

Die Synthese von radioaktiv markierten langkettigen Alkyl-Cholesterinäthern

(Kurze Mitteilung)

Von

F. Paltauf

Aus dem Institut für physiologische Chemie der Universität Graz

(Eingegangen am 4. April 1968)

Zur Herstellung von Äthern des Cholesterins mit Alkoholen bis zu 10 C-Atomen wurden verschiedene Methoden beschrieben, so die Umsetzung von Cholesterinkalium mit Alkylhalogeniden¹ bzw. von Cholesterylchlorid mit Alkoholen^{2, 3}, Kondensation von Alkoholen und Cholesterin in Gegenwart wasserentziehender Mittel⁴ sowie Reaktion von Alkoholen mit Cholesterintosylat in neutralem oder alkalischem Medium^{5, 6}.

Die von uns als Vergleichssubstanzen für eventuell natürlich vorkommende Cholesterinäther bzw. als Modellsubstanzen für Cholesterinester benötigten Cholesterinäther höherer Alkohole mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen sind bisher nicht bekannt. Als zur Herstellung dieser Verbindungen geeignete Methode erwies sich die Umsetzung von Alkylmethansulfonaten mit Cholesterin in Gegenwart von Kaliumhydroxid in siedendem Benzol. Die in guten Ausbeuten entstehenden Cholesterinäther wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel und Kristallisation gereinigt. Reinheit und Identität der Substanzen sind durch Dünnschichtchromatogramme, Elementaranalysen, Molekulargewichtsbestimmungen und Kernresonanzspektren bewiesen.

¹ W. Steinkopf und E. Blümner, J. prakt. Chem. [2] **84**, 460 (1911).

² O. Diels und P. Blumberg, Ber. dtsch. chem. Ges. **44**, 2847 (1911).

³ Th. Wagner-Jauregg und I. Werner, Z. physiol. Chem. **213**, 119 (1932).

⁴ Ch. Bills und Fr. McDonald, J. Biol. Chem. **72**, 1 (1927).

⁵ W. Stoll, Z. physiol. Chem. **246**, 1 (1937).

⁶ H. McKennis, J. Amer. Chem. Soc. **70**, 675 (1948).

Wie zu erwarten, zeigt das physikalische Verhalten der Cholesterin-äther große Ähnlichkeit mit dem der entsprechenden Cholesterinester. Die Schmelzpunkte der homologen Verbindungen mit 12, 14 und 16 C-Atomen im Alkylrest zeigen in beiden Reihen ein Minimum bei C₁₄. Die spezifischen Drehwerte nehmen mit zunehmender Kettenlänge des Substituenten und dem Eintritt einer Doppelbindung in den Alkylrest ab. Die *R_f*-Werte der Dünnschichtchromatogramme sind mit den angegebenen Laufmitteln für Äther und Ester praktisch identisch (Tab. 1).

Tabelle 1. Physikalische Eigenschaften der Cholesterinalkyläther und der entsprechenden Cholesterinester

Alkyl- bzw. Acylrest	Cholesterinäther			Cholesterinester ⁷		
	Schmp., °C	$[\alpha]_D^{25^\circ}$	<i>hR_f</i>	Schmp., °C	$[\alpha]_D^{20^\circ}$	<i>hR_f</i>
C ₁₂	73°	— 24,6		91—92	— 30,6	
C ₁₄	50°	— 22,8		70—70,5	— 26,9	
C ₁₆	57°	— 22,0	8*	77—78	— 24,8	8*
C ₁₈ '	35°	— 21,3	64**	46,5—47	— 24,5	64**

* Laufmittel *PÄ* (Petroläther, Siedebereich 40—60°)

