

### III. Befreiung der Phospho-esterase vom Wirkungs-Optimum $p_H = 9.5$ von der sauren Phospho-esterase.

Die Ausführung der selektiven Zerstörung der im sauren Gebiete wirk-samen Phospho-esterase zeigt nachstehender Versuch:

20 g Trockenpräparat (Schweine-Leber B) wurden 2 Stdn. bei 20° mit 600 ccm  $n/_{20}$ -Ammoniak-Lösung ausgezogen. In der Lösung befanden sich: 15.0 Ph.-E.-[e]<sub>5.5</sub>, 6.0 Ph.-E.-[e]<sub>9</sub><sup>-</sup>, 50.0 Ph.-E.-[e]<sub>9</sub><sup>+</sup>. Nach 4- bzw. 8-tägigem Stehen bei 30° ergab die Analyse:

1.1 Ph.-E.-[e] <sub>5.5</sub> ,	5.5 Ph.-E.-[e] <sub>9</sub> <sup>-</sup> ,	14.5 Ph.-E.-[e] <sub>9</sub> <sup>+</sup>
bzw. 0	„ 3.7	„ 7.5

Dem Ingenieurdienst E. V., Bezirksstelle Stuttgart, sowie der Vereinigung von Freunden der Technischen Hochschule Stutt-gart danken wir aufrichtig für die Förderung unserer Untersuchungen.

#### 403. E. Fernholz und P. N. Chakravorty:

##### Die Lage der Hydroxylgruppe im Ergosterin und Stigmasterin.

[Aus d. Allgem. Chem. Universitäts-Laborat. Göttingen].

(Eingegangen am 16. November 1934.)

Ergosterin und Stigmasterin, früher zwei wenig beachtete Stoffe, haben in der letzten Zeit ein bedeutendes Interesse gewonnen. Vom Ergo-sterin weiß man schon mehrere Jahre, daß es bei Bestrahlung in das Vitamin D übergeht; das Stigmasterin gewann seine Bedeutung ganz kürzlich durch seine Überführung in das Corpus-luteum-Hormon<sup>1)</sup>. Für die Aufklärung der Konstitution dieser physiologisch so interessanten Substanzen ist es naturgemäß nötig, die Konstitution ihrer Ausgangsmaterialien in jedem Punkte zu sichern. Ein noch etwas zweifelhafter Punkt in den Formeln dieser Sterine schien uns nun die Stellung der Hydroxylgruppe zu sein.

Kürzlich konnten A. Windaus, H. H. Inhoffen und S. v. Reichel<sup>2)</sup> unter Zusammenfassung einer Reihe von Versuchs-Ergebnissen wohl die Stellung der Hydroxylgruppe im Ergosterin aufklären, doch schien es wün-schenswert, hier noch einen direkten und anschaulicheren Beweis zu führen. Beim Stigmasterin war dies noch unbedingt nötig, denn der Nachweis für die Lage der Kern-Doppelbindung dieses Sterins hatte zur Voraussetzung daß die Hydroxylgruppe wie beim Cholesterin am C<sub>3</sub> haftet.

Um nun diese Lücke auszufüllen, gingen wir nach dem Vorbilde von Windaus und Hossfeld<sup>3)</sup> zur Oxydation der Chlor-Substitutions-produkte der gesättigten Alkohole über, wie es auch von Heilbron und Mitarbeitern<sup>4)</sup> versucht wurde. Die Ausbeuten waren aber so schlecht, daß eine Überführung in die Oxy- oder Keto-säure, die sich nicht umgehen ließ, beträchtliche Schwierigkeiten bereitete. Kürzlich konnten nun Ruzicka und Mitarbeiter<sup>4)</sup> zeigen, daß schon die Acetylierung genügt, um in gewissem Maße die Ringsprengung bei der Oxydation mit Chromsäure zu vermeiden.

<sup>1)</sup> E. Fernholz, B. **67**, 1855 [1934] u. auf S. 2027 folgende Arbeit.

<sup>2)</sup> A. **510**, 248 [1934].

<sup>3)</sup> E. Fernholz, A. **508**, 215 [1934].

