SUMMARY

The carqueja oil of Brazil contains ledol, identified by comparison (mixed melting-point, IR.-spectra) with an authentic preparation studied by Prof. F. ŠORM and his collaborators.

Laboratoires de Recherches de
L. GIVAUDAN & Cie, S.A., Vernier-Genève

---

219. Isolierung von 24-Methylencholesterin aus Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene (*Apis mellifica* L.)

von **M. Barbier** und **O. Schindler**[1])

(27. VII. 59)

Die soziale Ordnung in einem Bienenvolk wird zum Teil von der Königin gelenkt. Neben einer starken, auf Arbeiterinnen gerichteten Anziehungswirkung[2])[3]) veranlasst die Anwesenheit einer Königin bei den Arbeiterinnen eine Hemmung der Entwicklung der Ovarien[2])[4]), und auch die Produktion von Weiselzellen wird unterdrückt[3])[5]). Die erwähnten Wirkungen der Königin lassen sich auch mit Extrakten aus Königinnen erzielen, und es konnte nachgewiesen werden, dass sie zustande kommen durch ein Sekret der Königin, welches von den die Königin umgebenden Arbeiterinnen abgeleckt und mit der Nahrungsaufnahme im Stock an die übrigen Arbeiterinnen weitergegeben wird. Für Stoffe dieser und ähnlicher Art, welche von einem Individuum nach aussen sezerniert, von einem zweiten Individuum der gleichen Art aufgenommen werden und dort spezifische Reaktionen auslösen, wurde der Ausdruck Pheromone geprägt[6]).

Im Zusammenhang mit den angegebenen Wirkungen der Bienenkönigin haben wir eine grössere Menge Bienenköniginnen, die uns von GARON BEE CO. Donaldsonville, Louisiana, USA, geliefert wurden, extrahiert. Im folgenden berichten wir über die Auftrennung der neutralen Anteile der erhaltenen Extrakte. Da in Vorversuchen festgestellt worden war, dass die auf Arbeiterinnen gerichtete Anziehungswirkung in den sauren Fraktionen der Königinnen-Extrakte angereichert war, wurde die Extrak-

[1]) Vorläufige Mitteilung vgl. M. BARBIER, T. REICHSTEIN, O. SCHINDLER & E. LEDERER, Nature, im Druck.

[2]) J. PAIN, Arch. internat. Physiol. **59**, 203 (1951); ST. VOOGD, Experientia **11**, 181 (1955).

[3]) C. G. BUTLER, Proc. Royal Soc. **147 B**, 275 (1957): hier ist auch eine Zusammenstellung der früheren Literatur zum Thema enthalten.

[4]) J. PAIN, C. r. Soc. Biol. **145**, 1505 (1951); Chem. Abstr. **46**, 8276i (1952); Insectes Sociaux **1**, 59 (1954); C. r. hebd. séances Acad. Sci. **239**, 1869 (1954); R. CHAUVIN & J. PAIN, Experientia **12**, 354 (1956); J. PAIN, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. **240**, 670 (1955); Chem. Abstr. **49**, 7762f (1955); A. P. DE GROOT & ST. VOOGD; Experientia **10**, 384 (1954); ST. VOOGD, *ibid.* **12**, 199 (1956).

[5]) C. G. BUTLER, Trans. Roy. Entomol. Soc. London **105**, 11 (1954); Proc. Roy. Entomol. Soc. London **31 A**, 12 (1956), Chem. Abstr. **51**, 15024 a (1957).

[6]) P. KARLSON & A. BUTENANDT, Ann. Review Entomol. **4**, 39 (1959); P. KARLSON & M. LÜSCHER, Naturwissenschaften **46**, 63 (1959).

