographiert. Die Fractionen 121—136 (Retentionsvolumen 65) der mit *o*-Tolylsäure versetzten Hälfte enthielten *o*-Tolylsäure, die durch 3fache Rechromatographie gereinigt wurde. In den entsprechenden Fractionen der anderen Hälfte konnte auch nach mehrfacher Rechromatographie keine *o*-Tolylsäure durch ihr UV-Spektrum nachgewiesen werden.

#### Reduktion von Ergosterinperoxyd

a) Eine Lösung von 1 g Ergosterinperoxyd (IX) (dargestellt nach l. c.<sup>20</sup> durch Bestrahlung von Ergosterin in Äthanol im Sonnenlicht) in 50 ml Pyridin (getrocknet über BaO) wurde mit 500 mg LiAlH<sub>4</sub> unter Kühlung versetzt, wobei geringe Gasentwicklung und schwache Selbsterwärmung auftrat. Am folgenden Tag wurde die graugrüne Lösung auf Eis gegossen, ausgeäthert und die Ätherlösung mit verd. HCl bis zur Entfernung des Pyridins geschüttelt. Nach dem Eindunsten des Äthers wurde der ölige Rückstand mit Benzin/Äthanol verrieben und die weißen Kristalle aus Äthanol/Aceton mehrfach umkristallisiert. Ausb. 300 mg „Ergostadienriol I“ (X) vom Schmp. 170—180°. Mischprobe mit dem nach l. c.<sup>22</sup> dargestellten Ergostadienriol (Schmp. 175—180°) zeigte keine Depression.

$R_F$ : 0,25 (Chloroform + 5% Methanol).  $[\alpha]_D^{25}$ : — 16,8 (Pyridin) (Lit.:  $[\alpha]_D^{25}$ : — 13,3 angegeben, 15,4 gefunden für ein nach l. c.<sup>22</sup> dargestelltes Präparat).

C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub> (430,6) Ber. C 78,08 H 10,76 Gef. C 77,86 H 10,83

IR-Spektrum (fest in KBr):  $\nu_{OH}$  3,03 μ,  $\nu_{C-O}$  8,70 μ, 9,57 μ, 9,80 μ, 10,20 μ;  $\nu_{HC=CH}$  (trans) 10,40 μ,  $\nu_{HC=CH}$  (cis): 12,05 μ.

b) Eine Lösung von 500 mg Ergosterinperoxyd in 20 ml Pyridin (getrocknet über BaO) wurde mit 200 mg  $\text{LiAlH}_4$  unter Kühlung versetzt. Am anderen Tage wurde diese Lösung in eisgekühlte verd. HCl gegeben und ausgeäthert. Die Ätherlösung wurde neutral gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, eingedunstet und der Rückstand an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  mit Chloroform chromatographiert; als einzige krist. Fraktion wurden mit Chloroform/Methanol 85 mg eines Stoffes vom Schmp.  $257^\circ$  (aus Chloroform/Methanol) eluiert (isomeres  $\Delta^{6-22}$ -Ergostadienatriol-(3,5,8) ?).

$R_F$ : 0,14 (Chloroform + 5% Methanol).  $[\alpha]_D^{25}$ : — 60,8 (Pyridin). IR-Spektrum (fest in KBr):  $\nu_{\text{OH}}$  2,95  $\mu$ ;  $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  6,0  $\mu$ ;  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$  8,60  $\mu$ , 9,50  $\mu$ , 9,70  $\mu$ ;  $\gamma_{\text{HC}=\text{CH}}$  (trans) 10,32  $\mu$ .

c) Durch  $1/2$ stdg. Erhitzen auf dem Wasserbad beider vorstehend beschriebener Reduktionsprodukte des Ergosterinperoxyds mit äthanol. Salzsäure in einer Quarzküvette ( $d = 1$  cm), wie sie für die Messung von UV-Spektren verwendet wird, erfolgte Umwandlung in eine sehr unbeständige Verbindung, die  $\Delta^{3-5-7-14-22}$ -Ergostapentaen (XI) sein könnte. Das Spektrum wurde gleich von der Reaktionslösung in der Küvette aufgenommen.

UV-Spektrum (in Äthanol mit 2 Tropfen konz. HCl pro ml):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$  bezogen auf Einwaage der Ausgangsstoffe) 229 (11600), 237 (11800), 246 (14100), 255 (13600), (330) (18000), 340 (20200) und 355 (16000).

