

Alkohol versetzt und der Niederschlag in gleicher Weise getrocknet. 110 mg vom Smp. 157—160°. Darnach errechnet sich die Ausbeute an Formaldehyd bei der Spaltung von XIV zu 70% der Theorie.

Spaltung von Hetero-lupandiol (XIII)<sup>1)</sup> mit Blei(IV)-acetat.

150 mg Substanz wurden in gleicher Weise wie Taraxastandiol mit Blei(IV)-acetat gespalten. Das erhaltene Destillat gab aber weder mit 2,4-Dinitrophenyl-hydrazin, noch mit Dimedon-Lösung Niederschläge. Aus dem Hetero-lupandiol erhält man folglich keine leichtflüchtigen Spaltprodukte.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser ausgeführt.

### Zusammenfassung.

Es konnten weitere Beweise für die schon früher abgeleitete Übereinstimmung des Kohlenstoffgerüsts bei Hetero-lupeol, Taraxasterol, Arnidiol und Faradiol aufgefunden werden. Diese einfach ungesättigten Monole und Diöle weisen die Doppelbindung paarweise an einer gleichen Stelle des Kohlenstoffgerüsts auf. Bei Hetero-lupeol und Faradiol befindet sich die Doppelbindung in einem Ringe, während sie bei Taraxasterol und Arnidiol semi- oder extracyclisch liegt und mit einer Methylengruppe endigt.

Organisch-chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

## 239. Über Steroide und Sexualhormone.

155. Mitteilung<sup>2)</sup>.

### Über 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan und zwei epimere 3,4-Dioxy-cholestane

von Pl. A. Plattner, H. Heusser und A. B. Kulkarni.

(3. IX. 48.)

Vor kurzem ist durch Arbeiten aus unserem Laboratorium<sup>3)</sup> eindeutig bewiesen worden, dass Strophanthidin und Periplogenin cis-Verknüpfung der Ringe A und B besitzen und demnach Derivate des 5-Oxy-koprostans sind. 5-Oxy-koprostani selbst bzw. Steroide mit Koprostan-Konfiguration, welche in Stellung 5 eine Oxy-Gruppe tragen, waren bis heute im Gegensatz zu 5-Oxy-cholestan-Derivaten synthetisch nicht zugänglich.

<sup>1)</sup> O. Jeger, Hs. K. Krüsi und L. Ruzicka, Helv. 30, 1048 (1947).

<sup>2)</sup> 154. Mitt. Helv. 31, 1455 (1948).

<sup>3)</sup> Pl. A. Plattner, A. Segre und O. Ernst, Helv. 30, 1432 (1947); vgl. dazu W. A. Jacobs und R. C. Elderfield, J. Biol. Chem. 113, 625 (1936); P. Speiser und T. Reichstein, Exper. 3, 323 (1947); Helv. 30, 2143 (1947); Helv. 31, 622 (1948).

5-Oxy-cholestane können durch Hydrierung von Verbindungen vom Typus des Cholesterin- $\alpha$ -oxyds bereitet werden. Die entsprechenden 5,6 $\beta$ -Oxyde geben dagegen unter analogen Hydrierungsbedingungen keine 5-Oxy-koprostane, sondern Derivate des 6 $\beta$ -Oxy-cholestans<sup>1</sup>).

Die Hydrierung von  $\Delta^4$ -Cholesten-oxyd<sup>2</sup>) bzw.  $\Delta^5$ -Cholesten-oxyd<sup>3</sup>) liefert ein Gemisch von Alkoholen, aus dem ein und dasselbe 5-Oxy-, „cholestan“ vom Smp. 110° isoliert werden konnte<sup>4</sup>). Die Zugehörigkeit dieses 5-Oxy-Steroids zur Cholestan- bzw. Koprostan-Reihe wurde bisher nicht bestimmt und scheint, da Bezugspunkte fehlen, schwierig.

In der vorliegenden Arbeit ist es uns erstmals gelungen, ein 5-Oxy-koprostan-Derivat, das den in der Natur vorkommenden 5-Oxy-Steroiden entspricht, partialsynthetisch zu bereiten und seine Konfiguration zu beweisen.

Als Ausgangsmaterial diente  $\Delta^4$ -Cholestenon-(3) (II), welches als  $\alpha$ , $\beta$ -ungesättigtes Keton nach der Methode von Weitz und Scheffer<sup>5</sup>) zu dem noch unbekanntem Cholestenon-epoxyd (V) umgesetzt wurde. Wie später gezeigt wird, ist in diesem der Oxyd-Ring in  $\beta$ -Stellung angeordnet und wir bezeichnen es deshalb im folgenden als 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V).

