

2512. W. Fürst

Oxydationsprodukte des Ergosterins *)

1. Mitt.: Chromatographische Trennung der Oxydationsprodukte,
Isolierung neuer Bestrahlungsprodukte des Ergosterins bei Einfluß von Sauerstoff

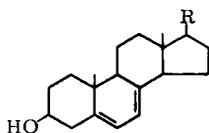
Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

(Eingegangen am 15. Januar 1965)

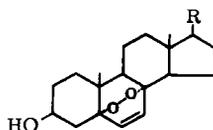
Für die bisher bekannten Oxydationsprodukte des Ergosterins wurden dünn-schichtchromatographische Trennverfahren ausgearbeitet. Bei Bestrahlung von Ergosterin unter Zusatz verschiedener Sensibilisatoren in n-Propanol bzw. Chloroform konnten drei neue Substanzen dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden. Für Substanz A kommt die Struktur eines 3 β ,5 α -Dihydroxy-6,7- α -epoxy-8,22-ergostadiens in Betracht. Für Substanz C, die bei der Einwirkung von Chlorwasserstoff aus „Ergosterintriol I“ rein erhalten werden konnte, wird die Struktur als 3 β ,5 α -Dihydroxy-6,14,22-ergostatrien angenommen. Bei der Einwirkung von Chlorwasserstoff auf „Ergosterintriol I“ entsteht 3 β ,5 α ,6 β -Trihydroxy-7,22-ergostadien und eine Substanz von Kohlenwasserstoffcharakter.

Ergosterin wird in Lösung bei Luftzutritt und Belichtung außerordentlich schnell verändert. Unter Einsatz der Dünnschichtchromatographie sollten die mit oder ohne Zusatz von Sensibilisatoren erhaltenen Bestrahlungsprodukte untersucht werden.

Bei dem Bestreben, die photochemische Umwandlung des Ergosterins zu Vitamin D₂ durch geeignete Farbstoffe in das sichtbare Licht zu verlagern, erhielten *Windaus* und *Brunken*¹⁾ ein kristallisiertes Produkt, das sich als Ergosterinperoxid erwies und dem nach *Fieser*²⁾ die Formel II zukommt.



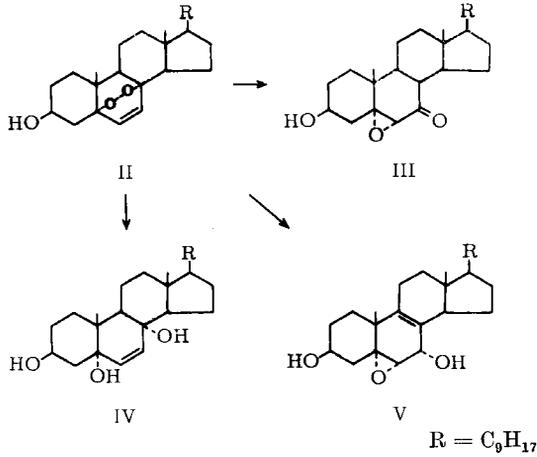
Ergosterin (I)

R = C₉H₁₇

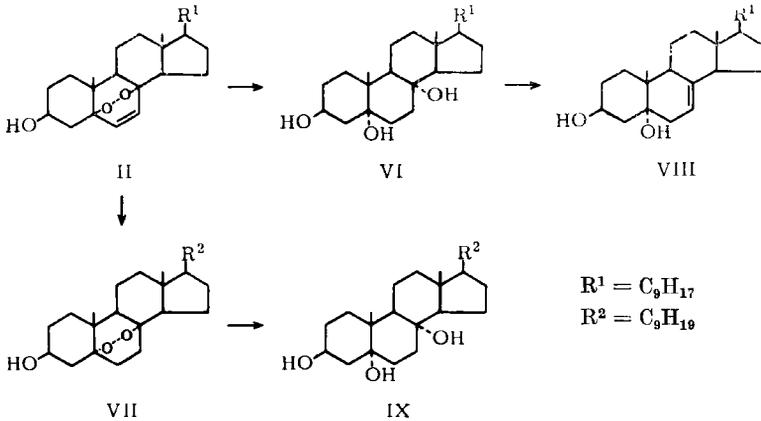
Ergosterinperoxid (II)

Von II existiert eine größere Zahl von Abkömmlingen, die durch partielle Reduktion oder Umlagerung entstehen. *Windaus* und *Linsert*³⁾ hatten bei der Reduktion von II mit Zinkstaub und Alkali das als „Ergosterintriol I“ bezeichnete IV erhalten. *Bergmann* und *Meyers*⁴⁾ isolierten nach der thermischen Umlagerung von II in einem siedenden Gemisch von Decan und Dodecan III und V.