#### Dehydrierung von „Ergostadienatriol I“ mit Chloranil

a) 250 mg „Ergostadienatriol I“ (X) wurden mit 1 g Chloranil (Molverhältnis 1:7) in 15 ml Anisol 7 Stdn. zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung wurde im Vak. eingedunstet und der Rückstand 2mal mit 25 ml Benzin (Sdp.  $60-70^\circ$ ) unter Erwärmen extrahiert. Der Rückstand der vereinigten Auszüge wurde mit Benzin ( $60-70^\circ$ ) an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert, die im UV-Licht fluoreszierenden Zonen wurden vereinigt.

Rohausbeute: 18 mg Öl mit dem UV-Spektrum der Cyclopenta[*a*]phenanthren-Kohlenwasserstoffe vom Typ IV.

b) In einem zweiten Versuch wurde das aus 500 mg Ergosterinperoxyd erhaltene Reduktionsprodukt vom Schmp.  $257^\circ$  (s. o.) 3 Stdn. mit 2 g Chloranil (Molverhältnis 1:7) in 20 ml Anisol unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wurde wie oben aufgearbeitet.

Rohausbeute: 45 mg Öl mit dem UV-Spektrum der Cyclopenta[*a*]phenanthren-Kohlenwasserstoffe vom Typ IV.

#### Reduktion von $\Delta^4$ -Cholestenon-(3)

In eine Lösung von 1 g  $\Delta^4$ -Cholestenon-(3) in 50 ml Pyridin (getrocknet über BaO) wurden in mehreren Portionen 800 mg  $\text{LiAlH}_4$  eingetragen, bis die Lösung nicht mehr schäumte, wenn eine weitere kleine Portion zugefügt wurde. Nach Stehenlassen über Nacht wurde die Lösung auf Eis gegeben, mit HCl angesäuert und ausgeäthert. Die farblose Ätherlösung wurde gewaschen und mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Die Chromatographie einer Lösung des Rückstandes (910 mg) in Chloroform an 50 g Kieselgel ergab drei Hauptfraktionen:

a) Aus einer Mischung mit verschiedenen Cholestadienen [UV-Spektrum (in Äthanol):  $\lambda_{\text{max}}$  237 (und 282  $m\mu$ )] konnte durch Umkristallisation eine einheitliche Verbindung isoliert werden, die wahrscheinlich Bis- $[\Delta^4\text{-cholestenyl-(3)}]$ -äther ist. Schmp.  $165^\circ$  aus Chloroform/Äthanol;  $R_F$  (Chloroform): 0,8.

IR-Spektrum (fest in KBr):  $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  6,05  $\mu$ ,  $\nu_{\text{C}=\text{O}}$  9,50  $\mu$ . KMR-Spektrum (in  $\text{CCl}_4$ ): Singulets bei 0,64 ppm ( $\text{CH}_3$  an C-13) und 0,91 ppm ( $\text{CH}_3$  an C-10), Doublett bei 0,85 ppm ( $J = 6$  Hz) ( $\text{CH}_3$ -Gruppen an C-25), Gruppe von Signalen bei 3,75 ppm ( $-\text{O}-\text{C}-\text{H}$ -Gruppierung) und 5,25 ppm (Protonen an der Doppelbindung). Es ist kein Signal gegen  $\text{D}_2\text{O}$  austauschbar.

b)  $\Delta^4$ -Cholestenol-(3 $\alpha$ ): Schmp. 75°, Ausb. 243 mg aus Aceton/Wasser,  $R_F$  (Chloroform): 0,65,  $[\alpha]_D^{23}$ : +111,7° (Benzol); Lit.<sup>24</sup>: Schmp. 84°,  $[\alpha]_D^{24}$ : +120,8° (Benzol).