Hydriert man das 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V) mit einem nicht sehr aktiven Platinoxid-Katalysator (Adams) in Äther-Feinsprit, so werden unter Erhaltung der Oxido-Brücke zwei in Stellung 3 isomere 3-Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostane (VIIIa und IXa) gebildet. Diese können auch als  $\beta$ -Oxyde des  $\Delta^4$ -3 $\beta$ -Oxy-cholestens (Allo-cholesterin) bzw. des  $\Delta^4$ -3 $\alpha$ -Oxy-cholestens (Epi-allo-cholesterin) bezeichnet werden. Ihre Konstitution als in 3 Stellung epimere Verbindungen wurde durch Oxydation zum gemeinsamen Ausgangsmaterial, dem 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V), bewiesen. Einen ersten Anhaltspunkt zur Zuteilung einer bestimmten Konfiguration an die beiden am C-Atom 3 epimeren Oxido-Alkohole (VIIIa und IXa) gibt deren Verhalten gegen Digitonin. Der eine (IXa) ist mit Digitonin nicht fällbar, während der zweite (VIIIa) unter den gleichen Bedingungen einen voluminösen Niederschlag bildet<sup>6</sup>).

Wird das 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (IXa) in Eisessig mit Platinoxid weiter hydriert, so entsteht als Hauptprodukt das 3 $\alpha$ ,4 $\beta$ -Dioxy-cholestan (XIIa), welches als Diacetat charakterisiert wurde. Daneben wurde in Spuren das 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan (VIa) erhalten (vgl. dazu weiter unten).

<sup>1</sup>) Vgl. Pl. A. Plattner und W. Lang, Helv. **27**, 1872 (1944); Pl. A. Plattner, Th. Petrzilka und W. Lang, Helv. **27**, 513 (1944).

<sup>2</sup>) J. M. Heilbron, W. Shaw und F. S. Spring, R. **57**, 529 (1938).

<sup>3</sup>) L. Ruzicka, M. Furter und G. Thomann, Helv. **16**, 333 (1933).

<sup>4</sup>) Pl. A. Plattner, Th. Petrzilka und W. Lang, Helv. **27**, 513 (1944).

<sup>5</sup>) E. Weitz und A. Scheffer, B. **54**, 2327 (1921).

<sup>6</sup>) Die Konfigurationsbestimmung auf Grund des Verhaltens gegen Digitonin ist hier wohl zulässig, da es sich um ein in Stellung 3 epimeres Paar handelt, das sonst weiter keine konstitutiven Unterschiede aufweist, vgl. F. Hunziker und T. Reichstein, Helv. **28**, 1472 (1945).

Bei der hydrolytischen Aufspaltung von IXa in Dioxan-Wasser bei 160° wird ein Triol erhalten, welches mit Acetanhydrid-Pyridin ein Diacetat liefert. Für das Triol sind die beiden möglichen Formeln eines 3 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,5-Trioxy-cholestans (XIa) bzw. eines 3 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,5-Trioxy-koprostans (Xa) in Erwägung zu ziehen.

Schliesslich wurde das 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V) noch der Hydrierung in Alkohol mit einem besonders aktiven Platin-Katalysator (*Adams*) unterworfen. Als Reaktionsprodukte konnten dabei wieder 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (IXa), 3 $\beta$ -Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (VIIIa) und in etwas grösserer Menge das gesuchte 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan (VIa) isoliert werden.

Die Konstitution von VIa als 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan wurde durch folgende Umsetzungen bewiesen. Die Verbindung VIa liefert mit Acetanhydrid-Pyridin nur ein Monoacetat (VIb). Das freie Diol VIa bzw. sein Acetat VIb sind weder mit 3 $\beta$ ,5-Dioxy-cholestan<sup>1)</sup>, noch mit 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-cholestan<sup>2)</sup> bzw. den entsprechenden 3-Monoacetaten identisch. Ferner liefert das Diol VIa bei der Oxydation mit Chromtrioxyd ein Oxy-keton III, welches sich wiederum deutlich vom bekannten 3-Keto-5-oxy-cholestan<sup>2)</sup> unterscheidet. Bei der Wasserabspaltung liefert jedoch auch das neue Oxy-keton III Cholestenon.

Durch diese Umsetzungen ist rückblickend auch die Konstitution des Oxido-ketons V als 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan bewiesen.

Eine andere Möglichkeit, das Oxido-keton V mit einer Verbindung bekannter Konfiguration an C 4 zu verknüpfen, ergab sich aus der Beobachtung, dass V bei Hydrierung mit Platinoxid in Eisessig unter gleichzeitiger Hydrierung der Keto-Gruppe zum 3 $\beta$ ,4 $\beta$ -Dioxy-cholestan (VIIa) hydriert wird. Dieses letztere ist identisch mit dem Hydrierungsprodukt von  $\Delta^5$ -3 $\beta$ ,4 $\beta$ -Dioxy-cholesten (IV), welches von *Rosenheim*<sup>3)</sup> und gleichzeitig auch von *Butenandt*<sup>4)</sup> durch Oxydation von Cholesterin mit Selendioxyd bereitet wurde<sup>5)</sup>. Die von *Rosenheim*<sup>6)</sup> gefolgerte cis-Stellung der beiden Hydroxyle im  $\Delta^5$ -3 $\beta$ ,4 $\beta$ -Dioxy-cholesten (IV) wird also durch die in dieser Arbeit beschriebenen Umsetzungen weiter bestätigt.

Der *Rockefeller Foundation* in New York und der *CIBA Aktiengesellschaft* in Basel danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. Der eine von uns (*A. B. K.*) dankt ferner der Universität Bombay und Herrn *A. V. Quenim* von Panjim für Stipendien, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten.