*) Herrn Prof. Dr. *W. Poethke* zum 65. Geburtstag gewidmet.1) *A. Windaus* und *J. Brunken*, *Liebigs Ann. Chem.* **460**, 225 (1928).2) *L. F. Fieser*, *Chemistry of Natural Products related to Phenanthrene*, I. Auflage, Reinhold Publ. Corp., New York 1936.3) *A. Windaus* und *O. Linsert*, *Liebigs Ann. Chem.* **465**, 195 (1928).4) *W. Bergmann* und *B. Meyers*, *Liebigs Ann. Chem.* **620**, 46 (1959).



III wurde bereits von *Windaus, Bergmann* und *Lüttringhaus*⁵⁾ beim Erhitzen von II über seinen Schmelzpunkt und nachfolgender Destillation i. Hochvak. erhalten. Bei der katalytischen Reduktion von II erzielten *Clayton* und Mitarb.⁶⁾ je nach den Versuchsbedingungen entweder die Spaltung der Epidioxidbrücke oder die Absättigung der Doppelbindungen. In Äthylacetat ging II in Gegenwart von Platinkatalysator unter Aufnahme von 2 H₂ in VI über. Dieses spaltete beim Behandeln mit Chlorwasserstoff Wasser ab unter Bildung von VIII. In Eisessig wurden 2 H₂ zu VII angelagert, das bei weiterer Hydrierung in IX überging.



Alle diese Verbindungen wurden von I ausgehend hergestellt und ihr dünn-schichtchromatographisches Verhalten geprüft. Zur Trennung eigneten sich am besten Dünnschichtplatten von Aluminiumoxid D (Greiz-Dörlau) mit Benzol/Chloroform/Dioxan 2 : 2 : 1 als Laufmittel. Die Adsorption wird im wesentlichen durch die Anzahl der OH-Gruppen bestimmt.

⁵⁾ A. *Windaus*, W. *Bergmann* und A. *Lüttringhaus*, *Liebigs Ann. Chem.* **472**, 195 (1929).

⁶⁾ R. B. *Clayton*, H. B. *Henbest* und E. R. H. *Jones*, *J. chem. Soc. (London)* **1953**, 2015.

Tabelle 1

	R _X -Wert X = Ergosterin	Färbung mit H ₂ SO ₄
Ergosterin	1,00	braun-grün
Ergosterinperoxid	0,73	rot
IV	0,09	rot
VII	0,74	braun
VIII	0,33	rot
VI	0,06	braun
V	0,15	blaugrau
III	0,93	braun
Vitamin D ₂	1,15	orange

Zur Untersuchung der photochemischen Reaktion von Ergosterin mit Sauerstoff wurden Lösungen von I in n-Propanol bzw. Chloroform mit einer 200-Wattlampe bzw. mit Sonnenlicht bestrahlt. Mit Lampenlicht trat nur bei Verwendung von Eosin und Methylenblau — den bereits von *Windaus* benutzten Sensibilisatoren — eine Umsetzung zu II ein. Andere Verbindungen waren dc nicht nachweisbar. Bei der Bestrahlung mit Sonnenlicht konnte auch mit anderen Sensibilisatoren, wie Sudanrot und Rhodamin B, eine Umsetzung erzielt werden, wobei neben II eine weitere Verbindung mit kleinerem R_X-Wert (0,53)*), die im folgenden mit A bezeichnet wird, auftrat. Die Umsetzung verlief bei Zusatz von Sudanrot bzw. Rhodamin B insgesamt wesentlich langsamer. Auch ohne Zusatz eines Sensibilisators war eine Umsetzung von I zu II und A festzustellen. Dagegen verhinderte ein Zusatz von Dimethylgelb die Umsetzung völlig. Die Bestrahlung in Chloroform ergab

Tabelle 2

Bestrahlung mit 200 Wattlampe 2 Std. Ergosterin in n-Propanol

	Ergosterin	Ergosterinperoxid	Substanz A
Methylenblau	—	+ + +	—
Eosin	+	+ +	—
Sudanrot	+ + +	—	—
Dimethylgelb	+ + +	—	—
Rhodamin B	+ + +	—	—
Ohne Farbstoff	+ + +	—	—
Einwirkung von Sonnenlicht 2 Std.			
Methylenblau	—	+ + +	—
Eosin	—	+ +	+
Sudanrot	—	+ +	+ +
Dimethylgelb	+ + +	—	—
Rhodamin B	+	+ +	+ +
Ohne Farbstoff	+	+ +	+

*) Da bei der DC die Reduzierbarkeit der Rf-Werte wesentlich von der Schichtdicke abhängig ist, wird das als R_X-Wert (*I. M. Hais* und *K. Macek*, Handbuch der Papierchromatographie, S. 171, Jena 1963) bezeichnete Verhältnis der Laufstrecken, bezogen auf eine Vergleichssubstanz, angegeben.

wesentliche Unterschiede gegenüber der in *n*-Propanollösung. Bei Zusatz von Rhodamin B bzw. Sudanrot konnten neben II zwei weitere Substanzen, im folgenden mit B ($R_X = 0,57$) und C ($R_X = 0,40$) bezeichnet, dc nachgewiesen werden.