tion der zermahlenen Insekten mit t-Butanol ausgeführt, um auf diese Weise Veresterungen der Säuren möglichst zu vermeiden[7]). Die in Aceton löslichen Anteile der im Vakuum eingedampften Auszüge wurden aus saurer wässeriger Lösung mit Pentan, Äther und Chloroform ausgeschüttelt, und den Ausschüttelungen die sauren Anteile durch Extraktion mit 2-n. Na_2CO_3-Lösung entzogen[8]) (Ausbeuten vgl. Tab. 2, exper. Teil). Die Hauptmenge der Neutralstoffe war in den pentanlöslichen Teilen enthalten. Diese wurden an Silicagel chromatographiert. Dabei konnte ein krist. Stoff gefasst werden, der weitgehend ähnliche Eigenschaften wie Cholesterin besass (vgl. Tab. 1): Schmelzpunkt, Drehung und die Farbreaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD waren identisch; bei der Mischprobe wurde keine Schmelzpunktsdepression beobachtet. Das Sterinderivat bildete aber eine krist. O-Acetyl-Verbindung, die die gleiche spez. Drehung zeigte wie O-Acetylcholesterin, jedoch ca. 20° höher schmolz. Unter den Bedingungen der OPPENAUER-Oxydation wurde ein krist. Oxydationsprodukt erhalten, das im UV. bei 241 mμ die Absorptionsbande eines α,β-unges. Ketones zeigte. Neben der auf diese Weise nachgewiesenen Doppelbindung liess sich durch titrimetrische Bestimmung[9]) der Aufnahme von 2,01 Mol. Brom (ber. auf $C_{28}H_{44}O$ (396,6)) eine zweite Doppelbindung nachweisen. Diese musste als Methylengruppierung ($>C = CH_2$) vorliegen, denn im IR.-Spektrum waren bei 6,08 μ und 11,33 μ[10]) (in KBr gepresst) zwei gut ausgebildete Absorptionsmaxima, die in Cholesterin und seinen Derivaten fehlten, sichtbar (vgl. Fig. 1).

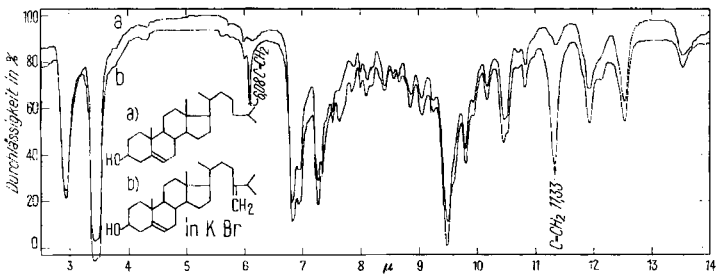


Fig. 1. *IR.-Abs.-Spektren von 24-Methylencholesterin aus Bienenköniginnen im Vergleich zu Cholesterin*[11])

Kurve a: Cholesterin (über Dibromid gereinigt); Kurve b: 24-Methylencholesterin aus Bienenköniginnen (um 7% T nach unten versetzt)

Unser Präparat und seine krist. O-Acetyl-Verbindung zeigten gleiche Eigenschaften wie 24-Methylencholesterin (I)[12]), das bisher nur aus einigen Mollusken isoliert

[7]) Ein Teil der Bienenköniginnen war nach dem Töten in Äthylalkohol eingelegt worden und wurde uns darin zugeschickt. Der abgegossene Äthylalkohol wurde mit den t-Butanolauszügen vereinigt.

[8]) Die Trennung dieser sauren Extrakte wird später beschrieben.

[9]) G. GORBACH, Mikrochim. Acta **31**, 320 (1944).

[10]) L. J. BELLAMY, The Infrared Spectra of Complex Molecules, London 1954, p. 44; R. R. BURFORD, F. R. HEWGILL & P. R. JEFFERIES, J. chem. Soc. **1957**, 2937; F. SONDHEIMER & R. MECHOULAM, J. Amer. chem. Soc. **79**, 5029 (1957); B. WILLHALM, U. STEINER & H. SCHINZ, Helv. **41**, 1359 (1958).

[11]) Aufgenommen von Herrn R. BÜHRER unter der Leitung von Herrn K. STICH auf einem PERKIN-ELMER IR.-Spektrographen, Modell 21, mit NaCl-Prismen.

[12]) D. R. IDLER & U. H. M. FAGERLUND, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1988 (1957); Chemistry & Ind. **1957**, 432; W. BERGMANN & J. P. DUSZA, Liebigs Ann. Chem. **603**, 36 (1957).

worden ist[13]) (vgl. Tab. 1). Herr Dr. D. R. IDLER[14]) sandte uns eine Probe von 3-O-Acetyl-24-methylen-cholesterin aus Austern. Dies ermöglichte den direkten Vergleich durch Mischprobe und im IR.-Spektrum (Fig. 2), wodurch sich die Identität bestätigen liess.

