

135. $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien.Beitrag zum Mechanismus der HBr-Abspaltung aus
7-Brom-cholesterylbenzoat

von J. Schmutz, H. Schaltegger und M. Sanz.

(27. IV. 51.)

Bei der HBr-Abspaltung aus 7-Brom-cholesterinester zur Herstellung von 7-Dehydro-cholesterin, dem Provitamin D₃, wurde neben diesem noch $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-3-ol (VII) als Nebenprodukt isoliert¹⁾. Kürzlich haben Ottke & Bergmann²⁾ durch Einwirkung von N-Bromsuccinimid auf Cholesterylacetat und direkte HBr-Abspaltung aus dem rohen Bromierungsprodukt mit s-Collidin nach der Methode von Bernstein und Mitarbeitern³⁾ ein neues Nebenprodukt isoliert, welchem die Struktur eines Bicholestatriens zukommen soll. Ein ähnliches, wenn nicht identisches Bicholestatrien erhielt Hafez⁴⁾ bei der Einwirkung von N-Bromsuccinimid auf Δ^6 -i-Cholestadien.

Im Laufe unserer Untersuchungen über die HBr-Abspaltung aus 7-Brom-cholesterylbenzoat mit Calciumhydroxyd⁵⁾ in siedendem Xylol beobachteten wir im rohen Reaktionsprodukt regelmässig einen Stoff mit einem deutlichen Maximum im UV. bei 307 m μ . Die Ausbeuten an diesem Körper variierten stark, je nach Reaktionsbedingungen zwischen 10 und 38 %⁶⁾. Durch chromatographische Trennung des verseiften Rohproduktes an Al₂O₃ liess sich dieser in Kristallen erhalten; ihm kommt sehr wahrscheinlich die Formel eines $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatriens (XVII) zu (siehe unten). Daneben wurden 7-Dehydro-cholesterin (V) (bis zu max. 40 %⁶⁾), 7 β -Oxy-cholesterin (XII)⁷⁾⁸⁾ und in sehr kleiner

¹⁾ A. E. Bide, H. B. Henbest, E. R. Jones, R. W. Peevers & P. A. Wilkinson, Soc. 1948, 1783; J. Redel & B. Gauthier, Bl. 1948, 607; H. Schaltegger, Helv. 33, 2101 (1950).

²⁾ R. C. Ottke & W. Bergmann, Nature 166, 997 (1950).

³⁾ S. Bernstein, L. J. Binovi, L. Dorfmann, K. J. Sax & Y. Subbarow, J. Org. Chem. 14, 433 (1949).

⁴⁾ M. M. Hafez, Nature 165, 401 (1950).

⁵⁾ Vgl. A. Lowenbein, London, Schw. Pat. Nr. 261972 (veröffentlicht 1. 9. 49), behandelt 7-Brom-cholesterylacetat in Xylol und Nitrobenzol mit Calciumhydroxyd während 15 Minuten bei 125°. Dabei werden nach dem Verseifen 86% (!) kristallisiertes 7-Dehydro-cholesterin erhalten. Diese hohe Ausbeute konnten wir nicht bestätigen. Als Nebenprodukt stellten wir ebenfalls Cholestatrien fest (ausgehend vom 7-Brom-cholesterylbenzoat).

⁶⁾ Spektrometrisch bestimmt.

⁷⁾ Für die sterischen Verhältnisse in 7-Stellung wurde die alte Windaus'sche Indizierung beibehalten, vgl. dazu Resultate und Diskussion bei H. Schaltegger & F. X. Müllner, Helv. 34, 1096 (1951).

⁸⁾ Auf Grund der leichten Epimerisierung von 7 β -Brom-cholesterylbenzoat, H. Schaltegger & F. X. Müllner, Helv. 34, 1096 (1951), könnten die Mutterlaugen von XII noch 7 α -Oxy-cholesterin enthalten haben.

Menge eine Substanz vom Smp. 195° und $[\alpha]_D = -97^\circ$ (CHCl_3), ohne charakteristisches Spektrum, isoliert, die wir vorläufig nicht weiter untersucht haben¹⁾. Interessanterweise konnte kein $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-3 β -ylbenzoat (VIII) gefunden werden.