Tabelle 3
Bestrahlung mit 200-Wattlampe, Ergosterin in Chloroform

	Ergosterin	Ergosterinperoxid	Substanz B	Substanz C
Methylenblau	—	+ + +	—	—
Eosin	—	+ +	+	+
Sudanrot	+	+ +	+	+
Rhodamin B	+	+	+ +	+
Dimethylgelb	+ + +	—	—	—
Ohne Farbstoff	+	+	+ +	+
Einwirkung von Sonnenlicht				
Methylenblau	—	+ + +	—	—
Eosin	—	+ + +	+	+
Sudanrot	+	+ +	+ +	—
Rhodamin B	+	+ +	+ +	—
Dimethylgelb	+ + +	—	—	—
Ohne Farbstoff	+	+ +	—	—

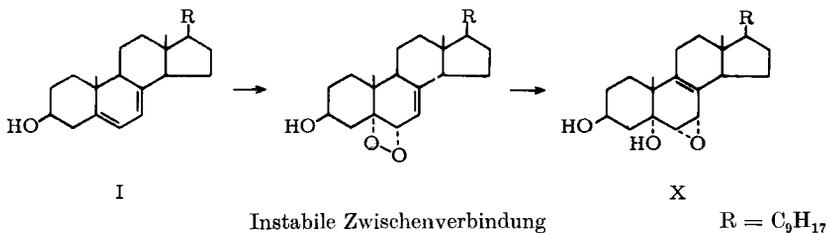
Während die R_X -Werte von A und B nahezu gleich waren, bestand ein Unterschied im Verhalten gegenüber Schwefelsäure. B färbte sich zunächst braunrot und dann allmählich rot, während A sofort rot wurde. Die Substanzen A, B und C waren nach dem dc Verhalten mit keiner der bisher bekannten Verbindungen identisch.

Zunächst wurde die in *n*-Propanol entstehende Substanz A untersucht. Sie ist kein Umlagerungsprodukt von II, sondern entsteht nur direkt aus I. Die Auftrennung des bei der Bestrahlung von I erhaltenen Gemisches im präparativen Maßstab gelang durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid CD (Greiz-Dörlau). Dabei wurde aus der I. Fraktion eine Substanz, im folgenden mit D bezeichnet, erhalten, die auf dem DC mit der Lösungsmittelfront lief und sich mit Schwefelsäure rot färbte. Die vollständige Trennung von II und A gelang durch Reduktion des gesamten Reaktionsproduktes mit Zink und Alkali, wobei II in IV überging, während A unverändert blieb. A konnte jedoch nur in Form seines Azobenzolcarbonsäureesters nach erneuter Chromatographie in kristallisierter Form gewonnen werden. Der dem Ester zugrunde liegende Alkohol hatte gegenüber I 2 Atome Sauerstoff aufgenommen. Eine Dimerisierung, wie sie *Windaus* und *Borgeaud*⁷⁾ beim Bestrahlen von Ergosterin beobachtet hatten, war nicht eingetreten. Nach der spezifischen Absorption bei 322 nm lag ein Monoester der Azobenzolcarbonsäure vor. Der freie Alkohol konnte jedoch auch aus dem kristallisierten Ester nicht in kristallisierter Form gewonnen werden. Lediglich das Dinitrobenzoat war noch in kristalliner Form zugänglich. Um über die Absorption im UV-Bereich Auskunft zu erhalten, wurde die Absorptionskurve des Esters zwischen 245 und 350 nm in Chloroform

⁷⁾ A. *Windaus* und P. *Borgeaud*, *Liebigs Ann. Chem.* 460, 235 (1928).

aufgenommen. Nach Abzug der Azobenzolcarbonsäurekomponente kam dem Alkohol in diesem Bereich keine Absorption zu. Es mußte demnach bei den konjugierten Doppelbindungen von I eine Veränderung eingetreten sein. Die erste Annahme, daß es sich bei A um ein isomeres Epidioxid handelte, bestätigte sich nicht, da die Substanz keine Peroxideigenschaften hatte. Außerdem war im IR-Spektrum des Esters eine freie OH-Gruppe nachweisbar. Eines der beiden zusätzlichen Sauerstoffatome lag demnach als tertiäre OH-Gruppe vor. Im Ring B von I ist stets die Δ -5 sowohl bei der Hydrierung wie bei der Epoxidbildung reaktionsfähiger, so daß unter Berücksichtigung des rückwärtigen Angriffs des Sauerstoffs die OH-Gruppe in 5α -Stellung angenommen werden kann. Die Art und Stellung des 2. Sauerstoffatoms konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Eine Ketogruppe war nicht nachweisbar. A war im alkalischen Medium stabil, reagierte aber mit Bromwasserstoff in Eisessig sehr schnell unter Bildung einer Substanz, die auf dem DC mit der Lösungsmittelfront lief und mit der oben beschriebenen Substanz D identisch war. Die Reaktion mit Bromwasserstoff ließ die Anwesenheit eines Epoxidringes vermuten. Die Reaktion führte dabei zu Verbindungen von Kohlenwasserstoffcharakter.