** Laufmittel *PÄ* — Äther (9 : 1).

Im Kernresonanzspektrum von I erscheint für das Proton am C-3 des Cholesterins ein flaches Signal bei $\delta = 3$ ppm, dessen Intensität sich zu der des Triplets der beiden Protonen am C-1 des Alkylrestes ($\delta = 3,4$ ppm) wie 1 : 2 verhält; eine teilweise Isomerisierung am C-3 des Cholesterins ist also auszuschließen. Nachdem bei der Reaktion von Cholesterin bzw. Cholesterinkalium mit dem Alkylmesylat keine Konfigurationsumkehr am C-3 des Cholesterins zu erwarten ist und Cholesterin sich auch bei längerem Kochen in Benzol in Gegenwart von KOH nicht epimerisiert, wie die anschließende quantitative Fällbarkeit mit Digitonin zeigte, liegen die Cholesterinalkyläther als Derivate des β -Cholesterins vor.

3-O-(9,10-³H-*cis*-9-Octadecenyl)-cholesterin (IVa) wurde analog zur inaktiven Verbindung IV hergestellt. Die radioaktive Markierung im Alkylrest erleichterte die Identifizierung einiger bei der Reaktion auftretender Nebenprodukte. Im Dünnschichtchromatogramm des Rohproduktes sind 4 Flecke zu sehen, von denen der am weitesten laufende auf Grund seines *R_f*-Wertes und der dem eingesetzten Octadecenylmesylat entsprechenden spezifischen Aktivität dem Octadecadien zuzuschreiben ist. Der zweite Fleck knapp über dem Cholesterinäther konnte durch seine spezifische Aktivität, sowie im Falle der Verbindung I durch

⁷ V. Mahadevan und W. O. Lundberg, J. Lipid Res. 3, 108 (1962).

Vergleich des *R_f*-Wertes und der gaschromatographischen Retentionszeit, mit authentischem Didodecyläther als Dialkyläther identifiziert werden. Im Startfleck waren 12% der eingesetzten Aktivität enthalten. Die zugehörigen Verbindungen wurden nicht näher untersucht.

Experimenteller Teil

Cholesterin und Fettalkohole, Reinheitsgrad puriss., stammten von der Firma Fluka (Buchs, SG.), 9,10-³H-Ölsäure vom Radiochemical Centre (Amersham, England).

Schmelzpunkte wurden mit dem Schmelzpunktapparat nach *Tottoli* der Fa. Büchi (Flawil, SG.) bestimmt und sind unkorrigiert. Messung der optischen Aktivität erfolgte in 2proz. Lösung in CHCl₃ mit einem lichtelektrischen Polarimeter, Modell PE 141, der Fa. Perkin-Elmer (Zürich). NMR-Spektren wurden mit einem Varian A 60 A aufgenommen, Radioaktivität mit einem Tricarb Flüssigkeitsszintillationszähler, Mod. 3315, der Fa. Packard Instruments (Downers Grove, Ill.) gemessen. Mikroanalysen stammen aus dem *Pregl*-Laboratorium des Institutes für Medizinische Chemie der Universität Graz bzw. aus dem Mikrolabor der Fa. Sandoz AG, Basel.

Der Verlauf der Reaktionen und die Reinheit der Substanzen wurden dünnenschichtchromatographisch auf Kieselgel H (Merck, Darmstadt) überprüft, als Laufmittel diente *P_A* (Siedebereich 40–60°). Zur deutlichen Trennung der Cholesterinäther von den als Nebenprodukt auftretenden Dialkyläthern war dreimaliges Entwickeln der Platten notwendig. Die Flecke wurden mit Joddampf oder nach Besprühen mit Chromschwefelsäure und anschließendem Verkohlen sichtbar gemacht. Gaschromatographie des Didoecyläthers erfolgte auf einem Microtek 2000-R unter folgenden Bedingungen: Stahlsäule 100 × 0,4 cm, 3% SE 30 auf Chromosorb W, Säulentemperatur 180°, Trägergas N₂ 30 ml/min.

Alkylmethansulfonate sind nach der Vorschrift von *Baumann* und *Mangold* in guter Ausbeute zugänglich⁸.