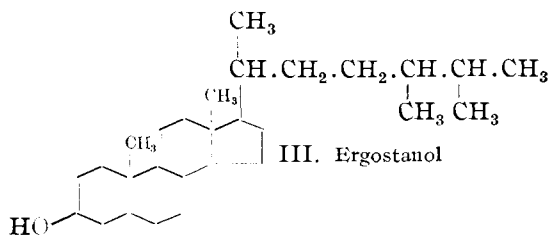
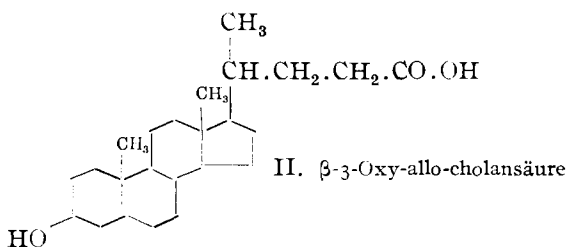
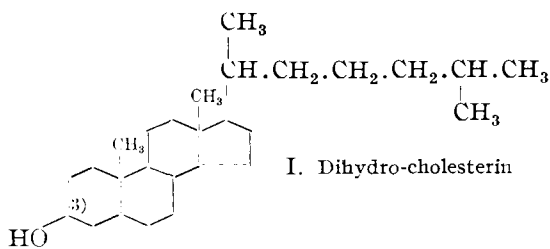
<sup>4)</sup> Helv. chim. Acta **17**, 1389, 1395 [1934].

<sup>5)</sup> A. Windaus u. R. Hossfeld, Ztschr. physiol. Chem. **145**, 177 [1925].

Sie konnten aus Dihydro-cholesterin und seinen 3 Isomeren in kleiner Ausbeute Acetate von Oxy-ketonen gewinnen, bei denen die ganze Seitenkette entfernt und an ihre Stelle eine Ketogruppe getreten war. Als besonders interessantes Produkt befand sich darunter auch das Androsteron.

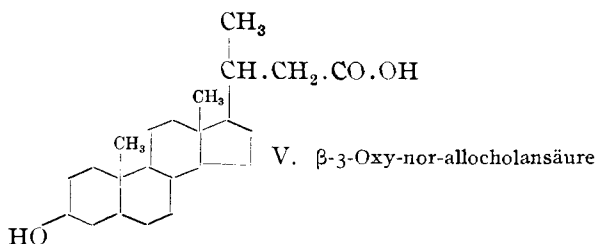
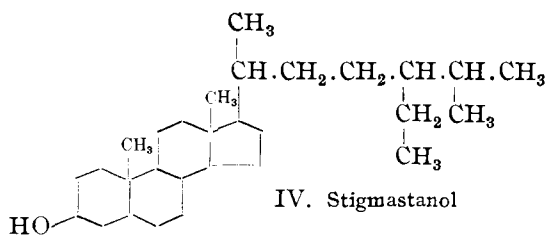
Es war deshalb wohl anzunehmen, daß sich auch die Monocarbonsäure isolieren lassen würde, die durch Abspaltung von Aceton aus Dihydro-cholesterin entsteht, wenn auch Windaus und Hossfeld<sup>5)</sup> sie bei dieser Reaktion nicht isoliert haben. In seiner Dissertation<sup>6)</sup> beschreibt R. Hossfeld eine Monocarbonsäure, die er in geringer Menge bei der Oxydation des Cholestan-3,6-diol-diacetats erhalten hat. Im Prinzip war also eine solche Möglichkeit wohl schon festgestellt worden<sup>7)</sup>.

Wir fanden nun, daß es bei Anwendung genügender Mengen gar nicht sehr schwierig ist, die Abbau-Säure des Dihydro-cholesterin-acetats zu isolieren, wenn auch die Ringsprengung immer noch die Hauptreaktion bleibt.



<sup>6)</sup> Göttingen 1925, S. 25.

<sup>7)</sup> Daß bei der Oxydation der Kohlenwasserstoffe — Ergostan — in geringer Menge auch Ketone entstehen, hebt C. K. Chuang, A. 500, 278 [1933], besonders hervor.



Uns hat die Reaktion nur insoweit interessiert, als sie es uns ermöglichte, durch Abbau einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe mit großer Wahrscheinlichkeit zu derselben Säure zu kommen, wie sie beim Ergostanol (III) und Stigmastanol (IV) zu erwarten war.