Tabelle 1. *Vergleich der physikalischen Konstanten von 24-Methylencholesterin (I) verschiedener Herkunft und von Cholesterin*

Herkunft	Freier Sterinalkohol		O-Acetyl-Verbindung	
	Smp.	$[\alpha]_D$ ($CHCl_3$)	Smp.	$[\alpha]_D$ ($CHCl_3$)
Authentische Probe aus Austern[13])	143°	−34,8°	135°	−44,1°
aus Bienenköniginnen	138–145°	−31,6 ± 6°	131–136°	−42,4°
aus Bienenarbeiterinnen	138–140°	−31,6 ± 2°	130–134°	−40,4°
Cholesterin	145–148°	−30°(Äther)	112°	−41,8°

Schliesslich konnte durch das Entgegenkommen der Herren Prof. S. BERGSTRÖM und Prof. E. STENHAGEN auch das Massenspektrogramm von II aufgenommen werden[15]). (Vgl. Fig. 3.) Danach waren beide Präparate nicht völlig einheitlich. Die Hauptbande entsprach in beiden Fällen aber der Massenzahl 380. Dies entspricht dem Bruchstück $C_{28}H_{44}$ (380,7), das aus II durch Eliminierung einer Molekel Essigsäure entsteht. Die Verunreinigungen stellen wahrscheinlich höhere Homologe und stärker ungesättigte Derivate dar. Letztere lassen sich auch im UV.-Spektrum nachweisen. Dieses zeigte in Cyclohexan neben der Hauptbande bei ca. 193 mμ ($\log \varepsilon$ = 4,04) noch deutliche Banden bei 270, 281 und 292 mμ, die vermutlich einem homo-

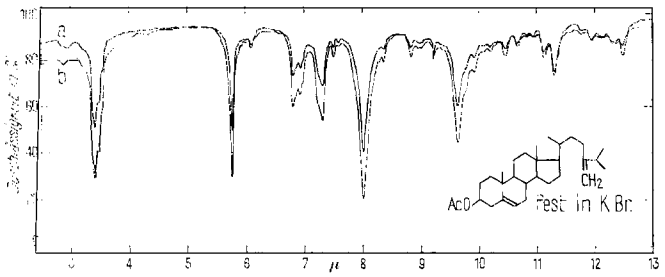


Fig. 2. *Vergleich im IR.-Spektrum von O-Acetyl-24-methylen-cholesterin (II) aus Bienenköniginnen mit authentischem Material*[11])

Kurve a: authentische Probe von II; Kurve b: II isoliert aus Bienenköniginnen (um 10% T nach unten versetzt)

[13]) D. R. IDLER & U. H. M. FAGERLUND, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4142 (1955); U. H. M. FAGERLUND & D. R. IDLER, J. org. Chemistry **21**, 372 (1956).

[14]) Wir möchten Herrn Dr. D. R. IDLER, Fisheries Research Board, Vancouver, Canada, auch an dieser Stelle für die wertvolle Unterstützung unserer Arbeit bestens danken.

[15]) Wir danken Herrn Prof. S. BERGSTRÖM, Stockholm, und Herrn Prof. E. STENHAGEN, Uppsala, für die Ausführung und Interpretation des Massenspektrogrammes.

annularen konjugierten Doppelbindungssystem wie in Ergosterol entsprechen. Die Höhe der Extinktion würde einem Gehalt von ca. 1% eines solchen Diens entsprechen[16]).