<sup>1)</sup> *Pl. A. Plattner, Th. Petrzilka und W. Lang, Helv. 27, 513 (1944).*

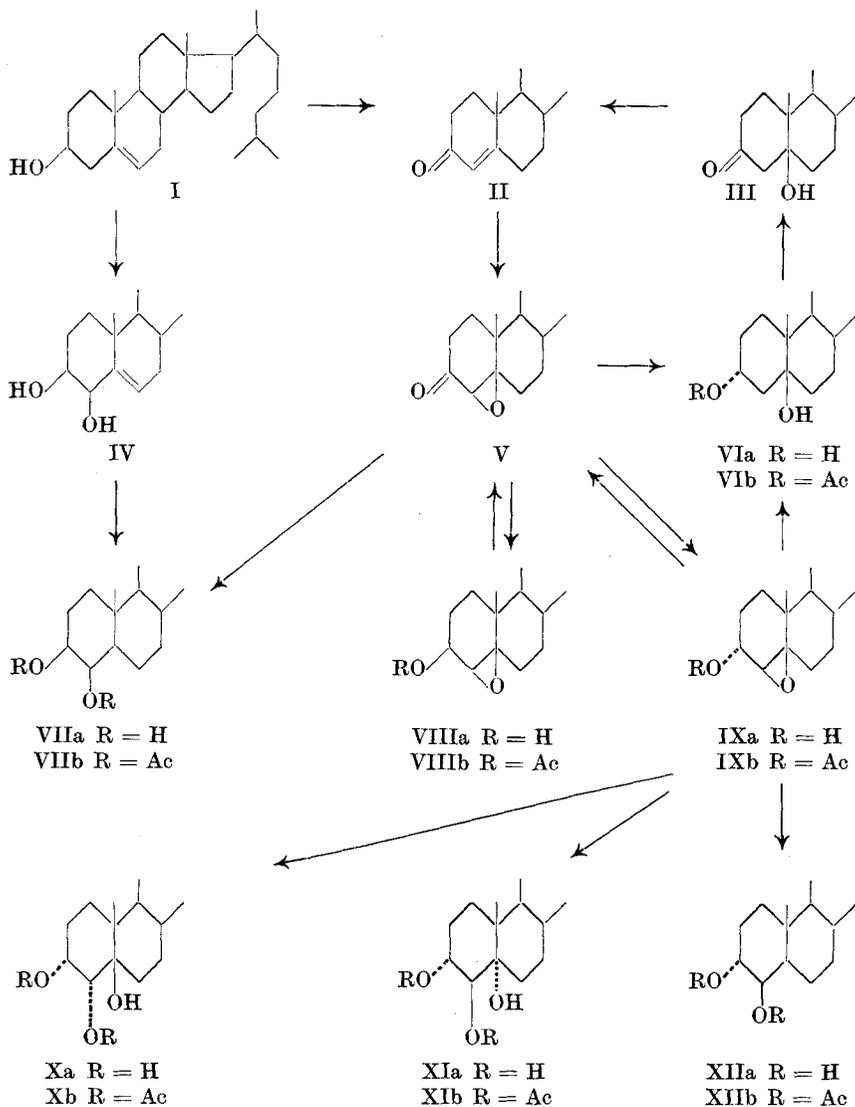
<sup>2)</sup> *Pl. A. Plattner, A. Fürst, F. Koller und W. Lang, Helv. 31, 1455 (1948).*

<sup>3)</sup> *O. Rosenheim und W. W. Starling, Soc. 1937, 377.*

<sup>4)</sup> *A. Butenandt und E. Hausmann, B. 70, 1154 (1937).*

<sup>5)</sup>  $\Delta^4$ -3 $\beta$ ,4 $\beta$ -Dioxy-cholesten ist auch aus Cholesterin über dessen 5,6-Dibromid und das  $\Delta^4$ -3 $\beta$ -Oxy-4-brom-cholesten zugänglich; vgl. Anmerkung 6).

<sup>6)</sup> *V. A. Petrow, O. Rosenheim und W. W. Starling, Soc. 1943, 135.*



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

#### 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V).

Zu 10 g Cholestenon (II), gelöst in 1000 cm<sup>3</sup> Methanol, wurden unter Kühlen auf 20° tropfenweise je 40 cm<sup>3</sup> 4,0-n. wässriges Natriumhydroxyd und 40 cm<sup>3</sup> 30-proz. Wasserstoffperoxyd gleichzeitig zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 72 Stunden bei 0° aufbewahrt, wobei sich reichlich Krystalle ausschieden. Diese wurden abgetrennt. Die Mutterlaugen wurden mit 2 Liter Wasser verdünnt und mit Benzol extrahiert, die benzolische Lösung gut mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Auf die

<sup>1)</sup> Alle Schmelzpunkte sind korrigiert und im evakuierten Röhrchen bestimmt.

gleiche Weise, d. h. durch Lösen in Benzol und Waschen mit Wasser, wurde der krystalline Anteil gereinigt. Die vereinigten Rohprodukte (9,0 g) lieferten aus Aceton umkrystallisiert 5,5 g Nadeln, die nach einer weiteren Krystallisation aus Methanol bei 116—117° schmolzen. Zur Analyse wurde eine Probe noch zweimal aus Methanol umkrystallisiert und anschliessend 36 Stunden im Hochvakuum bei 80° getrocknet. Smp. 116—117°.