3-O-Dodecylcholesterin (I)

1,6 g Cholesterin (4,15 mMol), gelöst in 25 ml trockenem Benzol, und 1,5 g gepulvertes KOH werden unter Rühren in Stickstoffatmosphäre zum Sieden erhitzt. Das hierbei entstehende Wasser wird über einen Wasserabscheider entfernt. Nach 10 Min. läßt man 1,05 g (4 mMol) n-Dodecylmesylat, gelöst in 20 ml trockenem Benzol, zutropfen. Nach 10 Stdn. Sieden unter Rückfluß, anschließendem Abdestillieren von etwa 25 ml Benzol, Abkühlen und Hinzufügen von 50 ml Wasser wird mehrmals ausgeäthert, die Ätherphase mit Wasser neutral gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels verbleiben 2,4 g kristalliner Rückstand. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Säulenchromatographie an 90 g Kieselsäure (0,02–0,2 mm, Merck, Darmstadt) nach dem angegebenen Schema (s. S. 1280).

Spuren Didoecyläther in Fraktion C lassen sich durch einmaliges Umkristallisieren aus Aceton entfernen. Ausbeute: 1,1 g (50% d. Th.). Die Verbindungen II, III und IV wurden analog hergestellt (s. Tab. 2).

⁸ W. J. Baumann und H. K. Mangold, J. Org. Chem. **29**, 3055 (1964).

Fraktion	Elutionsmittel	Eluierte Substanz	<i>hRf</i> *
A	<i>PA</i> , 500 ml	<i>KW</i>	80
B	<i>PA</i> —Benzol (9 : 1) 500 ml	<i>DA</i> $\bar{A}$	12
C	<i>PA</i> —Benzol (8 : 2) 1000 ml	<i>Ch</i> $\bar{A}$	8

PA = Petroläther, Sdp. 40—60°.

KW = Kohlenwasserstoff, *DA* $\bar{A}$ = Dialkyläther, *Ch* $\bar{A}$ = Cholesterin-alkyläther.

* Laufmittel Petroläther, 3mal entwickelt.

3-O-(9,10-³H-*cis*-9-Octadecenyl)-cholesterin (IV a)

740 mg 9,10-³H-Octadecenylmesylat* (2,2 mMol, spez. Akt. $66 \cdot 10^6$ cpm/mMol) und 1 g Cholesterin (2,6 mMol) wurden wie oben beschrieben umgesetzt. Fraktion A enthielt 2,4 mg Octadecadien, spez. Akt. $62 \cdot 10^6$ cpm/mMol, Fraktion B 11,5 mg nahezu reinen Dioctadecenyläther, spez. Akt. $128 \cdot 10^6$ cpm/mMol. Aus Fraktion C wurden nach Umkristallisieren aus Aceton 690 mg IV a gewonnen (spez. Aktivität $66 \cdot 10^6$ cpm/mMol). Ausb. 50% d. Th., bezogen auf eingesetztes Octadecenylmesylat.

Tabelle 2. Cholesterinalkyläther

Alkylrest		Ausb., % d. Th.	Mol. Gewicht		C	H	O	C	H	O
			ber.	gef.	ber.			gef.		
I	C ₁₂	50	555	562	84,5	12,6	2,9	84,6	12,8	2,8
II	C ₁₄	52	583	576	84,5	12,7	2,8	84,7	13,0	2,7
III	C ₁₆	48	611	639	84,5	12,9	2,6	84,9	13,2	2,8
IV	C ₁₈ '	50	637	619	85,0	12,5	2,5	85,2	12,7	2,6

Dem Österreichischen Forschungsrat, der uns einen Gaschromatographen zur Verfügung gestellt hat, sei auch an dieser Stelle gedankt.

* Hergestellt durch Reduktion von 9,10-³H-Ölsäuremethylester mit Lithiumaluminiumhydrid und Umsetzen des Octadecenols mit Methansulfonylchlorid.