Es wurde weiter festgestellt, dass bei der HBr-Abspaltung aus 7-Brom-cholesterylbenzoat mit Dimethylanilin bei 100°²⁾ kein Cholestatrien gebildet wird, dagegen bei 195°. Wurde 7-Brom-cholesterylbenzoat analog den Angaben von Bernstein und Mitarbeitern³⁾ mit s-Collidin oder Diäthylanilin in Xylol während 15 Minuten erhitzt, so konnte im rohen Reaktionsgemisch spektrometrisch keine Spur Cholestatrien gefunden werden. Nach der chromatographischen Trennung eines solchen Ansatzes mit Diäthylanilin an Al_2O_3 wurden überraschenderweise ca. 13% rohes $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) isoliert, daneben 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI) und, im Gegensatz zum Ansatz mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 7 α -Oxy-cholesterylbenzoat (IX)⁴⁾.

Das Cholestatrien muss sich in diesem Fall auf der Al_2O_3 -Säule gebildet haben.

Auf Grund dieser Befunde vermuteten wir, dass das $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) durch Benzoesäure-Abspaltung aus dem $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-3 β -yl-benzoat (VIII), oder, was allerdings viel weniger wahrscheinlich schien, aus 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI), während der Reaktion entstanden sei. Es wurde daher die Einwirkung verschiedener Basen auf diesen Körper untersucht.

$\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-3 β -ol (VII) erhält man nach Petrow⁵⁾ durch Reduktion von $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-3-on (IV)⁶⁾ mit Aluminiumisopropylat, wobei beide Epimeren zu gleichen Teilen entstehen. Wir haben die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid durchgeführt und erhielten dabei fast ausschliesslich das gesuchte $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-3 β -ol (VII) (ca. in 93-proz. Ausbeute, als Digitonid bestimmt). Diese sterisch einseitig verlaufende Reduktion überrascht sehr, wurden doch bei der Reduktion von Δ^4 -Cholesten-3-on mit LiAlH_4 ⁷⁾⁸⁾ beide Epimeren ungefähr in gleichen Mengen erhalten. Fieser und Mitarbeiter⁹⁾ erhielten

¹⁾ Es könnte sich vielleicht um ein 7-Oxy- $\Delta^{2,5}$ -cholestadien handeln. Dafür sprechen: negative optische Drehung, gleiches Verhalten an Al_2O_3 wie 7-Dehydrocholesterin, kein charakteristisches Spektrum im UV., blaue Färbung mit Lifschütz-Reagens (siehe experimenteller Teil).

²⁾ Vgl. H. Schallegger, Helv. **33**, 2101 (1950).

³⁾ S. Bernstein, L. J. Binovi, L. Dorfmann, K. J. Sax & Y. Subbarow, J. Org. Chem. **14**, 433 (1949).

⁴⁾ Auf Grund der leichten Epimerisierung von 7 β -Brom-cholesterylbenzoat, H. Schallegger & F. X. Müllner, Helv. **34**, 1096 (1951), könnten die Mutterlungen von IX noch 7 β -Oxy-cholesterylbenzoat enthalten haben.

⁵⁾ V. A. Petrow, Soc. **1940**, 66.

⁶⁾ E. Dane, Y. Wang & W. Schulte, Z. physiol. Ch. **245**, 80 (1937).

⁷⁾ H. McKennis, jr., & G. W. Gaffney, J. Biol. Chem. **175**, 217 (1948).

⁸⁾ Pl. A. Plattner, H. Heusser & A. B. Kulkarni, Helv. **32**, 265 (1949).

⁹⁾ L. F. Fieser, M. Fieser & R. N. Chakravarti, Am. Soc. **71**, 2226 (1949).

allerdings bei der Reduktion von 7-Keto-cholesterylacetat zur Haupt-sache 7 α -Oxy-cholesterin und 5% 7 β -Oxy-cholesterin. Kürzlich haben *Shoppee & Summers*¹⁾ bei der Reduktion von Δ^5 -Cholesten-3-on zu 90% Cholesterin erhalten und nur 5% Epi-cholesterin.