$$[\alpha]_D^{21} = +134^{\circ}; +136^{\circ} \quad (c = 1,295; 1,391 \text{ in Chloroform})$$

3,652 mg Subst. gaben 10,828 mg CO<sub>2</sub> und 3,600 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	Ber. C	80,94	H	11,07%
	Gef. „	80,92	„	11,03%

### 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ , 5-oxido-koprostan (IXa).

3,0 g 3-Keto-4 $\beta$ , 5-oxido-koprostan (V) wurden in 100 cm<sup>3</sup> Äther und 100 cm<sup>3</sup> Feinsprit gelöst und nach Zugabe von 700 mg vorhydriertem Platinoxyd (*Adams*) unter Wasserstoff geschüttelt. Nach 16 Stunden waren 293 cm<sup>3</sup> (0°, 760 mm; 1,7 Mol) Wasserstoff verbraucht, worauf vom Katalysator abfiltriert und die Lösung auf das halbe Volumen eingengt wurde. Beim Abkühlen der Lösung schieden sich 2,2 g feine Blättchen aus, die abgenutscht und erneut aus Alkohol umkrystallisiert wurden. Smp. 157—159°. Zur Analyse wurde eine Probe noch zweimal umkrystallisiert und anschliessend bei 95° 110 Stunden getrocknet. Smp. 158—159°.

$$[\alpha]_D^{21} = +31,4^{\circ}; 31,1^{\circ} \quad (c = 1,352; 0,605 \text{ in Chloroform})$$

3,542 mg Subst. gaben 10,435 mg CO<sub>2</sub> und 3,687 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	Ber. C	80,54	H	11,52%
	Gef. „	80,40	„	11,65%

Verhalten gegen Digitonin. 40 mg 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ , 5-oxido-koprostan (IXa), gelöst in 4 cm<sup>3</sup> 95-proz. Feinsprit, wurden tropfenweise mit 5 cm<sup>3</sup> einer 0,5-proz. Digitonin-Lösung in 85-proz. Feinsprit versetzt und bei Zimmertemperatur 24 Stunden aufbewahrt. Es konnte keine Fällung beobachtet werden.

Oxydation mit Chromsäure. 200 mg 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ , 5-oxido-koprostan (IXa) vom Smp. 158—159° wurden in 80 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und unter Köhlen tropfenweise mit 0,90 cm<sup>3</sup> einer 1,19-n. Chromtrioxyd-Eisessig-Lösung versetzt. Nach 24 Stunden wurde die überschüssige Chromsäure durch Zusetzen von Methanol zerstört und das Reaktionsgemisch in Wasser eingerührt. Die Extraktion mit Äther lieferte 180 mg Rohprodukt, welches aus Alkohol umkrystallisiert wurde. Die Substanz schmolz dann bei 116—117° und erwies sich mit 3-Keto-4 $\beta$ , 5-oxido-koprostan (V) als identisch.

Acetat. 300 mg 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ , 5-oxido-koprostan (IXa) wurden in einem Gemisch von 4 cm<sup>3</sup> Pyridin und 4 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, anschliessend die Reaktionslösung in Wasser eingerührt und das Acetat IX b mit Äther ausgeschüttelt. Das Rohprodukt (320 mg) wurde in Petroläther gelöst und durch eine Säule von 8 g Aluminiumoxyd (Aktivität II) filtriert. Die sieben ersten Petroläther-Eluate (zusammen 200 mg) lieferten aus Alkohol umkrystallisiert gut ausgebildete Nadeln vom Smp. 69—70°.

Zur Analyse wurde das Präparat noch zweimal aus Alkohol umkrystallisiert und anschliessend im Hochvakuum bei 25° 48 Stunden über Phosphorpentoxyd getrocknet.

$$[\alpha]_D^{21} = +29,3^{\circ}; +31,3^{\circ} \quad (c = 0,879; 0,741 \text{ in Chloroform})$$

3,750 mg Subst. gaben 10,763 mg CO<sub>2</sub> und 3,623 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Ber. C	78,32	H	10,88%
	Gef. „	78,33	„	10,81%

### 3 $\beta$ -Oxy-4 $\beta$ , 5-oxido-koprostan (VIIIa).

Die Mutterlagen, welche bei der Herstellung des vorne beschriebenen 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ , 5-oxido-koprostans (IXa) anfielen, wurden zur Trockne verdampft und der Rückstand (500 mg) in einem Gemisch von 4 cm<sup>3</sup> Pyridin und 4 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid

24 Stunden bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Die übliche Aufarbeitung des Reaktionsgemisches ergab 550 mg rohe Acetate, die zur Reinigung an 12 g Aluminiumoxyd (Aktivität II) chromatographiert wurden. Die ersten drei mit Petroläther eluierten Fraktionen (65 mg) lieferten aus Alkohol umkrystallisiert feine Nadeln (VIIIb), die bei 89–90° schmolzen. Die späteren Fraktionen lieferten 240 mg des schon beschriebenen 3 $\alpha$ -Acetoxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostans (IXb) vom Smp. 69–70°. Zur Analyse wurde das 3 $\beta$ -Acetat VIIIb noch zweimal aus Alkohol umkrystallisiert und anschliessend 48 Stunden bei 25° im Hochvakuum über Phosphoroxoxyd getrocknet. Smp. 89–90°.