Für die Umsetzung und die Struktur von A wird nach den bisherigen Ergebnissen folgende Annahme gemacht. Bei der Reaktion von I mit Sauerstoff kann neben der 5,8-Addition, die zu II führt, auch eine 5,6-Addition stattfinden. Hierbei entsteht ein instabiles Produkt, das sich zu X umlagert analog der von *Bergmann* und *Meyers* gefundenen Umlagerung von II zu III. Eine weitere Sicherung der Formel war noch nicht möglich, da die Herstellung der reinen Verbindung bisher nur mit sehr geringen Ausbeuten gelang.



Die Möglichkeiten für die Isolierung der in Chloroform bei Bestrahlung von I entstehenden Substanzen B und C lagen ungünstiger. B war offenbar nicht stabil und verschwand auch beim schonenden Eindampfen aus dem Reaktionsgemisch. Von C entstand nur so wenig, daß die Wahrscheinlichkeit einer Isolierung gering war. Eine gewisse Klärung dieser beiden Substanzen brachten Beobachtungen über das Verhalten von IV.

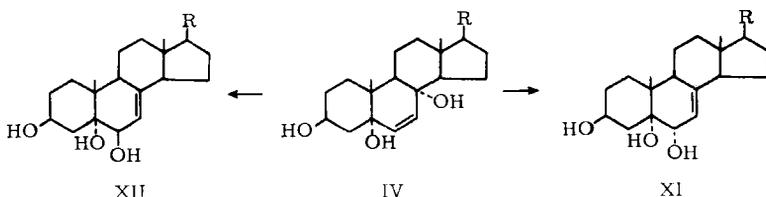
Eine Lösung von IV in Chloroform für chromatographische Vergleiche, die längere Zeit der Sonnenbestrahlung ausgesetzt war, zeigte die mehrere Flecke. Im wesentlichen wurden 4 weitere, von IV verschiedene Substanzen beobachtet. Eine davon bewegte sich ähnlich Substanz D mit der Lösungsmittelfront. Zwei weitere Substanzen hatten gleiche R_{X} -Werte wie die Substanzen B und C und zeigten gegen-

über Schwefelsäure gleiches Verhalten. Eine weitere, im folgenden mit **E** bezeichnete Substanz hatte einen kleineren R_X -Wert als IV. Dieses Ergebnis war beim Belichten von IV in Chloroform stets reproduzierbar, während in alkoholischen Lösungen kaum eine Veränderung eintrat. Es zeigte sich, daß für die Reaktion nicht die Belichtung sondern der in Spuren sich bildende Chlorwasserstoff verantwortlich war. So konnte die gleiche Reaktion durch Zusatz von Chlorwasserstoff zu einer Lösung von IV in Chloroform oder Methanol erreicht werden. Die Empfindlichkeit von IV gegenüber Säuren beschrieb *Achtermann*⁸⁾, der IV zu verestern versuchte. Er erhielt dabei zu meist undefinierte Gemische und nur mit Essigsäureanhydrid/Pyridin bei 0° ein definiertes IV-Monoacetat. Eigene Versuche zur Herstellung weiterer Ester nach der schonenden Methode von *Staab*⁹⁾ führten zu einem Monodinitrobenzoat. *Achtermann* erreichte durch Kochen von IV mit Maleinsäureanhydrid in Benzol eine Umlagerung, für die *Fieser*²⁾ zeigte, daß es sich um eine Umlagerung von IV zu 3 β ,5 α ,6 α -Trihydroxy-7,22-ergostadien — auch als „Ergosterintriol II“ bezeichnet — handelte. Substanz **E** war de aber nicht mit „Ergosterintriol II“ identisch. Auf Grund der hohen Adsorptionstendenz mußte es sich aber um ein Triol han-