Über die Einwirkung verschiedener Agenzien auf $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-3 β -ylbenzoat (VIII) orientiert folgende Tabelle:

| | Temperatur | Reaktions-dauer | Cholestatrien in % spektrometr. |
|--------------------------------------|------------|-----------------|---------------------------------|
| Dimethylanilin. | 100° | 5 h | 0 |
| Dimethylanilin. | 195° | 1' | 8 |
| Dimethylanilin. | 195° | 2' | 16 |
| Pyridin | 135° | 6 h | 58 |
| Ca(OH) ₂ /Xylool. | 145° | 2 h | 4 |
| Essigsäureanhydrid. . . . | 140° | 2 h | 56 |

Der Modellversuch mit Ca(OH)₂ überrascht wegen der kleinen Ausbeute an Cholestatrien, gegenüber den Resultaten bei der Einwirkung von Ca(OH)₂ auf 7-Brom-cholesterylbenzoat. Die Erklärung liegt vermutlich darin, dass im letzten Fall, im Gegensatz zum Modellversuch, während der Reaktion immer etwas freie HBr nachweisbar ist. In den beiden Ansätzen mit Pyridin und Essigsäureanhydrid wurde das Cholestatrien kristallisiert isoliert. Beide erwiesen sich nach Smp., optischer Drehung, UV.-Spektren und Analyse als identisch mit dem Cholestatrien aus 7-Brom-cholesterylbenzoat. Aus 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI) konnte weder mit Dimethylanilin, Pyridin oder Ca(OH)₂ die Bildung von Cholestatrien beobachtet werden.

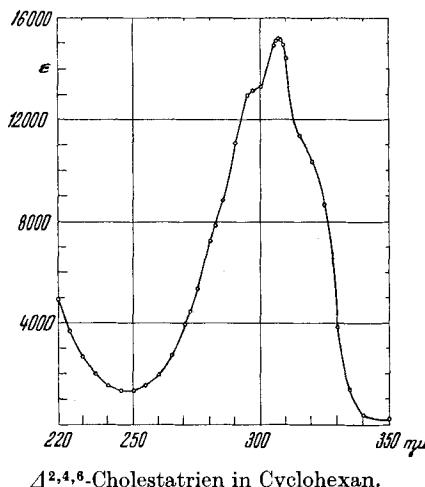
$\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) erhielten wir kristallisiert in Nadeln vom Smp. 71–72° (korrig.) und $[\alpha]_D -13,8^{\circ}$. Es ist sehr unbeständig und verfärbt sich leicht gelb. Im UV. zeigt es ein charakteristisches Spektrum mit einem Maximum bei 307 m μ , $\epsilon = 15200$ und einem Minimum bei 250 m μ , $\epsilon = 1370$ und mit einer deutlichen Terrasse zwischen 295 und 300 m μ (in Cyclohexan, siehe Kurve).

In Äther lag das Maximum bei 306 m μ , $\epsilon = 15700$ und das Minimum bei 257 m μ , $\epsilon = 4000$. Wegen der schweren Löslichkeit in Alkohol wurde nur die Lage des Maximums bzw. Minimums bestimmt: Max. 307 m μ , Minim. 250 m μ .

Bei der Mikrohydrierung mit Pt in Eisessig konnten im $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) 3 Doppelbindungen nachgewiesen werden. Im Hochvakuum lässt es sich unzersetzt destillieren. Mit Chloralhydrat, Schwefelsäure und *Litschütz*-Reagens gab es charakteristische Faroreaktionen (siehe experimenteller Teil). Mit Maleinsäureanhydrid kondensierte das Trien in Benzol bei 80° nur unvollständig (ca. 23%), da-

¹⁾ C. W. Shoppee & G. H. R. Summers, Soc. 1950, 687.

gegen nahezu vollständig bei 135° in Xylol¹⁾). Das Addukt wurde als Säure isoliert, liess sich aber sehr schlecht kristallisieren und wurde deshalb mit Diazomethan in den gut kristallisierenden Dimethylester XVIII übergeführt.



$\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien in Cyclohexan.

Auf Grund der oben beschriebenen Umsetzungen, der Mikrohydrierung mit Pt in Eisessig (Nachweis von 3 Doppelbindungen)³⁾, vor allem aber des charakteristischen Maximums bei $307\text{ m}\mu$ im UV. halten wir Formel XVII für das Cholestatrien am wahrscheinlichsten. Die andere in Frage kommende Formel XVI ist wegen des Maximums ausgeschlossen⁴⁾.