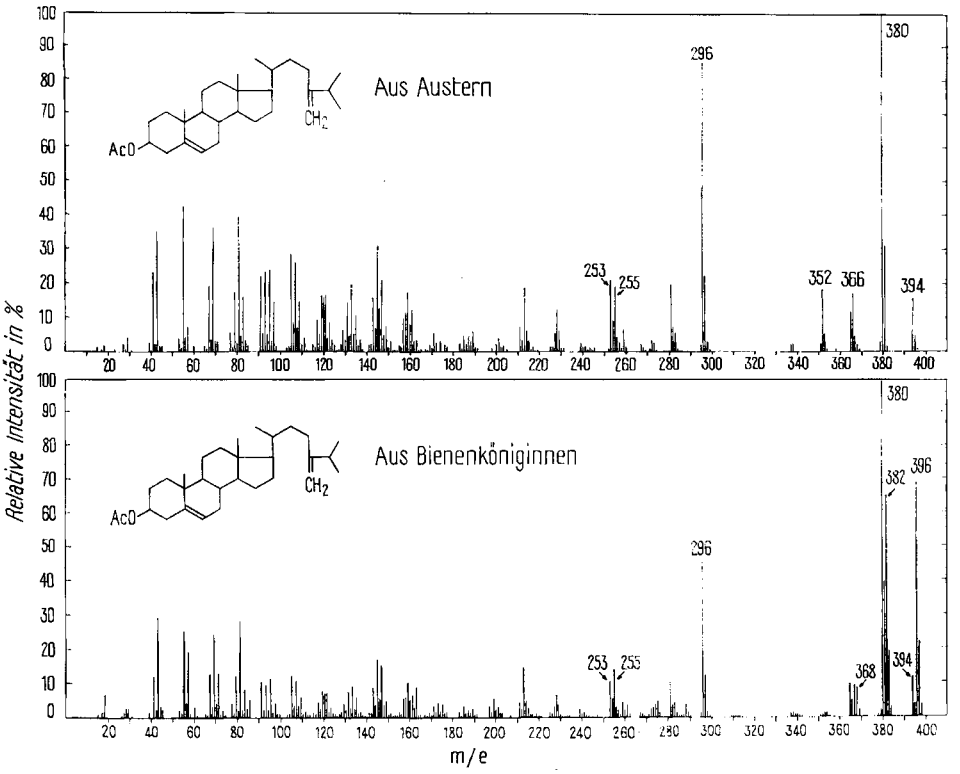
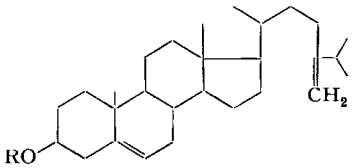


Fig. 3. *Vergleich von O-Acetyl-24-methylen-cholesterin (II) aus Austern und aus Bienenköniginnen im Massenspektrogramm*[15])

Auch auf chemischem Wege liess sich die Methylengruppe nachweisen, indem bei der Reaktion von II mit einem 10fachen Überschuss an O_3 26% des zu erwartenden Formaldehydes als Dimedon-Derivat (identifiziert durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und IR.-Spektrum) gefasst wurde.



I (R=H) Smp. 143° [−34,8] Chf
II (R=CH_3CO) Smp. 135° [−44,1] Chf

[16]) Herr Prof. H. LABHART, CIBA A.G., Basel, hatte die Freundlichkeit, die Identifizierung der beiden Proben auch im RÖNTGEN-Pulver-Diagramm zu versuchen. Für einen sicheren Beweis der Identität mit dieser Methode wäre es nötig gewesen, die beiden Proben unter den gleichen Bedingungen umzukristallisieren, wozu nicht genügend Substanz vorhanden war. Wir danken Herrn Prof. H. LABHART auch an dieser Stelle bestens für seine Hilfe.

Mit Rücksicht auf die besondere Stellung der Königin im Bienenstaat interessierte die Frage, ob 24-Methylencholesterin (I) auch in den Bienenarbeiterinnen enthalten sei. Zur Klärung dieser Frage wurde 1 kg von Bienenarbeiterinnen[17]) unter den gleichen Bedingungen extrahiert: aus den pentanlöslichen Neutralteilen wurde ebenfalls 24-Methylencholesterin (I) erhalten.

24-Methylencholesterin wurde bisher aus verschiedenen Mollusken isoliert[13]). Die Isolierung von Methylencholesterin aus einer Insektenart scheint uns bemerkenswert, weil nachgewiesen werden konnte, dass Cholesterin oder Ergosterin für eine Reihe von Insekten Vitamincharakter besitzt[18]).

Wir danken Herrn Prof. E. LEDERER für die Problemstellung, Herrn Prof. T. REICHSTEIN für die Förderung der Arbeit sowie dem *Centre National de la Recherche Scientifique*, Paris, und der CIBA A.G. für die finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Substanzproben zur Bestimmung der optischen Drehung und zur Aufnahme der UV.- und IR.-Spektren wurden 45 Min. bei 60° und 0,05 Torr getrocknet. Die Chromatographien wurden nach der Durchlaufmethode[19]) an Silicagel[20]) durchgeführt.