IR-Spektrum (als Film):  $\nu_{OH}$  3,05  $\mu$ ,  $\nu_{C=C}$  6,05,  $\nu_{C-O}$  9,20, 9,55, 9,85  $\mu$ . KMR-Spektrum (in  $CCl_4$ ): Singulets bei 0,67 ppm ( $CH_3$  an C-13) und 0,96 ppm ( $CH_3$  an C-10), Doublett bei 0,87 ppm ( $J = 6$  Hz), ( $CH_3$ -Gruppen an C-25), Gruppe von Signalen bei 3,92 ppm (HO—C—H-Gruppierung), Doublett bei 5,35 ppm ( $J = 5$  Hz) (Protonen an Doppelbindung); die Kopplungskonstante des zuletzt aufgeführten Doubletts deutet auf axial ständiges OH in Position 3, es ist ein Proton gegen D austauschbar (2,12 ppm).

c)  $\Delta^4$ -Cholestenol-(3 $\beta$ ): Schmp. 135° aus Aceton, Ausb. 400 mg,  $R_F$  (Chloroform): 0,42,  $[\alpha]_D^{23}$ : +49,4° (Benzol), in der Lit.<sup>24</sup> werden 132° und  $[\alpha]_D^{25}$ : +44° angegeben.

IR-Spektrum (fest in KBr):  $\nu_{OH}$  3,05  $\mu$ ,  $\nu_{C=C}$  6,05  $\mu$ ,  $\nu_{C-O}$  9,75  $\mu$ . KMR-Spektrum (in  $CCl_4$ ): Singulets bei 0,67 ppm ( $CH_3$  an C-13) und 1,03 ppm ( $CH_3$  an C-10), Doublett bei 0,87 ppm ( $J = 6$  Hz) ( $CH_3$ -Gruppen an C-25), Gruppe von Signalen bei 3,95 ppm (HO—C—H-Gruppierung) und Doublett bei 5,17 ppm ( $J = 2-3$  Hz). Die Kopplungskonstante dieser Protonen an der Doppelbindung, sowie die Lage der Methylgruppe an C-10 deuten auf äquatoriale Lage der OH-Gruppe an C-3. Es ist ein H gegen D austauschbar (um 1,85 ppm).

#### Darstellung, Dehydrierung und Ozonisierung von *trans*-1.2-Dicyclohexyl-äthylen (XII)

a) 1.2-Dicyclohexyl-äthanol: Die Darstellung erfolgt nach Venus-Danilowa<sup>25</sup> aus 10 g Cyclohexylmethanal (Fluka) und 20 g Cyclohexylmethyljodid, dargestellt nach l. c.<sup>26</sup>, in einer Ausbeute von 4 g (21,3% d. Th.). Schmp. 62° (aus Äther). Die Mutterlauge enthielt weitere Anteile.

b) 1.2-Dicyclohexyl-äthanol-stearat: 2 g 1.2-Dicyclohexyl-äthanol wurden mit 3 g Stearylchlorid (dargest. nach l. c.<sup>27</sup>) 3 Stdn. auf 120° erhitzt, wobei sich HCl entwickelte. Nach dem Erkalten wurde aus Methanol umkrist.: 3,7 g vom Schmp. 35° (81,5% d. Th.).

$R_F$ : 0,26 (Benzin vom Sdp. 60—70°).

$C_{32}H_{60}O_2$  (476,8) Ber. C 80,60 H 12,68 Gef. C 80,72 H 12,48

IR-Spektrum (fest in KBr):  $\nu_{C=O}$  5,76,  $\nu_{C-O}$  8,0, 8,55 und 10,24;  $\rho$  ( $CH_2$ )<sub>n</sub> 13,90  $\mu$ .

c) *trans*-1.2-Dicyclohexyl-äthylen (XII): 7,4 g 1.2-Dicyclohexyl-äthanol-stearat wurden auf dem Ölbad unter vermindertem Druck (etwa 200 Torr) auf 330—360° (Ölbad) erhitzt. Das Destillat wurde in Benzin (60—70°) gelöst und an  $Al_2O_3$  chromatographiert. Nach Vakuumdestillation des Eluats (2,4 g) wurden 1,58 g XII vom Schmp. 128—130°/10 Torr (53% d. Th.) erhalten.

$R_F$ : 0,75 (Benzin vom Sdp. 60—70°).

$C_{14}H_{24}$  (192,3) Ber. C 87,42 H 12,58 Gef. C 87,30 H 12,66

IR-Spektrum (als Film):  $\nu_{CH=HC(trans)}$  10,33  $\mu$ . KMR-Spektrum (in  $CCl_4$ ): Gruppen von Signalen bei 1,0—2,0 (cycloaliphatische Protonen), Quartett bei 5,25 ( $J = 3,5$  Hz und „long range“  $J = 1,5$  Hz): Protonen an Doppelbindung.

d) Dehydrierung von *trans*-1.2-Dicyclohexyl-äthylen (XII) mit Chloranil: 500 mg XII wurden mit 4,5 g Chloranil (Molverhältnis 1:7,3) in 20 ml Anisol 17 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Der Rückstand wurde im Vak. vom

<sup>24</sup> H. McKennis, jr. und G. W. Gaffney, J. biol. Chemistry **175**, 217 [1948].