$$[\alpha]_D^{21} = -21,8^{\circ}; -20,3^{\circ} \quad (c = 1,250; 1,044 \text{ in Chloroform})$$

3,943 mg Subst. gaben 11,353 mg CO<sub>2</sub> und 3,760 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3 \quad \text{Ber. C } 78,32 \quad \text{H } 10,88\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{„ } 78,58 \quad \quad \text{„ } 10,67\% \end{array}$$

Verseifung des Acetats VIIIb. 180 mg 3 $\beta$ -Acetoxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (VIIIb) wurden in einer Lösung von 50 cm<sup>3</sup> Methanol, 180 mg Natriumhydrogencarbonat und 10 cm<sup>3</sup> Wasser 2 Stunden zum Sieden erhitzt. Der grösste Teil des Methanols wurde abgedampft, die Lösung mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert. Die übliche Aufarbeitung gab 170 mg Rohprodukt, welches aus Methanol umkrystallisiert feine Nadeln vom Smp. 95–96° lieferte. Zur Analyse wurde das 3 $\beta$ -Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (VIIIa) noch zweimal aus 75-proz. Alkohol umkrystallisiert und anschliessend 48 Stunden bei 25° im Hochvakuum über Phosphoroxoxyd getrocknet.

$$[\alpha]_D^{21} = +4,0^{\circ}; +4,3^{\circ} \quad (c = 1,405; 0,755 \text{ in Chloroform})$$

3,628 mg Subst. gaben 10,676 mg CO<sub>2</sub> und 3,728 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2 \quad \text{Ber. C } 80,54 \quad \text{H } 11,52\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{„ } 80,31 \quad \quad \text{„ } 11,50\% \end{array}$$

Verhalten gegen Digitonin. 30 mg 3 $\beta$ -Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (VIIIa), gelöst in 3 cm<sup>3</sup> 95-proz. Feinsprit, wurden tropfenweise mit 4 cm<sup>3</sup> einer 0,5-proz. Digitonin-Lösung in 85-proz. Feinsprit versetzt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Schon nach wenigen Stunden bildete sich ein voluminöser Niederschlag.

Oxydation mit Chromsäure. 50 mg 3 $\beta$ -Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (VIIIa) vom Smp. 95–96° wurden in 25 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und unter Köhlen tropfenweise mit 0,25 cm<sup>3</sup> einer 1,19-n. Chromtrioxyd-Eisessig-Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die überschüssige Chromsäure wurde dann durch Zusetzen von wenig Methanol zerstört, worauf das Reaktionsgemisch in Wasser eingerührt wurde. Die Extraktion mit Äther gab 40 mg Rohprodukt, welches nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Äthanol Nadeln lieferte, die bei 116–117° schmolzen. Die Substanz erwies sich als identisch mit dem weiter oben beschriebenen 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V).

#### Hydrierung von 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V) in Eisessig.

1,0 g 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V) vom Smp. 116–117° wurden in 100 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und unter Zusatz von 400 mg vorhydriertem Platinoxid (*Adams*) im Schüttelautoklaven bei einem Druck von 125 Atmosphären 18 Stunden hydriert. Nun wurde vom Katalysator abfiltriert, die Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur stark eingeeengt, mit Wasser verdünnt und mit Äther ausgeschüttelt. Die übliche Aufarbeitung gab 990 mg eines amorphen Rohproduktes, welches bei Zimmertemperatur mit einem Gemisch von 5 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid und 5 cm<sup>3</sup> Pyridin acetyliert wurde. Das rohe Acetylierungsprodukt (1,0 g) wurde in wenig Petroläther gelöst und an einer Säule von 25 g Aluminiumoxyd (Aktivität II) chromatographiert.

a) Cholestanol. Die ersten Eluate (Petroläther) (220 mg) lieferten nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol Cholestanyl-acetat vom Smp. 107–108°. Zur Analyse wurde eine Probe nochmals umkrystallisiert und anschliessend im Hochvakuum bei 60° 72 Stunden getrocknet.

$$[\alpha]_D^{23} = +13,0^0 \quad (c = 0,925 \text{ in Chloroform})$$

3,613 mg Subst. gaben 10,672 mg CO<sub>2</sub> und 3,763 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub> Ber. C 80,78 H 11,70%

Gef. „ 80,61 „ 11,65%

b) 3β, 4β-Dioxy-cholestan (VIIa). Die Petroläther-Benzol-Fractionen (4:1) des oben beschriebenen Chromatogramms lieferten 350 mg einer kristallisierten Substanz, die nach dem Umfällen aus Äthanol bei 134–135° schmolz. Eine Probe wurde zur Analyse dreimal aus Alkohol umkristallisiert und anschliessend im Hochvakuum bei 100° getrocknet. Es liegt das Diacetat VIIb des 3β, 4β-Dioxy-cholestans vor.

$$[\alpha]_D^{21} = -8,3^0 \quad (c = 1,120 \text{ in Chloroform})$$

3,728 mg Subst. gaben 10,407 mg CO<sub>2</sub> und 3,557 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub> Ber. C 76,18 H 10,73%