Extraktion der Bienen. – a) *Königinnen:* 1169 Bienenköniginnen wurden nach dem Töten in Äthanol eingelegt und per Luftpost nach Basel gesendet, wo sie bis zur Verarbeitung bei 0° aufbewahrt wurden. Zur Extraktion wurde der Alkohol auf einer Nutsche abgesaugt; die Bienen wurden mit 500 ml t-Butanol zerrieben und das Ganze 20 Std. bei 30° stehengelassen. Die noch warme Lösung wurde unter schwachem Saugen auf einer Nutsche abfiltriert und der abgehobene Brei der Insekten erneut mit 500 ml t-Butanol bei 30° extrahiert. Dies wurde insgesamt 8mal ausgeführt; der letzte (8.) Extrakt gab nach dem Eindampfen im Vakuum 78 mg Rückstand. Die übrigen Auszüge (inkl. dem Alkohol, in dem die Bienen vom Sammelort nach Basel transportiert worden waren) wurden im Vakuum im Stickstoff-Strom eingedampft und der Extrakt 3 Tage über P_2O_5 getrocknet: 19,934 g braune fettartige Masse[21]).

Dieser Rückstand wurde zehnmal mit Aceton kurz ausgekocht und die noch warmen Aceton-Auszüge von den ungelösten Anteilen abdekantiert. Die abdekantierte Lösung wurde im Vakuum im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft; Rückstand 8,894 g; in warmem Aceton unlöslicher Teil: 11,040 g.

Die im folgenden beschriebene Auftrennung der acetonlöslichen Teile wurde bei 0° durchgeführt (Ausbeuten s. Tab. 2). Hiezu wurde der Rückstand mit 15 g Eis zerrieben und soviel 2-n. HCl zugefügt, dass das pH = 2 war. Die saure Lösung wurde dreimal mit je 50 ml Pentan, dreimal mit je 50 ml Äther und dreimal mit je 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die 3 Pentan-Extrakte wurden jeweils viermal mit je 20 ml 2-n. Na_2CO_3 und zweimal mit je 20 ml Wasser ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft; Rückstand: pentanlösliche Neutralstoffe. Die vereinigten Sodalösungen und Waschwasser wurden mit 2-n. HCl auf pH = 2 gestellt und die angesäuerte Lösung dreimal mit je 100 ml Äther extrahiert. Die Äther-Lösung wurde zweimal mit je 20 ml Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft; Rückstand: pentanlösliche Säuren.

[17]) Wir danken Herrn Dr. R. CHAUVIN, Station de Recherches apicoles, Bures-sur-Yvette, France, für dieses Material. Die Bienen waren nur mit Blüten-Pollen gefüttert.

[18]) *Drosophila melanogaster:* E. G. VAN 'T HOOG, Zeitschr. Vitaminforschung **4**, 300 (1935) [Chem. Abstr. **30**, 1097 (1936)]; **5**, 118 (1936) [Chem. Abstr. **30**, 5311 (1936)]. – *Lucilia serigata:* R. P. HOBSON, Biochem. J. **29**, 2023 (1935), Chem. Abstr. **30**, 142 (1936). – *Acanthoscelides obtutus:* S. F. CHIU & MCCAY, Ann. entomol. Soc. Amer. **32**, 164 (1939). – *Tribolium confusum:* G. FRÖBRICH, Z. vgl. Physiol. **27**, 386 (1939); K. OFFHAM, *ibid.* **27**, 384 (1939).

[19]) T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Disc. Transact. Faraday Soc. **1949**, Nr. 7, 305.

[20]) Silicagel engporig 0,15–0,3 mm gekörnt «für Chromatographie» bezogen von Dr. BENDER & Dr. HOBEIN A.G., Zürich 42.

[21]) Die extrahierten Bienen wurden im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und wogen 54,9 g.

In der gleichen Art wurden die Äther-Auszüge viermal mit 2-n. Na_2CO_3 und zweimal mit Wasser ausgezogen. Die angesäuerten vereinigten wässerigen Auszüge wurden mit Äther ausgeschüttelt und gleich behandelt wie die Säuren enthaltenden Auszüge der Pentan-Extrakte: ätherlösliche Neutralstoffe und ätherlösliche Säuren. Die Chloroform-Auszüge wurden ebenfalls in neutrale und sodalösliche Teile zerlegt.