Tabelle 4

	R_X -Wert X = Ergosterintriol I	Färbung mit H ₂ SO ₄
IV	1,00	rot
„Ergosterintriol II“	0,77	rot
3 β ,5 α ,6 β -Trihydroxy- 7,22-ergostadien	0,63	rot

deln. Die drei Verbindungen ließen sich auf Kieselgelplatten mit dem Laufmittel Benzol/Chloroform/Dioxan 1 : 1 : 1 trennen. Substanz **E** konnte aus dem Reaktionsgemisch säulenchromatographisch isoliert und als XII identifiziert werden. Dieses ist nach *Alt* und *Barton*¹⁰⁾ mit dem von *Honeywell* und *Bills*¹¹⁾ aus Hefe isolierten Cerevisterin identisch. Beim Behandeln von IV mit Chlorwasserstoff entsteht demnach zu einem gewissen Teil XII. Das 6 α -Isomer war in den Reaktionsgemischen de nicht nachweisbar. In diesem Zusammenhang war die de Überprüfung der Ergebnisse von *Achtermann* von Interesse. Dabei zeigte es sich, daß beim Behandeln von IV mit Maleinsäureanhydrid in Benzol ausschließlich das 6 α -Isomer neben der bereits oben genannten Substanz **D** entstand.



⁸⁾ *Th. Achtermann*, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 217, 281 (1933).

⁹⁾ *H. A. Staab*, Liebigs Ann. Chem. 609, 75 (1957).

¹⁰⁾ *G. H. Alt* und *D. R. H. Barton*, Chem. and Ind. 1952, 1103.

¹¹⁾ *E. M. Honeywell* und *C. E. Bills*, J. biol. Chemistry 80, 15 (1928).

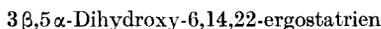
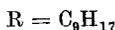
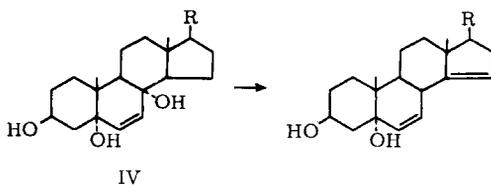
Die Isolierung der Substanzen B und C aus dem Reaktionsgemisch von IV mit Chlorwasserstoff gelang jedoch nicht.

Beim Behandeln von IV-Monoacetat mit Chlorwasserstoff in Methanol trat eine ähnliche Umsetzung wie bei IV ein. Die dc Prüfung ergab, daß neben dem 3β -Acetoxy- $5\alpha,6\beta$ -dihydroxy-7,22-ergostadien und einer mit der Lösungsmittelfront laufenden Substanz im mittleren R_x -Bereich nur eine Verbindung vorhanden war. Diese Substanz konnte durch Säulenchromatographie in kristallisierter Form gewonnen werden. Durch Verseifen wurde ein Alkohol erhalten, der mit Substanz C identisch war. C hatte gegenüber IV ein H_2O abgegeben. Die erste Annahme, daß sich unter Wasseraustritt zwischen den beiden OH-Gruppen in 5α - und 8α -Stellung, analog wie von Clayton und Mitarb.⁶⁾ bei IX beschrieben, ein $5\alpha,8\alpha$ -Epoxid gebildet hatte, war nicht richtig. Das IR-Spektrum von C-Monoacetat zeigte die Anwesenheit von mindestens einer freien OH-Gruppe. Die Verbindung mußte demnach noch mindestens 2 OH-Gruppen von IV besitzen. Die Anwesenheit noch aller 3 OH-Gruppen konnte durch die Analyse und durch den höheren R_x -Wert ausgeschlossen werden. Eine OH-Gruppe mußte somit unter Ausbildung einer Doppelbindung abgespalten sein. Im IR-Spektrum von IV-Monoacetat liegt bei 1670 cm^{-1} eine Bande, die der Δ -6 zugeordnet werden kann. Bladon und Mitarb.¹²⁾ haben die Banden in diesem Bereich einzelnen Doppelbindungen im Sterinringsystem zugeordnet. Für das Δ -6-Cholesten erhielten sie eine Bande bei 1647 cm^{-1} . IV muß im Gegensatz zum Δ -6-Cholesten im Ring B die Halbwannenform¹³⁾ zugeschrieben werden. Diese etwas weniger stabile Form bringt eine Verschiebung der Bande nach 1670 cm^{-1} mit sich. Die Bande bei 1670 cm^{-1} konnte neben einer weiteren bei 1620 cm^{-1} im IR-Spektrum von C-Monoacetat beobachtet werden; Δ -6 sollte sich demnach bei der Umsetzung von IV-Monoacetat zu C-Monoacetat nicht verändert haben. Das UV-Spektrum von C-Monoacetat zeigte bis 230 nm keine merkliche Absorption. Es konnte daher kein konjugiertes System entstanden sein. Abspaltung der 8α -OH-Gruppe ergibt sowohl in Richtung 9 als auch 14 ein konjugiertes System. Bei der Isomerisierung verschiedener Sterine wurde beobachtet¹⁴⁾, daß Δ -8(14) unter Chlorwasserstoffeinfluß leicht nach Δ -14(15) verschoben wird. Bei analogen Reaktionen, z. B. der Abspaltung von Wasser unter Einfluß von Chlorwasserstoff aus VI, reagiert nur die 8α -OH-Gruppe. Bei der Umsetzung von IV-Monoacetat zu C-Monoacetat sollten daher die 5α -OH-Gruppe und die Δ -6 und Δ -22 erhalten geblieben sein, während die 8α -OH-Gruppe abgespalten wurde unter Wanderung der Doppelbindung nach 14(15). Es resultiert dann ein $3\beta,5\alpha$ -Dihydroxy-6,14,22-ergostatrien. Nach Bladon¹²⁾ liegt in einem Cyclopentenring eine Bande bei 1613 cm^{-1} , die mit einer 2. Bande von C-Monoacetat bei 1620 cm^{-1} vergleichbar ist.