Gef. „ 76,19 „ 10,68%

Verseifung. 200 mg Diacetat VIIb vom Smp. 134–135° wurden in 50 cm<sup>3</sup> Äthanol gelöst und mit einer Lösung von 200 mg Natriumhydrogencarbonat in 10 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt, anschliessend der grösste Teil des Äthanol abgedampft, die Lösung mit Wasser verdünnt und mit Äther ausgeschüttelt. Die übliche Anarbeitung ergab 140 mg Rohprodukt, das nach dem Umkristallisieren aus Methanol bei 193–194° schmolz. Zur Analyse wurde eine Probe nochmals aus Äthanol umkristallisiert und anschliessend im Hochvakuum bei 100° getrocknet. Smp. 196–198°.

$$[\alpha]_D^{21} = +20,0^0 \quad (c = 1,187 \text{ in Chloroform})$$

3,837 mg Subst. gaben 11,268 mg CO<sub>2</sub> und 4,082 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub> Ber. C 80,14 H 11,96%

Gef. „ 80,14 „ 11,90%

Die Substanz erwies sich als identisch mit einem nach der Methode von *Rosenheim* und *Starling*<sup>1)</sup> aus Δ<sup>5</sup>-3β, 4β-Dioxy-cholesten (IV) durch katalytische Hydrierung bereiteten 3β, 4β-Dioxy-cholestan. Für die von *Rosenheim*<sup>1)</sup> und später auch von *Butenandt*<sup>2)</sup> beschriebenen Verbindungen fanden wir folgende Daten:

Δ<sup>5</sup>-3β, 4β-Dioxy-cholesten (IV); Smp. 175–176°;

$$[\alpha]_D^{21} = -61,4^0 \quad (c = 0,832 \text{ in Chloroform})$$

3β, 4β-Dioxy-cholestan (VIIa); Smp. 196–198°;

$$[\alpha]_D^{21} = +20,0^0 \quad (c = 1,187 \text{ in Chloroform})$$

3β, 4β-Diacetoxy-cholestan (VIIb); Smp. 134–135°;

$$[\alpha]_D = -8,3^0 \quad (c = 1,120 \text{ in Chloroform})$$

#### Hydrierung von 3α-Oxy-4β, 5-oxido-koprostan (IXa).

850 mg 3α-Oxy-4β, 5-oxido-koprostan (IXa) vom Smp. 157–159° wurden in 75 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und unter Zusatz von 100 mg vorhydriertem Platinoxid (*Adams*) im Schüttelautoklaven bei einem Druck von 75 Atmosphären während 16 Stunden hydriert. Nun wurde vom Katalysator abfiltriert, die Lösung im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther gelöst und durch Waschen der ätherischen Schicht mit Wasser und Natriumhydrogencarbonat-Lösung gereinigt. Das Rohprodukt (850 mg) wurde in einem Gemisch von 5 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid und 5 cm<sup>3</sup> Pyridin acetyliert, anschliessend wie üblich aufgearbeitet und zur Reinigung an 22 g Aluminiumoxyd (Aktivität II) chromatographiert.

a) 3α, 4β-Dioxy-cholestan (XIIa). Die Petroläther-Benzol-Fractionen (4:1) (325 mg) wurden vereinigt und erneut an einer Säule von 7 g Aluminiumoxyd adsorbiert. Die Petroläther-Benzol-Eluate (4:1) dieses zweiten Chromatogramms lieferten schliess-

<sup>1)</sup> *O. Rosenheim* und *W. W. Starling*, Soc. 1937, 377.

<sup>2)</sup> *A. Butenandt* und *E. Hausmann*, B. 70, 1154 (1937).

lich 85 mg einer krystallisierten Substanz, die bei 128–131° schmolz. Es liegt das 3 $\alpha$ ,4 $\beta$ -Diacetoxy-cholestan (XIIb) vor. Zur Analyse wurde das Präparat aus Methanol umkrystallisiert und anschliessend im Hochvakuum bei 100° getrocknet. Smp. 132–133°.

$$[\alpha]_D^{21} = -10,1^{\circ} \quad (c = 0,730 \text{ in Chloroform})$$

3,685 mg Subst. gaben 10,268 mg CO<sub>2</sub> und 3,521 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_4 \quad \text{Ber. C } 76,18 \quad \text{H } 10,73\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{„ } 76,04 \quad \quad \text{„ } 10,69\% \end{array}$$

Verseifung zum 3 $\alpha$ ,4 $\beta$ -Dioxy-cholestan (XIIa). 200 mg Diacetat XIIb wurden mit äthanolischer Natriumhydrogencarbonat-Lösung verseift und anschliessend aufgearbeitet. Aus Alkohol umkrystallisiert schmolz das 3 $\alpha$ ,4 $\beta$ -Dioxy-cholestan (XIIa) (150 mg) bei 234–236°. Zur Analyse wurde 24 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$$[\alpha]_D^{21} = +16,3^{\circ} \quad (c = 0,538 \text{ in Chloroform})$$

2,616 mg Subst. gaben 7,679 mg CO<sub>2</sub> und 2,815 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_2 \quad \text{Ber. C } 80,14 \quad \text{H } 11,96\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{„ } 80,11 \quad \quad \text{„ } 12,04\% \end{array}$$

b) 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan (VIa). Die Äther-Fractionen (30 mg) des ersten Chromatogramms lieferten aus Alkohol umkrystallisiert Krystalle, die bei 135–138° schmolzen. Durch nochmaliges Umkrystallisieren stieg der Schmelzpunkt auf 138–139°. Die Mischprobe mit dem weiter unten beschriebenen Präparat von 3 $\alpha$ -Acetoxy-5-oxo-koprostan (VIb) (Smp. 148°) zeigte keine Depression.