Tabelle 2. *Auftrennung von 8,894 g acetonlöslicher Extrakte aus 1169 Bienenköniginnen*

	Pentan-löslich	Äther-löslich	Chloroform-löslich
Neutralteil	3,502 g	63 mg	8,5 mg
Säureteil	2,445 g	162 mg	2 mg

b) *Arbeiterinnen:* 1 kg in Ätheratmosphäre abgetötete Arbeiterinnen wurden in trockenem Zustande nach Basel geschickt. Hier wurden die Bienen im Turmix in 1 l t-Butanol fein zermahlen und das Ganze 24 Std. in verschlossenem Gefäss auf 30° erwärmt. Dann wurde unter schwachem Saugen auf einer Nutsche abfiltriert und der abgehobene Brei noch 8mal mit je 1 l t-Butanol extrahiert. Die vereinigten t-Butanol-Extrakte wurden im Vakuum im Stickstoffstrom eingedampft; Rückstand 90,950 g. Dieser salbenartige Rückstand wurde durch wiederholtes Auskochen mit Aceton extrahiert und die vereinigten Aceton-Auszüge im Vakuum eingedampft. Auf diese Weise wurden erhalten: Acetonlöslicher Teil: 26,450 g, acetonunlöslicher Teil: 64,5 g[22]). 7,335 g des acetonlöslichen Teiles wurden in analoger Art, wie dies für die Königinnen beschrieben wurde, getrennt und dabei die in Tab. 3 angegebenen Ausbeuten erhalten.

19,115 g des restlichen Materiales wurde mit 20 g Eis zerrieben und mit soviel 2-n. HCl versetzt, dass das pH = 2 war. Die Suspension wurde dreimal mit je 200 ml Pentan ausgeschüttelt. Die Pentanlösungen wurden viermal mit je 50 ml 2-n. Na_2CO_3 und zweimal mit je 50 ml Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft; Rückstand Neutralteil: 6,003 g. Die vereinigten Sodalösungen und das Waschwasser wurden mit 2-n. HCl angesäuert und viermal mit je 100 ml Äther extrahiert. Die Ätherlösungen wurden zweimal mit je ca. 30 ml Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft; Rückstand 9,314 g.

Tabelle 3. *Auftrennung von 26,45 g acetonlöslichen Teilen aus 1 kg Bienenarbeiterinnen*

Löslich in		Pentan	Äther	Chloroform
Neutralteil aus. . . .	7,335 g	2,309 g	0,269 g	33,5 mg
	19,115 g	6,003 g		
Säureteil aus	7,335 g	1,715 g	0,465 g	21,7 mg
	19,115 g	9,314 g		

Isolierung und Charakterisierung von 24-Methylencholesterin aus den pentanlöslichen Neutralteilen. – a) *Isolierung aus Bienenköniginnen:* 1,6 g der in Tab. 2 angegebenen pentanlöslichen Neutralstoffe (entspr. ca. 534 Königinnen) wurden an 50 g Silicagel chromatographiert. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 160 ml der in Tab. 4 angegebenen Lösungsmittel.

Die aus den Fraktionen 14–19 erhaltenen Kristalle wurden zweimal aus Methanol umkristallisiert. Dabei wurden 25,2 mg farblose Blättchen Smp. 132–141° erhalten. Diese wurden im Molekularkolben destilliert. Zwischen 100–135° Badtemperatur und 0,02 Torr wurde 21,7 mg Destillat erhalten, das nach dem Umkristallisieren aus Methanol 17,6 mg farblose Blättchen Smp. 138–145° lieferte; $[\alpha]_D^{25} = -37{,}8 \pm 3°$ (c = 0,68 in Chloroform).

[22]) Die extrahierten Bienen wogen nach dem Trocknen im Vakuum 230 g.

[23]) Die Untersuchung dieser Fraktionen wird später durchgeführt.

Die zweite Hälfte des in Tab. 2 beschriebenen Neutralteiles wurde in der gleichen Art chromatographiert. Dabei wurden 11,9 mg 24-Methylencholesterin (I), Smp. 138–145°, erhalten; Totalausbeute an reinstem Produkt aus 1169 Königinnen somit 33,6 mg (ca. 0,045%).

b) *Isolierung aus Bienenarbeiterinnen:* 6,003 g pentanlösliche Neutralteile aus Bienenarbeiterinnen (vgl. Tab. 3; entspr. 722 g Bienen) wurden an 180 g Silicagel chromatographiert. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 600 ml der in Tab. 5 angegebenen Lösungsmittel.