Wir haben das Dihydro-cholesterin-acetat also in der von Ruzicka angegebenen Weise oxydiert, das schwerlösliche Natriumsalz, das auch Ruzicka beobachtete, abgetrennt und gleich durch Erwärmen mit wäßriger Lauge in das der Oxy-säure verwandelt. Diese Oxy-säure erwies sich als identisch mit der von H. Wieland, E. Dane und C. Martius<sup>8)</sup> dargestellten  $\beta$ -3-Oxy-allo-cholansäure (II), denn sie schmolz bei  $218^\circ$  und ihr Methylester bei  $151^\circ$ , in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur.

Es ist nun bemerkenswert, daß diese Säure nicht dieselbe sterische Anordnung des Hydroxyls besitzt, wie sie ursprünglich in der Hyodesoxy-cholsäure vorgelegen hat, aus der sie Wieland darstellte. Sie ist über die Dehydro-hyodesoxy-cholsäure, eine Diketo-säure, dargestellt worden. Im Cholesterin und in der Hyodesoxy-cholsäure tritt also die Hydroxylgruppe am  $\text{C}_3$  in verschiedener sterischer Anordnung auf.

Zu der 3-Oxy-allo-cholan-säure, die noch die in der Hyodesoxy-cholsäure vorliegende Anordnung hat, kommt man durch Verseifen der 3-Chlor-allocholansäure<sup>5)6)</sup>, die man bei der Oxydation von Chlor-cholestan erhält. Es tritt hierbei Waldensche Umkehrung ein.

Demselben Abbau als Acetate unterworfen, ergaben Ergostanol (III) und Stigmastanol (IV) eine Oxy-säure (V), die sich von der aus Dihydro-cholesterin (I) tatsächlich nur dadurch unterscheidet, daß ihre Seitenkette etwa eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe kürzer ist. Bei Verkürzung der Seitenkette der  $\beta$ -3-Oxy-allocholansäure (II) nach der nun schon so häufig benutzten Methode der Diphenyl-carbinole von Wieland, Schlichting und Jacobi<sup>9)</sup>, die

<sup>8)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **215**, 15 [1933].

<sup>9)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **161**, 80 [1926].

sich auch auf diese Oxy-säure übertragen ließ, wenn man die Hydroxylgruppe am C<sub>3</sub> durch Acetylieren schützte, wurde nämlich die gleiche Säure erhalten. Sie soll in Fortsetzung der von Wieland begonnenen Nomenklatur als  $\beta$ -3-Oxy-nor-allocholansäure bezeichnet werden. Sie schmilzt bei 226°, der Methylester bei 156° und dessen Acetat bei 163°.

Bei der Oxydation des Stigmastanol-acetats entstand aber in geringer Menge noch eine andere Säure vom Schmp. 221°. Wir fanden ein Äquivalentgewicht von 426, während sich für die 3-Oxy-allo-cholansäure 376 errechnet. Es ist sicher nicht ein Acetat der obigen Säure, da sie sich beim Kochen mit Kalilauge nicht verändert. Sie wurde noch nicht näher untersucht.

In übersichtlicher Weise ist nun die Lage und sterische Anordnung der Hydroxylgruppe im Ergosterin und Stigmasterin bewiesen; ihre Beziehungen zum Cholesterin sind in allen Punkten gesichert.

### Beschreibung der Versuche.

$\beta$ -3-Oxy-allo-cholansäure aus Dihydro-cholesterin-acetat.

Nach den Angaben von Ruzicka<sup>4)</sup> wurden in einem Ansatz 40 g Dihydro-cholesterin-acetat der Oxydation mit Chromsäure unterworfen. Die Eisessig-Lösung wurde mit viel Wasser verdünnt und das organische Material in Äther aufgenommen. Zunächst wurden die trotz mehrfachen Waschens mit Wasser immer im Äther bleibenden Reste von Essigsäure durch Zusatz kleiner Mengen verd. Natronlauge entfernt und dann die Abbau-Säuren mit 2-n.NaOH ausgeschüttelt. Zwischen Äther und Wasser bildete sich dabei eine Schicht von unlöslichem Natriumsalz. Es wurde abgetrennt, in 2-n.NaOH aufgeschwemmt und zur Verseifung 2 Stdn. auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dem Erkalten ließ sich das Natriumsalz der Oxy-säure leicht abzentrifugieren. Es wurde mit Salzsäure zerlegt und die freie Säure mit viel Äther, in dem sie nicht leicht löslich ist, ausgeschüttelt. Der Äther hinterließ beim Verdampfen einen krystallinen Rückstand, der zunächst zur Reinigung mit 100 ccm Aceton ausgekocht wurde. Die Säure schmolz dann bei 216° und wurde in einer Ausbeute von 2.4 g gewonnen. Nach dem Umkrystallisieren aus Eisessig lag der Schmp. bei 218°.