<sup>25</sup> E. Venus-Danilowa, Ber. dtsh. chem. Ges. **61**, 1954 [1928].

<sup>26</sup> M. P. Freundler, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **142**, 344 [1906].

<sup>27</sup> R. Adams u. L. H. Ulich, J. Amer. chem. Soc. **42**, 599 [1920].

Lösungsmittel befreit, mit Benzin (Sdp. 60—70°) unter Erwärmen 3mal extrahiert (70 ml). Der Rückstand der vereinigten Auszüge wurde in Benzin (Sdp. 60—70°) gelöst an 20 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  chromatographiert und lieferte Stilben (XIII) vom Schmp. 124° (aus Äthanol). Mischprobe mit authent. Stilben: keine Depression.

Eine Probennahme nach jeder Stunde, Aufarbeitung wie oben, Chromatographie des Rückstandes an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  und Messung im UV-Spektrometer gestattete eine Ausbeutebestimmung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Ausbeute nach 1 Stde. etwa 30% Stilben, nach 17 Stdn. etwa 40% Stilben.

e) Ozonisierung von Stilben (XIII): In eine Lösung von 500 mg Stilben in 50 ml n-Hexan (mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ausgeschüttelt und anschließend destilliert) wurde bei  $-12^\circ$  Ozon bis zur Aufnahme von etwa 135 mg eingeleitet. Die Lösung wurde dann mit Wasser und nach einiger Zeit mit 1,6 g  $\text{Ag}_2\text{O}$  und 266 mg NaOH versetzt. Nach 3stdg. Erwärmen auf dem Dampfbad wurde das n-Hexan vorsichtig abdestilliert und die verbleibende Lösung weitere 3 Stdn. erhitzt. Nach Ansäuern mit konz.  $\text{HNO}_3$  wurde 5mal ausgeäthert (mit je 100 ml). Die Ätherlösung wurde mit 200 ml 5proz. NaOH geschüttelt, die alkal. Lösung angesäuert und ausgeäthert. Die nach dem Trocknen der Ätherlösung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Destillation verbleibende Benzoesäure wurde im Vak. über  $\text{P}_2\text{O}_5$  und NaOH getrocknet: Ausb. 83% d. Th., UV-Spektrum übereinstimmend mit demjenigen von authent. Material. Zwei weitere entsprechend durchgeführte Ansätze ergaben Ausbeuten von 83 und 86% d. Th.

#### Standardisierung der Ionenaustausch-Chromatographie an Ecteola

##### a) Bereitung der Chromatographiersäulen

90 g Ionenaustauscher „Ecteola“ (Firma Schleicher & Schüll) wurden mehrere Male in Wasser suspendiert; nach dem Absitzen der Hauptmenge wurde die obere, trübe Lösung vorsichtig dekantiert und so die feinsten Teilchen entfernt. Nach der Einschlammung in eine Chromatographiersäule (Durchm. 1,5 cm) wurde nacheinander mit Iproz. NaOH (etwa 400 ml), mit Wasser (etwa 500 ml), mit 5proz.  $\text{HCO}_2\text{H}$  (etwa 400 ml) und schließlich mit Wasser bis zur neutralen Reaktion (pH 5—6) gewaschen.

Ebenso, allerdings mit entsprechend verringerten Mengen an Waschlösungen, wurden auch mehrere kleinere Säulen mit etwa 15—20 g (Durchm. 1 cm) mit dem Ionenaustauscher bereitet.

Die Säulen wurden nach jeder Chromatographie auf die gleiche Weise reaktiviert. Sie zeigten selbst nach etwa 20 Chromatographien noch die gleiche Aktivität gegenüber *o*-Tolylsäure (VII).