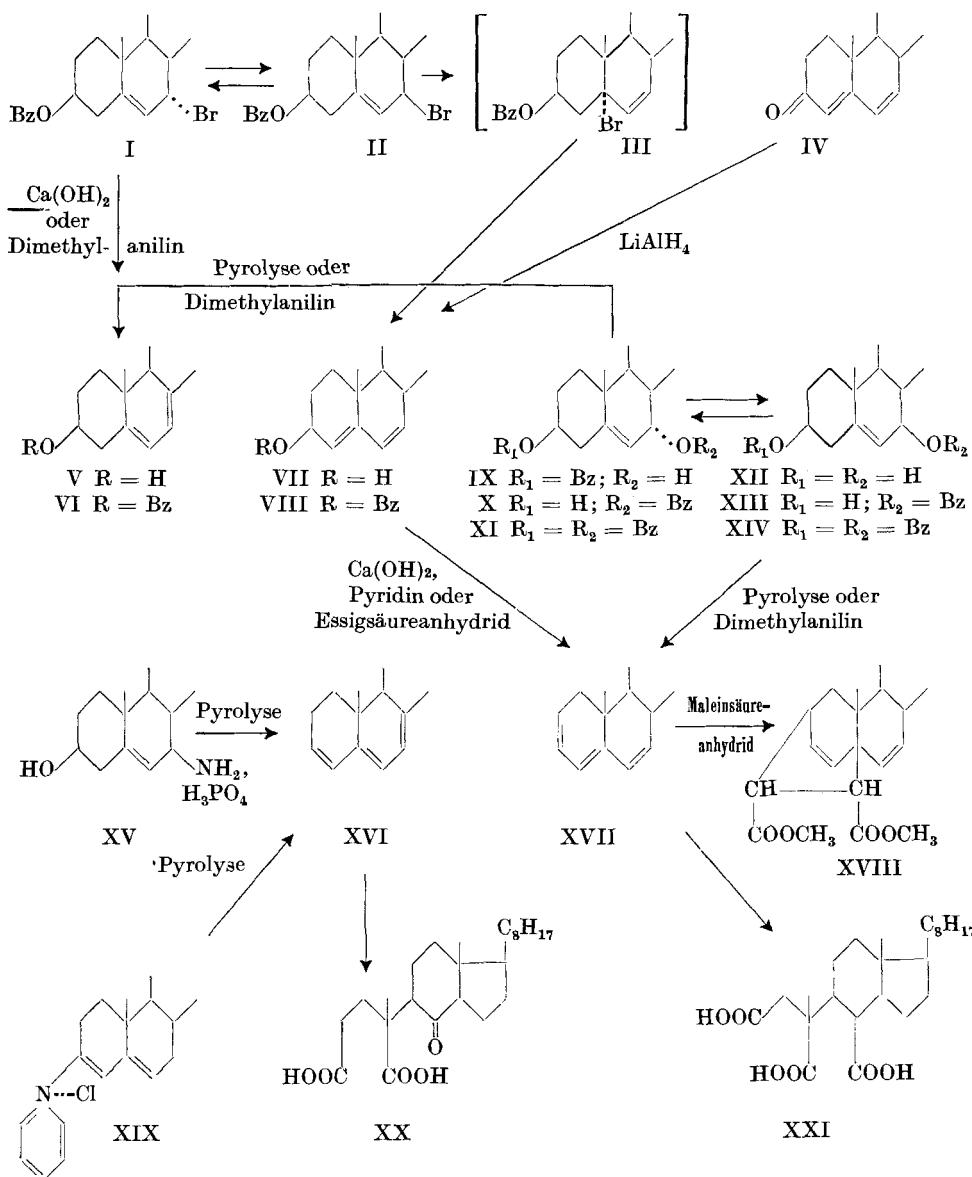
Einen eindeutigen Strukturbeweis würde man durch den oxydativen Abbau des Cholestatriens erhalten. $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) sollte eine Tricarbonsäure der Formel XXI ergeben, $\Delta^{3,5,7}$ -Cholestatrien (XVI) dagegen eine Dicarbonsäure der Formel XX. Wir haben den Abbau mit KMnO_4 in Pyridin versucht. Die sauren Anteile wurden mit Diazomethan verestert und an Al_2O_3 chromatographiert. Die Substanz erwies sich aber als ein Gemisch, dessen einzelne Fraktionen nicht kristallisiert erhalten werden konnten.