5.309 mg Sbst.: 14.875 mg CO<sub>2</sub>, 4.880 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 76.53, H 10.71. Gef. C 76.42, H 10.29.

Der Methylester wurde mit Diazo-methan in Äther-Methanol dargestellt und aus Methanol krystallisiert. Schmp. 151°.

5.116 mg Sbst.: 14.390 mg CO<sub>2</sub>, 4.390 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>23</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>. Ber. C 76.92, H 10.79. Gef. C 76.71, H 10.79.

### Abbau der $\beta$ -3-Oxy-allo-cholansäure.

1.7 g Methylester wurden in Äther gelöst zu der Grignard-Lösung aus 1.2 g Magnesium, 4.7 ccm Brom-benzol und 50 ccm Äther gegeben. Zunächst wurde 1 Stde. unter Rückfluß gekocht, und dann der Rückstand noch 5 Stdn. trocken auf dem Wasserbade erwärmt. Nach Zersetzung mit verd. Schwefelsäure wurden die Reaktionsprodukte in Äther aufgenommen. Zur Entfernung des Diphenyls wurde der Äther-Rückstand mit Wasserdampf

<sup>4)</sup> Journ. chem. Soc. London 1933, 1410.

behandelt. Der rohe Diphenyl-carbinol wurde 10 Min. mit 20 ccm Essigsäure-anhydrid gekocht und dann das Anhydrid im Vak. abgedampft. Der völlig krystallisierte Rückstand wurde zur Zerstörung des restlichen Essigsäure-anhydrids mit Wasser erwärmt und dann abfiltriert. Auf eine Reinigung wurde verzichtet, sondern gleich das Rohprodukt in 50 ccm Eisessig aufgeschwemmt. Unter Erwärmen auf dem Wasserbade wurde im Laufe von  $1\frac{1}{2}$  Stdn. eine Lösung von 2.5 g Chromtrioxyd in 2 ccm Wasser und 20 ccm Eisessig zugegeben. Danach wurde das Erhitzen noch 3 Stdn. fortgesetzt. Den in Äther aufgenommenen Reaktionsprodukten wurden die sauren Anteile mit 2-n.NaOH entzogen. Durch mehrfaches Ausschütteln mit Äther wurden die neutralen Teile entfernt und der alkalische Auszug, in dem sich ein Brei von unlöslichem Salz befand, 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Das Natriumsalz der Oxy-säure wurde dann mit der Zentrifuge abgetrennt, mit verd. Schwefelsäure zersetzt und die freie Säure in Äther aufgenommen.

Die so gewonnene  $\beta$ -3-Oxy-nor-allocholansäure ist in Äther noch weniger löslich als ihr Homologes. Sie wurde einmal aus Eisessig, dann aus Essigester aus der Hülse krystallisiert. Ausbeute 0.6 g. Kleine Blättchen vom Schmp.  $226^{\circ}$ , wenig löslich in den meisten Lösungsmitteln, leicht löslich in Eisessig.

4.568 mg Sbst.: 12.755 mg  $\text{CO}_2$ , 4.310 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_3$ . Ber. C 76.18, H 10.57. Gef. C 76.15, H 10.56.

Methylester: Dargestellt mit Diazo-methan in Äther-Methanol. Blättchen aus verd. Methanol. Schmp.  $156^{\circ}$ . Leicht löslich in Alkohol, Methanol und Aceton.

5.494 mg Sbst.: 15.400 mg  $\text{CO}_2$ , 4.310 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_3$ . Ber. C 76.53, H 10.71. Gef. C 76.45, H 10.63.

Acetat des Methylesters: Der Methylester wurde mit etwas Essigsäure-anhydrid 1 Stde. auf dem Wasserbade erhitzt. Beim Erkalten krystallisierte das Acetat aus. Lange Nadeln aus Methanol-Essigester. Schmp.  $163^{\circ}$ . Viel weniger löslich als der Methylester der Oxy-säure.