¹²⁾ P. Bladon, J. M. Fabian, H. B. Henbest, H. P. Koch und G. W. Wood, J. chem. Soc. (London) 1951, 2402.

¹³⁾ C. W. Beckett, N. K. Freeman und K. S. Pitzer, J. Amer. chem. Soc. 70, 4227 (1948).

¹⁴⁾ H. Lettré, H. H. Inhoffen und R. Tschesche, Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe, II. Auflage, S. 121, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1954.



Für die Bildung der Substanzen B und C der Bestrahlung von I in Chloroform muß ein ähnlicher Reaktionsmechanismus wie bei der Bildung aus IV vorliegen. Dazu muß aus I über II intermediär IV entstehen, das durch Spuren von Chlorwasserstoff zu B und C umgelagert wird; II selbst erfährt jedoch bei Bestrahlung mit oder ohne Sensibilisatoren in Chloroform keinerlei Veränderung. Für die photochemische Reaktion des Sauerstoffs mit verschiedenen Verbindungen darunter auch Ergosterin haben *Schenck, Gollnik* und *Neumüller*¹⁵⁾ ein Reaktionsschema aufgestellt. Dabei treten angeregte Zustände von II auf, die der Reduktion zu IV besser zugänglich sind, und es sollte daher auch während der Bestrahlung zu einem gewissen Anteil die Reduktion zu IV möglich sein.

Beschreibung der Versuche

Zur DC wurden Glasplatten 8×20 cm nach dem von *Poethke* und *Kinze*¹⁶⁾ beschriebenen Sprühverfahren mit Al_2O_3 D (Greiz-Dörlau) beschichtet. Nach 5 Min. Trocknen an der Luft wurden die Platten im Trockenschrank bei $105-110^\circ \frac{1}{2}$ Std. aktiviert und dann sogleich verwendet. Als Laufmittel diente Benzol/ $CHCl_3$ /Dioxan 2 : 2 : 1. Es wurde alkoholfreies $CHCl_3$ verwendet und auf 50 ml der obigen Mischung 0,1 ml Methanol zugesetzt. Für die qualitative Prüfung wurden die Substanzen in Mengen von 20—50 μ g in 0,1proz. $CHCl_3$ -Lösung aufgetragen. Die DC wurden nach dem Entwickeln mit H_2SO_4 besprüht, wobei die charakteristischen Farbflecke sofort erschienen und etwa 5 Min. ihre Färbung behielten. Eine weitere Möglichkeit zur Auffindung der Verbindungen bestand im Besprühen mit Phosphorsäure/Phosphormolybdänsäure¹⁷⁾, wobei alle Verbindungen beständige blaue Flecke ergaben. Die Konzentration der Phosphorsäure konnte dabei auf 15% herabgesetzt werden. Zur Trennung der Ergosterintriole wurden Kieselgelplatten bei $120^\circ \frac{1}{2}$ Std. aktiviert. Als Laufmittel diente Benzol/ $CHCl_3$ /Dioxan 1 : 1 : 1.

Herstellung von Substanz A

5 g Ergosterin (I) wurden in 1 l n-Propanol unter Zusatz von 10 mg Sudanrot gelöst und die Lösung in einer flachen Schale unter Ersatz des verdampfenden n-Propanols über 12 Std. einer intensiven Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Nach dieser Zeit war die Hauptmenge von I zu II, Substanz A und weiteren Substanzen umgesetzt. Die Lösung wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit Benzol aufgenommen und die Benzollösung über eine 50 cm lange Säule mit Al_2O_3 CD (Greiz-Dörlau) gegeben. Beim Nachwaschen mit Benzol wurden Fraktionen zu je 50 ml aufgefangen. In der ersten Fraktion war Substanz D enthalten, in den weiteren unverändertes I und II. Nach 10 Benzolfractionen wurde mit $CHCl_3$ eluiert. Es wurden 20 Fraktionen zu je 50 ml aufgefangen; in diesen waren II und A

¹⁵⁾ G. O. Schenck, K. Gollnik und O. A. Neumüller, Liebigs Ann. Chem. 603, 46 (1957).