##### b) Chromatographie von *o*-Tolylsäure, Phthalsäure und Hemimellithsäure

10,5 mg *o*-Tolylsäure (VII), 99 mg Phthalsäure und 102 mg Hemimellithsäure wurden in insgesamt 100 ml Wasser gelöst an Ecteola (90 g) chromatographiert. Nach Nachwaschen mit Wasser wurden durch Gradientenelution mit Wasser/ $\text{HCO}_2\text{H}$  (Vorlage 750 ml Wasser) 10-ml-Fractionen eluiert. Jede dieser Fractionen wurde im UV-Spektrometer bei 280  $\mu$  auf ihren Gehalt an absorbierender Substanz geprüft; die auf diese Weise erhaltenen Zonen wurden getrennt, evtl. eingedunstet und der Rückstand durch sein UV-Spektrum sowie Schmelzpunkt zugeordnet. Mit  $\text{HCO}_2\text{H}$  verschiedener Molarität wurden folgende Fractionen erhalten:

Fraktion	eluiert mit	Bemerkungen
1—44	Wasser	—
45—135	0,1 <i>m</i> $\text{HCO}_2\text{H}$	Fr. 121—137 enth. reine <i>o</i> -Tolylsäure
136—225	0,2 <i>m</i> $\text{HCO}_2\text{H}$	—
226—337	0,3 <i>m</i> $\text{HCO}_2\text{H}$	Fr. 227—285: reine Phthalsäure
338—377	1 <i>m</i> $\text{HCO}_2\text{H}$	Fr. 286—376: reine Hemimellithsäure

14\*

c) Standardisierung der Ionenaustausch-Chromatographie für *o*-Tolylsäure (VII)

Es wurden zwei Säulentypen verwendet: 1. eine große Säule mit etwa 90 g Ecteola (Trockengewicht); 2. mehrere kleine Säulen mit etwa 15–20 g Ecteola.

Der Gradient für die große Säule wurde durch Zutropfen von 0,1 *m* HCO<sub>2</sub>H zu 750 ml Wasser im geschlossenen Mischgefäß erhalten, der Gradient für die kleineren Säulen entsprechend durch Zutropfen von 0,1 *m* HCO<sub>2</sub>H zu 500 ml Wasser.

Die Retentionsvolumina wurden in Fraktionen vom Ende der Auftragung bzw. vom Anfang der Gradientenelution an bestimmt, wobei jede Fraktion etwa 10 ml betrug.

Für die große Säule wurden unter diesen Bedingungen bei Auftragung von *o*-Tolylsäure oder ihrem Ammoniumsalz Retentionsvolumina zwischen 70–90 gefunden, für die kleineren Säulen zwischen 15–35, wobei für jede einzelne Säule das Retentionsvolumen konstant war.

d) Anwendung des Nachweisverfahrens auf eine Mischung von Cholesterin mit Vitamin D<sub>3</sub>

1. 4,950 g Cholesterin (keine UV-Absorption oberhalb 220 *m*μ) und 0,050 g Vitamin D<sub>3</sub> (Merck) wurden mit 25 g Chloranil in 150 ml Anisol 3 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Eindunsten im Vak. wurde der Rückstand 4mal mit je 250 ml Benzin (Sdp. 60–70°) unter Erwärmen extrahiert. Die Extrakte wurden eingedunstet, in wenig Benzin (Sdp. 60–70°) aufgenommen und an 100 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert. Die Elution mit 1 l des gleichen Lösungsmittels lieferte 0,442 g Rückstand.

Die Ozonisierung (Aufnahme 139 mg) und Oxydation (1,5 g Ag<sub>2</sub>O/0,26 g NaOH) erfolgten wie bei dem Nachweisverfahren angegeben.

In den Fraktionen 132–147 (Retentionsvolumen 72) wurde nach mehrfacher Rechromatographie an kleinen Ecteolasäulen etwa 8 mg reine *o*-Tolylsäure gefunden (berechnet nach der UV-Extinktion bei 278 *m*μ) (s. Abb. 2).

2. In einem zweiten gleichlaufenden Versuch wurden bei für den Kohlenwasserstoff-Rückstand von 0,62 g entsprechender Änderung der Menge des Oxydationsmittels 7,8 mg *o*-Tolylsäure nachgewiesen.

Umsetzung von Ergosterin bzw. 7-Dehydro-cholesterin mit Floridin

10 g Ergosterin (bzw. 7-Dehydro-cholesterin) wurden wie im Nachweisverfahren mit aktiviertem Floridin in CCl<sub>4</sub> behandelt. Das Floridin färbte sich schon in der Kälte rot. Rückstand der Reaktionslösung und Extraktion ergaben 10,48 g (10,97 g).