Zur sicheren Identifizierung wurden die Mutterlaugen dieses Präparates in alkoholischer Lösung mit Natriumhydrogencarbonat verseift und das Rohprodukt aus Methanol umkrystallisiert. Die Substanz schmolz dann bei 185–187° und zeigte im Gemisch mit dem weiter unten genauer beschriebenen 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan (VIa) keine Schmelzpunktserniedrigung.

### 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan (VIa).

Hydrierung von 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V) in Äthanol. 3,7 g 3-Keto-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (V) wurden in 400 cm<sup>3</sup> Äthanol gelöst, mit 200 mg vorhydriertem Platinoxid (*Adams*) versetzt und unter Wasserstoff geschüttelt. Nach 4 Stunden waren 294 cm<sup>3</sup> (0°, 760 mm, 1,4 Mol.) Wasserstoff verbraucht. Vom Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung auf ein kleines Volumen eingeeengt, worauf sich 1,2 g Krystalle ausschieden, die als 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (IXa) identifiziert werden konnten. Die Mutterlaugen wurden zur Trockne eingedampft (2,5 g) und in üblicher Weise mit einem Gemisch von Acetanhydrid-Pyridin acetyliert. Die rohen Acetate (2,7 g) wurden an einer Säule von 75 g Aluminiumoxyd (Aktivität II) vorsichtig chromatographiert.

Die ersten drei mit Petroläther eluierten Fractionen konnten nicht krystallisiert werden. Die folgenden 4 Fractionen lieferten nach dem Umkrystallisieren aus Äthanol 280 mg 3 $\beta$ -Acetoxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (VIII b). Aus den Fractionen 10–20, welche mit Petroläther-Benzol 4:1 eluiert wurden, konnten 435 mg 3 $\alpha$ -Acetoxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (IX b) isoliert werden. Die folgenden Eluate 21–32 bestanden aus Mischfractionen und konnten nicht krystallisiert werden.

3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan (VIa). Schliesslich liessen sich mit Äther (Fractionen 33–38) 420 mg des gesuchten 3 $\alpha$ -Acetoxy-5-oxo-koprostans (VIb) eluieren. Dieses wurde zur Reinigung mit alkoholischer Natriumhydrogencarbonat-Lösung verseift und in bekannter Weise aufgearbeitet. Das Rohprodukt lieferte aus Methanol umkrystallisiert 120 mg Blättchen, die unscharf bei 172–184° schmolzen. Nach dreimaligem Umkrystallisieren lag der Schmelzpunkt bei 192–193°. Zur Analyse wurde eine Probe 24 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$$[\alpha]_D^{21} = +47,3^\circ \quad (c = 0,605 \text{ in Chloroform})$$

3,964 mg Subst. gaben 11,606 mg CO<sub>2</sub> und 4,174 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_2 \quad \text{Ber. C } 80,14 \quad \text{H } 11,96\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{,, } 79,90 \quad \quad \text{,, } 11,78\% \end{array}$$

Die Mischprobe mit 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-cholestan<sup>1)</sup> vom Smp. 198–199° schmolz bei 165–170°.

3 $\alpha$ -Acetoxy-5-oxy-koprostan (VIb). 30 mg 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan (VIa) wurden in einem Gemisch von 1 cm<sup>3</sup> Pyridin und 1 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid in bekannter Weise acetyliert und aufgearbeitet. Das Rohprodukt (31 mg) wurde zweimal aus 75-proz. Äthanol umkrystallisiert und schmolz dann bei 147–148°. Zur Analyse wurde eine Probe bei 90° 72 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

$$[\alpha]_D^{21} = +50,8^\circ \quad (c = 1,980 \text{ in Chloroform})$$

3,610 mg Subst. gaben 10,313 mg CO<sub>2</sub> und 3,615 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_3 \quad \text{Ber. C } 77,97 \quad \text{H } 11,28\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{,, } 77,90 \quad \quad \text{,, } 11,20\% \end{array}$$

Die Mischprobe mit 3 $\alpha$ -Acetoxy-5-oxy-cholestan<sup>1)</sup> vom Smp. 131–132° schmolz bei 124–125°.