4.851 mg Sbst.: 13.240 mg  $\text{CO}_2$ , 4.370 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_4$ . Ber. C 74.59, H 10.12. Gef. C 74.44, H 10.08.

$\beta$ -3-Oxy-nor-allocholansäure aus Ergostanol-acetat.

16 g Acetat wurden wie Dihydro-cholesterin-acetat oxydiert: Gelöst in 700 ccm Eisessig. 33 g Chromtrioxyd in 20 ccm Wasser und 100 ccm Eisessig. Dauer der Reaktion 11 Stdn. Das schwerlösliche Natriumsalz wurde wie oben behandelt und die rohe Oxy-säure zunächst aus Aceton krystallisiert. 0.8 g vom Schmp.  $220^{\circ}$ . Solange sie noch unrein war, war sie auch in Aceton gut löslich. Dann wurde sie aus Essigester gereinigt und ein konstanter Schmp. von  $226^{\circ}$  gefunden. Mit der  $\beta$ -3-Oxy-nor-allocholansäure gab sie keine Schmelzpunkts-Depression.

4.110 mg Sbst.: 11.480 mg  $\text{CO}_2$ , 3.880 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_3$ . Ber. C 76.18, H 10.57. Gef. C 76.18, H 10.56.

Methylester: Dargestellt durch Einwirkung von Diazo-methan in Äther-Methanol. Blättchen aus Methanol-Wasser, Schmp.  $156^{\circ}$ . Mischprobe mit dem obigen Methylester keine Depression.

4.924 mg Sbst.: 13.845 mg  $\text{CO}_2$ , 4.700 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_3$ . Ber. C 76.53, H 10.71. Gef. C 76.51, H 10.67.

Acetat des Methylesters: Der Methylester der Oxy-säure wurde 10 Min. mit etwas Essigsäure-anhydrid gekocht. Nadeln aus Essigester-Methanol vom Schmp. 163°. Mit dem früheren Acetat keine Erniedrigung des Schmp.

4.686 mg Sbst.: 12.840 mg CO<sub>2</sub>, 4.350 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 74.59, H 10.12. Gef. C 74.75, H 10.37.

β-3-Oxy-nor-allocholansäure aus Stigmastanol-acetat.

40 g Acetat wurden nach den Angaben von Ruzicka oxydiert und ganz wie oben das unlösliche Natriumsalz isoliert und weiterbehandelt. Das Rohprodukt der Säuren wurde in Aceton gelöst und mit wenig Wasser angespritzt. Hierbei schied sich zunächst eine Säure in etwas gallertiger Form ab. Sie konnte dann aus Essigester in gut ausgebildeten Blättchen erhalten werden. Der Schmp. stieg jedoch nicht über 221°. Mit der β-3-Oxy-nor-allocholansäure gab sie eine starke Depression. Bei mehrstdg. Kochen mit alkohol. Kalilauge wurde sie nicht verändert.

34.4 mg Sbst. verbraucht. 0.65. 1.243 ccm *n*/<sub>10</sub>-NaOH.

C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>. Ber. Äquiv.-Gew. 376. Gef. Äquiv.-Gew. 426.

Diese Säure konnte in einer Ausbeute von etwa 0.2 g isoliert werden. Aus ihrer Mutterlauge konnte aber noch etwa 0.8 g der β-3-Oxy-nor-allocholansäure gewonnen werden durch Krystallisation aus Essigester-Aceton und Essigester. Auch sie schmolz bei 226° und gab mit den obigen Säuren keine Depression.

4.919 mg Sbst.: 13.660 mg CO<sub>2</sub>, 4.500 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>. Ber. C 76.18, H 10.57. Gef. C 75.73, H 10.24.

Methylester: Wie vorher bereitet. Schmp. 156°.

3.271 mg Sbst.: 9.150 mg CO<sub>2</sub>, 3.130 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>. Ber. C 76.53, H 10.71. Gef. C 76.29, H 10.71.

Acetat des Methylesters: Wie die vorhergehenden Acetate bereitet. Schmp. 163°. Mit den früheren Acetaten gemischt keine Depression.

4.858 mg Sbst.: 13.285 mg CO<sub>2</sub>, 4.340 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 74.59, H 10.12. Gef. C 74.59, H 10.00.

Der Firma E. Merck, Darmstadt, sprechen wir für die Unterstützung dieser Arbeit unseren besten Dank aus.

---