¹⁶⁾ W. Poethke und W. Kinze, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 101, 683 (1962).

¹⁷⁾ E. Stahl, Dünnschichtchromatographie 1962, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962.

nachweisbar. Die Fraktionen mit dem überwiegenden Anteil von A wurden zusammengegeben, i. Vak. eingedampft und der Rückstand in 10 ml wasserfreiem Benzol gelöst. Die Lösung wurde mit 500 mg Azobenzolcarbonsäurechlorid und 5 Tropfen Pyridin versetzt. Nach 12 Std. Stehen bei Raumtemperatur wurde Wasser zugesetzt und die Mischung ausgeäthert. Die organische Phase wurde mit Wasser und verd. Salzsäure gewaschen, getrocknet und abdestilliert. Die Azobenzolcarbonsäureester wurden in 10 ml CHCl_3 gelöst und mit 50 ml Methanol versetzt. Dabei fiel der schwerlösliche II-Azobenzolcarbonsäureester aus. Die Mutterlauge wurde eingedampft und der Rückstand in Benzol gelöst. Die Benzollösung wurde über Al_2O_3 CD (Greiz-Dörlau) gegeben; nach einem fast farblosen Vorlauf wurden Fraktionen je zu 20 ml aufgefangen bis keine Azobenzolcarbonsäureester mehr in der Säule vorhanden waren. Die Fraktionen wurden getrennt eingedampft und die Rückstände in je 10 ml Aceton gelöst. Beim Anspritzen mit Wasser konnte aus den mittleren Fraktionen eine kristallisierte Substanz vom Schmp. $180\text{--}185^\circ$ erhalten werden. Eine kleine Probe dieser Substanz ergab nach dem Verseifen mit alkoholischer Kalilauge die Identität mit A. In geringer Menge war jedoch noch II nachweisbar. Ausbeute 8 mg.

Bei einem weiteren Ansatz wurde die Bestrahlung in gleicher Weise, jedoch unter Zusatz von 10 mg Rhodamin B vorgenommen. Die Lösung wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand in 200 ml 2 n äthanol. KOH gelöst. Unter Zusatz von 20 g Zinkstaub wurde 1 Std. am Rückflußkühler gekocht. Dabei ging II in IV über. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde ausgeäthert und die Ätherlösung zur Trockne verdampft. Beim Aufnehmen in Benzol blieb ein Rückstand, der sich als IV erwies. Die Benzollösung wurde nach Veresterung mit Azobenzolcarbonsäurechlorid wie oben aufgearbeitet. Es konnten 40 mg Azobenzolcarbonsäureester von A mit einem Schmp. $202\text{--}206^\circ$ erhalten werden. II war darin nicht mehr nachweisbar.

$\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_4$ (636,9)	Ber.: C 77,33	H 8,23	N 4,40	Mol.-Gew. 636,9
	Ge.: C 77,53	H 8,45	N 4,18	Mol.-Gew. 626

Die Mol.-Gew.-bestimmung wurde nach *Rast* mit Campher durchgeführt.

Zur Herstellung des freien Alkohols wurden 20 mg A-Azobenzolcarbonsäureester mit 5 ml 2 n äthanol. KOH auf dem Wasserbad verseift. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde ausgeäthert, die getrocknete Ätherlösung eingedampft und der Rückstand mit 5 ml Aceton aufgenommen. Beim Zutropfen von Wasser entstand eine Trübung; es konnte aber auch beim längeren Stehen bei -10° keine kristallisierte Substanz erhalten werden. Die Lösung wurde erneut ausgeäthert und die Ätherlösung eingedampft. Der Rückstand wurde mit 100 mg Dinitrobenzoylchlorid in 5 ml wasserfreiem Benzol und 5 Tropfen Pyridin verestert. Aus Aceton wurde der Dinitrobenzoesäureester von A in nadelförmigen Kristallen erhalten. Der Ester schmolz bereits bei $115\text{--}118^\circ$, kristallisierte dann wieder und schmolz endgültig bei $195\text{--}202^\circ$.

Zur Ermittlung der UV-Absorption wurde eine Lösung von $20\ \mu\text{g/ml}$ A-Azobenzolcarbonsäureester in CHCl_3 in einem Bereich von $245\text{--}350\ \text{nm}$ gemessen. Die Absorption der Azobenzolcarbonsäurekomponente wurde in einer Lösung gleicher Konzentration des Dihydroergosterinazobenzolcarbonsäureesters ermittelt. Das IR-Spektrum wurde in CCl_4 , $2,4\ \text{mg/ml}$ A-Azobenzolcarbonsäureester, aufgenommen.