Stufe 1: Reduktion 9,15 g (9,57 g).

Stufe 2: Benzin-Fraktion der Dehydrierung 0,15 g (0,68 g).

Stufe 3: Ozonisierung mit 48 mg (160 mg) Ozon und Oxydation mit 0,6 g Ag<sub>2</sub>O/0,1 g NaOH (1,9 g Ag<sub>2</sub>O/0,3 g NaOH).

Stufe 4: Bei der Chromatographie der Carbonsäure-Fraktion in Form der Ammoniumsalze an der großen Ecteola-Säule und bei der mehrfachen Rechromatographie aller in Gruppen zusammengefaßter Fraktionen an kleinen Ecteola-Säulen ließ sich in beiden Fällen keine *o*-Tolylsäure (durch ihr UV-Spektrum) nachweisen.

### Zusammenfassung

Bei der Behandlung von Cholesterin mit Floridin sollen nach Raouf und Mitarbeitern 9.10-*sec*-Steroide entstehen. Diese Ergebnisse konnten wir mit dem von uns verwendeten Floridin (Florex XXS und Floridin XXF) nicht bestätigen.

Um zu entscheiden, ob in unseren Reaktionsansätzen überhaupt 9,10-*seco*-Steroide entstanden waren, wurde ein Verfahren entwickelt, welches gestattet, 9,10-*seco*-Steroide in einem Gemisch mit einer großen Menge von Steroiden mit intaktem Ringsystem nachzuweisen. Grundlage dieser Methode ist das unterschiedliche Verhalten der Chloranil-Dehydrierungsprodukte der Steroide (17-*H*-Cyclopenta[*a*]phenanthren-Kohlenwasserstoffe aus Steroiden mit intaktem Ringsystem, Styryl-inden-Kohlenwasserstoffe aus 9,10-*seco*-Steroiden) bei der oxydativen Spaltung mit Ozon. Nur die Dehydrierungsprodukte der 9,10-*seco*-Steroide können dabei die monofunktionelle *o*-Tolylsäure liefern, die durch Ionenaustausch-Chromatographie an Ecteola von Di- und Tricarbonsäuren abgetrennt werden kann.

Bei Anwendung dieses Verfahrens auf die Reaktionsprodukte von Cholesterin mit Floridin (mehrfache Durchführung von 10-g-Cholesterin-Ansätzen) konnte *o*-Tolylsäure nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Ansätze konnten demnach nur weniger als 0,25% (wahrscheinlich weniger als 0,1%) 9,10-*seco*-Steroid enthalten haben. Auch die Umsetzungsprodukte von 7-Dehydro-cholesterin und Ergosterin mit Floridin lieferten keine *o*-Tolylsäure.

### Summary

According to Raoul and coworkers, the treatment of cholesterol with Floridin results in 9,10-*seco*-steroids. We could not confirm these results with Florex XXS or Floridin XXF.

In order to decide whether, in our reaction mixtures, 9,10-*seco*-steroids were produced at all, a method was developed, which permitted the detection of 9,10-*seco*-steroids admixed with large amounts of steroids with an intact ring system. The basis of the method is the different behaviour of the chloranil dehydrogenation products of the steroids (17-*H*-cyclopenta[*a*]phenanthrene hydrocarbons from steroids with an intact ring system; styryl-indene hydrocarbons from 9,10-*seco*-steroids) upon oxidative cleavage with ozone. Only the dehydrogenation products of 9,10-*seco*-steroids can yield the monofunctional *o*-tolylic acid, which can be separated from di- and tricarboxylic acids by ion exchange chromatography on Ecteola.

After using this method on the reaction products from cholesterol with Floridin (reaction carried out several times on 10 g. quantities of cholesterol), *o*-tolylic acid could not be unequivocally demonstrated. The reaction mixtures thus contained less than 0,25% (probably less than 0.1%) of 9,10-*seco*-steroid. The products from the reaction of 7-dehydrocholesterol and ergosterol with Floridin also yielded no *o*-tolylic acid.

Prof. Dr. H. Dannenberg, Max-Planck-Institut für Biochemie, 8 München 15, Goethestraße 31.