Tabelle 4. *Chromatographie an Silicagel der pentanlöslichen Neutralteile aus Bienenköniginnen*

Frakt.-Nr.	Lösungsmittel	mg Eindampfrückstand	LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion	Smp. der Krist. aus Methanol
1–5	Pentan-Benzol-(1:1)	828,5	blau → grün[23])	amorph
6–9	Pentan-Benzol-(1:4)	175	blau → grün[23])	amorph
10–13	Benzol	15,1	negativ	amorph
14–19	Benzol-Äther-(4:1)	83,2	blau → blau-grün	132–141°
20–22	Benzol-Äther-(3:2)	0,5		amorph
23–25	Benzol-Äther-(2:3)	0,5		amorph
26–28	Benzol-Äther-(1:4)	8,5		amorph
29–32	Äther	0,5		amorph
33–34	Chloroform	0,5		amorph
35–39	Gemisch + 2% Eisessig	51,0		amorph

Nach zweimaligem Umkristallisieren wurden aus den Frakt. 12–14 insgesamt 332 mg gelb gefärbte Blättchen, Smp. 114–127° erhalten. Diese wurden durch Destillation im Molekularkolben gereinigt. Zwischen 110–140° Badtemperatur und 0,02 Torr destillierten dabei 162,5 mg, die aus Methanol 128 mg farblose Blättchen Smp. 138–140° lieferten; $[\alpha]_D^{24} = -31{,}6 \pm 2°$ (c = 1,18 in Chloroform).

Aus dem restlichen Teil der pentanlöslichen Neutralstoffe wurde durch Chromatographie an 65 g Silicagel 54 mg Methylencholesterin Smp. 138–140° erhalten; Totalausbeute aus 1 kg Bienen: 182 mg (0,018%).

Tabelle 5. *Chromatographie an Silicagel der pentanlöslichen Neutralteile aus Bienenarbeiterinnen*

Frakt.-Nr.	Lösungsmittel	mg Eindampfrückstand	LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion	Habitus; bei Krist. Smp. aus Methanol
1–3	Petroläther-Benzol-(1:2)	2372	blau[23]) intensiv grün[23])	amorph
4–8	Petroläther-Benzol-(1:4)	1216	blau[23]) intensiv grün[23])	amorph
9–11	Benzol	767	negativ	amorph
12–14	Benzol	354,5	blau → blau-grün	114–127°
15–16	Benzol	99,2		amorph
17–19	Benzol-Äther-(4:1)	20,1		amorph
20–25	Äther	852		amorph

O-Acetyl-24-methylencholesterin (II). – a) *Aus Bienenköniginnen-Sterin:* 9,7 mg Sterin I, Smp. 138–145°, wurden in 0,2 ml Pyridin gelöst, mit 0,15 ml Acetanhydrid versetzt und 17 Std. auf 37° erwärmt. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft, in 5 ml Chloroform-Äther aufgenommen und dreimal mit je 2 ml 2-n. HCl, 2-n. Na_2CO_3 und Wasser neutral gewaschen, über Na_2SO_4 ge-

trocknet und eingedampft. Der neutrale Rückstand, 9,8 mg, gab aus Methanol 7,8 mg farblose Plättchen, Smp. 134–136°; $[\alpha]_D^{25} = -42{,}4 \pm 3°$ (c = 0,75 in Chloroform). Diese Kristalle gaben mit dem Ausgangsmaterial vermischt eine starke Smp.-Depression.

b) *Aus Bienenarbeiterinnen-Sterin:* 86,1 mg Sterin I, Smp. 138–140°, wurden in 1 ml Pyridin gelöst, mit 0,95 ml Acetanhydrid versetzt und 17 Std. auf 37° erwärmt. Die gleiche Aufarbeitung wie unter a) beschrieben lieferte 98 mg neutrales Rohprodukt, welches aus Methanol 68,1 mg farblose Plättchen Smp. 131–134° gab; $[\alpha]_D^{25} = -40{,}3 \pm 4°$ (c = 0,71 in Chloroform).