Umsetzung von A mit HBr/Eisessig

20 mg A-Azobenzolcarbonsäureester wurden mit 5 ml 2 n äthanol. KOH verseift. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt, ausgeäthert und die Ätherlösung eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml Essigsäure gelöst und mit 0,5 ml 45proz. Bromwasserstoffsäure versetzt. Nach 1stdg. Stehen war nur noch Substanz D de nachweisbar.

Umlagerung von IV mit HCl in CHCl_3

2 g IV wurden in 100 ml CHCl_3 gelöst und 10 ml 25proz. Salzsäure zugesetzt. Die Mischung wurde unter wiederholtem Umschütteln 1 Std. stehengelassen. Danach wurde mehrfach mit Wasser ausgeschüttelt und i. Vak. eingedampft, der Rückstand in Benzol aufgenommen und über eine 50-em-Säule mit Al_2O_3 CD (Greiz-Döläu) gegeben. In Benzolfractionen sowie bei nachfolgender Elution mit CHCl_3 konnten die Substanzen B, C und D nachgewiesen, jedoch nicht isoliert werden. Bei der abschließenden Elution mit Methanol/ CHCl_3 1 : 1 wurde bereits beim Einengen der Lösung eine kristallisierte Substanz erhalten, die sich als XII, Schmp. 258—262°, erwies. 50 mg XII wurden in 2 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und 5 ml Essigsäureanhydrid zugesetzt. Nach 12 Std. Stehen bei Raumtemperatur wurde kurz auf dem Wasserbad erwärmt, die Lösung mit Wasser versetzt, die abgeschiedene Substanz isoliert und aus Methanol umkristallisiert. Schmp. 168—171° (XII-Diacetat).

Umlagerung von IV-Monoacetat mit HCl in Methanol

3 g IV-Monoacetat wurden in 250 ml Methanol gelöst und 1,5 ml 25proz. Salzsäure zugesetzt. Nach 3 Std. Stehen bei 4° wurde die abgeschiedene leicht gelbe Substanz (Substanz D und andere) abfiltriert, das Filtrat mit Wasser verdünnt und ausgeäthert. Die Ätherlösung wurde eingedampft, der Rückstand in Petroleumbenzin Sdp. 50—70° gelöst und über Al_2O_3 CD Aktivität III chromatographiert. Es wurden folgende Fraktionen aufgefangen: 1. 250 ml Petroleumbenzin, 2. 250 ml Benzol und 3. 250 ml Benzol/ CHCl_3 3 : 1. Die letzte Fraktion wurde erneut eingedampft und mit Benzol/ CHCl_3 1 : 1 über Al_2O_3 CD Aktivität I chromatographiert. Es wurden Fraktionen zu je 100 ml aufgefangen. Die 2. Fraktion ergab nach dem Eindampfen und Umkristallisieren des Rückstands aus Pyridin/Aceton/Wasser prismatische Kristalle vom Schmp. 151—155°. Ausbeute: 30 mg C-Monoacetat. Die Verbindung kristallisierte unter diesen Bedingungen mit 4 H_2O .

$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (526,8)	Ber.: C 68,39	H 10,33	H_2O 13,68
	Gef.: C 69,84	H 10,22	H_2O 13,02

Bei 130° getrocknete Substanz:

$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$ (454,7)	Ber.: C 79,24	H 10,20
	Gef.: C 77,54	H 10,45

30 mg C-Monoacetat wurden mit 5 ml 2 n Äthanol. KOH 45 Min. auf dem Wasserbad verseift. Beim Verdünnen mit Wasser wurde eine Substanz isoliert, die beim Umkristallisieren aus Aceton nadelförmige Kristalle vom Schmp. 148° ergab. Der dc Vergleich zeigte, daß es sich um C handelte.

$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_2$ (412,7)	Ber.: C 81,51	H 10,75
	Gef.: C 79,87	H 10,54

Die Messung der UV-Absorption von C-Monoacetat erfolgte in Äthanol. Das IR-Spektrum von C-Monoacetat wurde in CCl_4 2 mg/ml aufgenommen.

Herstellung von IV-Dinitrobenzoat

200 mg Dinitrobenzoesäure wurden in 10 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran mit 250 mg Carbodimidazol umgesetzt. Nach 5 Min. wurde eine Lösung von 300 mg IV in 5 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Min. wurde mit Wasser verdünnt und die ausgeschiedene Substanz aus Aceton umkristallisiert. Es entstanden schwach gelbe Nadeln vom Schmp. 205°. Ausbeute 100 mg.

$\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8$ (624,8)	Ber.: C 67,28	H 7,74	N 4,48
	Gef.: C 68,56	H 7,54	N 4,32