### 3-Keto-5-oxy-koprostan (III).

33 mg 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan (VIa) wurden in 20 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und unter Kühlung tropfenweise mit 0,3 cm<sup>3</sup> einer 1,19-n. Lösung von Chromtrioxyd in Eisessig versetzt. Nach 24 Stunden wurde die überschüssige Chromsäure mit wenig Methanol zerstört, die Lösung in Wasser eingerührt und mit Äther extrahiert. Die übliche Aufarbeitung ergab 30 mg eines krystallisierten Rohproduktes, das bei 148–152° schmolz. Nach dem Umkrystallisieren aus 75-proz. Methanol lag der Smp. bei 151–152°. Zur Analyse wurde eine Probe bei 85° im Hochvakuum getrocknet.

$$[\alpha]_D^{21} = +63,1^\circ \quad (c = 0,758 \text{ in Chloroform})$$

3,494 mg Subst. gaben 10,309 mg CO<sub>2</sub> und 3,611 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2 \quad \text{Ber. C } 80,54 \quad \text{H } 11,52\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{,, } 80,55 \quad \quad \text{,, } 11,56\% \end{array}$$

4<sup>4</sup>-3-Keto-cholesten (II). 8 mg 3-Keto-5-oxy-koprostan (III) wurden im Hochvakuum auf 110° erhitzt. Nach 24 Stunden war die Substanz geschmolzen. Sie wurde aus Alkohol umkrystallisiert und zeigte dann einen Schmelzpunkt von 76–78°. Nach nochmaligem Umkrystallisieren schmolz das Präparat bei 78–79° und gab im Gemisch mit Cholestenon vom Smp. 79–80° keine Depression.

### Aufspaltung von 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (IXa) zur 3 $\alpha$ ,4,5-Trioxy-Verbindung (X bzw. XI).

500 mg 3 $\alpha$ -Oxy-4 $\beta$ ,5-oxido-koprostan (IXa) wurden in einem Gemisch von 20 cm<sup>3</sup> Dioxan und 5 cm<sup>3</sup> Wasser unter Zusatz einiger kleinen Stückchen Tonteller im V<sub>2</sub>A-Einschlussrohr 7 Tage auf 150–160° erhitzt. Anschliessend wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, die Substanz in Äther aufgenommen, die Äther-Lösung mit Wasser gut gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde aus Alkohol umkrystallisiert und lieferte 120 mg Krystalle. Zur Analyse wurde das Präparat noch zweimal aus Alkohol umkrystallisiert und anschliessend im Hochvakuum bei 100° 72 Stunden getrocknet. Smp. 295–297°.

$$[\alpha]_D^{21} = +43,5^\circ \quad (c = 0,818 \text{ in Pyridin})$$

3,622 mg Subst. gaben 10,229 mg CO<sub>2</sub> und 3,724 mg H<sub>2</sub>O

$$\begin{array}{l} \text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_3 \quad \text{Ber. C } 77,09 \quad \text{H } 11,50\% \\ \text{Gef. } \quad \quad \quad \text{,, } 77,08 \quad \quad \text{,, } 11,51\% \end{array}$$

<sup>1)</sup> Helv. 31, 1455 (1948).

Diacetat (Xb bzw. XIb): 50 mg des Triols (Xa bzw. XIa) wurden in einem Gemisch von 2 cm<sup>3</sup> Pyridin und 2 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid acetyliert und in bekannter Weise aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Alkohol umkrystallisiert und schmolz dann bei 129–130°. Zur Analyse wurde eine Probe 48 Stunden bei 95° im Hochvakuum getrocknet.

$$[\alpha]_D^{21} = +21,6^\circ \quad (c = 0,625 \text{ in Chloroform})$$

3,583 mg Subst. gaben 9,694 mg CO<sub>2</sub> und 3,389 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> O <sub>5</sub>	Ber. C 73,76	H 10,39%
	Gef. „ 73,86	„ 10,58%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. *W. Manser* ausgeführt.

### Zusammenfassung.

Durch katalytische Reduktion des Cholestenon-epoxyds ist es gelungen, auf partialsynthetischem Weg 3 $\alpha$ ,5-Dioxy-koprostan zu bereiten, das in der räumlichen Anordnung des Asymmetriezentrums 5 der Konfiguration des Strophanthidins und verwandter Aglykone entspricht.

Organisch-chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

## 240. Sur les enzymes amylolytiques VIII<sup>1)</sup>. L' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc cristallisée

par *Ed. H. Fischer*<sup>2)</sup> et *P. Bernfeld*.

(3 IX 48)

Nous avons décrit l'isolement<sup>3)</sup> puis la cristallisation<sup>4)</sup> de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc. Nous rapportons ici une méthode simplifiée et améliorée de purification de l'enzyme, sa cristallisation ainsi que ses propriétés.

### *Méthode améliorée de purification.*

Nous avons constaté que la stabilité de l' $\alpha$ -amylase de pancréas de porc était considérablement augmentée lors de sa purification, en opérant en milieu alcalin. Ainsi, nous avons pu éviter l'adjonction d'une solution d'amylase bouillie employée naguère pour stabiliser

<sup>1)</sup> VII<sup>m</sup>e communication, *Helv.* **31**, 1735 (1948).

<sup>2)</sup> Boursier de la *Fondation pour des recherches scientifiques dans le domaine de la chimie*.

<sup>3)</sup> *K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Exper.* **2**, 362 (1946); *Helv.* **30**, 64 (1947).

<sup>4)</sup> *K. H. Meyer, Ed. H. Fischer et P. Bernfeld, Exper.* **3**, 106 (1947); *Arch. Biochem.* **14**, 149 (1947).