Nachweis von Formaldehyd unter den Ozonolyse-Produkten des erhaltenen 3-O-Acetyl-24-methylencholesterins (II). 64,8 mg 3-O-Acetyl-24-methylencholesterin (II) wurden in einem Dest.-Kolben von 50 ml Inhalt in 10 ml Essigsäure gelöst. Durch diese Lösung wurde unter Kühlung mit Wasser auf 20° ein mit Ozon beladener Sauerstoffstrom (entspr. 10 Mol. O_3) geleitet. Dann wurden 10 ml Wasser zugesetzt und ca. $^2/_3$ der Lösung abdestilliert. Das Destillat wurde in eine Lösung von 100 mg Dimedon (= Dimethyl-dihydro-resorcin) in 20 ml Wasser eingeleitet. Durch Zusatz von 2-n. Na_2CO_3 wurde das pH auf 5 gestellt und anschliessend die Lösung 30 Min. in schwachem Sieden gehalten. Nach dem Abkühlen wurden die ausgeschiedenen Kristalle abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet; Ausbeute 11,6 mg Nadeln. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol Smp. 193–194°; Misch-Smp. mit authentischem Formaldehyd-Dimedon-Derivat ohne Depression[24]).

Die im Dest.-Kolben zurückbleibende wässerige Lösung wurde mit 10 ml Wasser verdünnt und dreimal mit je 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Lösungen wurden dreimal mit je 5 ml 2-n. Na_2CO_3 und zweimal mit je 5 ml Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Aus dem Rückstand, 65,4 mg, wurde im Molekularkolben bei 0,01 Torr und 180° Badtemperatur 45,6 mg farbloses Destillat erhalten, in dem sich durch Dünnschichtchromatographie 3-O-Acetyl-24-keto-cholesterin[14]) neben mindestens 5 anderen Substanzen nachweisen liess. Die Trennung dieses Gemisches wurde nicht durchgeführt.

Oxydation von 24-Methylencholesterin (I) nach OPPENAUER. Die Lösung von 1,0 mg 24-Methylencholesterin (I) (aus Bienenköniginnen) in 2 ml Toluol wurde mit 0,2 ml Cyclohexanon versetzt und im Dest.-Kolben zum Sieden erhitzt. Innerhalb von 30 Min. wurde langsam in der gleichen Geschwindigkeit, wie das Toluol abdestillierte, eine Lösung von 8 mg Al-Isopropylat in 1 ml Toluol zugetropft. Hierauf wurde mit 1 ml einer gesättigten wässerigen Lösung von Na-K-Tartrat versetzt und dreimal mit je 10 ml Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherlösungen wurden dreimal mit je 0,5 ml Na-K-Tartrat-Lösung und zweimal mit je 0,5 ml Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand, 1,5 mg, wurde im Molekularkolben bei 0,03 Torr und 95–130° Badtemperatur destilliert. Das farblose Destillat, 1,35 mg, lieferte aus Methanol 0,35 mg farblose Rosetten Smp. 76–84°; UV.-Abs.-Spektrum: λ_{max} 241 mμ (log ε = 4,0). Mit Cholestenon vom Smp. 73–79° gab die Substanz eine Smp.-Depression von 6–12°.

Titrimetrische Bestimmung der Aufnahme von Brom von 24-Methylencholesterin (I)[25]). In einem 7-ml-Schliffkölbchen wurden 1,155 mg 24-Methylencholesterin (aus Bienenköniginnen) eingewogen, in 1 ml reinstem Eisessig gelöst und mit 0,500 ml einer 0,04-n. Bromlösung in Eisessig versetzt. Nachdem 2 Min. im verschlossenen Gefäss magnetisch gerührt worden war, wurde 4 Std. bei 20° im Dunkeln stehengelassen. Dann wurde mit 1 ml Wasser und ca. 4 Kristallen KJ versetzt und hierauf unter Rühren mit 0,02-n. $Na_2S_2O_3$ mit Thyodene als Indikator titriert. Unter den genau gleichen Bedingungen wurde eine Bestimmung ohne Substanz durchgeführt. Die Differenz des Verbrauches entsprach 0,583 ml 0,02-n. Brom-Lösung entspr. 0,934 mg Brom oder 2,01 Mol., ber. auf $C_{28}H_{44}O$ (396,6). In einem Parallelversuch verbrauchte Cholesterin 0,96 Mol. Brom.

Zusammenfassung

Aus den pentanlöslichen Neutralstoffen von t-Butanol-Extrakten von Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene (*Apis mellifica* L.) konnte 24-Methylencholesterin isoliert werden.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

---

[24]) In Vorversuchen wurden aus Limonen unter den gleichen Reaktionsbedingungen 52% der Th. an Formaldehyd-dimedon gefasst.

[25]) Wir danken Herrn E. FLURY für die Durchführung dieser Bestimmung.