¹⁾ Vgl. dazu: *A. Windaus & A. Lüttringhaus*, B. **64**, 850 (1931). Dehydro-ergosterin kondensiert mit Maleinsäureanhydrid bei 80° weitgehend, Ergosterin erst bei 135° .

²⁾ *H. E. Stavely & W. Bergmann*, J. Org. Chem. **1**, 575 (1936). $\Delta^{2,4}$ -Cholesten kondensiert mit Maleinsäureanhydrid bei 80° sehr unvollständig, dagegen besser bei 135° in Xylol.

³⁾ Δ^{7-8} -Doppelbindungen sind nicht hydrierbar, sondern werden unter den angewandten Bedingungen nach Δ^{8-14} verschoben, vgl. dazu *H. Wieland & W. Benend*, A. **554**, 1 (1943), und *H. E. Stavely & G. N. Bollenback*, Am. Soc. **65**, 1600 (1943).

⁴⁾ Ein $\Delta^{2,4,6}$ -Trien sollte bei $310\text{ m}\mu$ ein Maximum zeigen und ein $\Delta^{3,5,7}$ -Trien bei $320\text{ m}\mu$ (in Äther). *D. H. R. Barton*, Soc. **1949**, 2174; *L. F. Fieser, M. Fieser & S. Rajagopal*, J. Org. Chem. **13**, 800 (1948). — Vgl. die Maxima analog gebauter Substanzen bei *I. M. Heilbronn, T. Kennedy, F. S. Spring & G. Swain*, Soc. **1938**, 869; *W. C. J. Ross*, Soc. **1946**, 737.



Wintersteiner & Ruigh¹⁾ haben die interessante Feststellung gemacht, dass durch thermische Zersetzung oder durch Kochen von 7α-Benzoxo-cholesterin (X) mit Dimethylanilin 7-Dehydro-cholesterin (V) gebildet wird, dagegen bei der thermischen Zersetzung (nicht aber beim Kochen mit Dimethylanilin) von 7β-Benzoxo-cholesterin (XIII) ein Körper mit einem Maximum im UV. bei 305 m μ . Auf Grund

¹⁾ O. Wintersteiner & W. L. Ruigh, Am. Soc. **64**, 2453 (1942).

des Spektrums vermuten die Autoren die Bildung eines Cholestatriens, welches aber nicht isoliert wurde¹⁾. Aus der Lage des Maximums diskutiert *Barton*²⁾ für dieses Trien ebenfalls die Formel XVII.

Wir haben den Versuch von *Wintersteiner & Ruigh*³⁾ wiederholt und festgestellt, dass auch bei längerem Kochen von 7β -Benzoxy-cholesterylbenzoat (XIV) mit Dimethylanilin neben wenig 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI) ebenfalls ein Trien gebildet wird, das sehr wahrscheinlich mit dem $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) identisch ist. Wir erhielten die Substanz ebenfalls in Nadeln vom Smp. 70—72°, welche im UV. das Spektrum für XVII zeigten; die Extinktion war allerdings bedeutend tiefer (Max. 307 m μ , $\epsilon = 8630$ in Cyclohexan). Die Substanz war also nicht rein, was auch aus der optischen Drehung ersichtlich war, die $[\alpha]_D^{18} - 25,3^\circ$ betrug. Das 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI) muss aus 7α -Benzoxy-cholesterylbenzoat (XI) entstanden sein, welches während der Reaktion durch teilweise Epimerisierung von 7β -Benzoxy-cholesterylbenzoat (XIV) gebildet wurde (siehe weiter unten).

Diese Versuche sind von Bedeutung für den Mechanismus der Bildung von 7-Dehydro-cholesterin und Nebenprodukten aus 7-Brom-cholesterin. Es ist bekannt, dass die beiden epimeren 7-Acetoxy-cholesterylacetate ineinander umgelagert werden können⁴⁾⁵⁾. Beim 7-Brom-cholesterylbenzoat geht infolge der grossen Beweglichkeit des Bromatoms die Epimerisierung noch leichter vor sich⁶⁾. Aus dem 7α -Brom-cholesterylbenzoat (I) muss somit analog dem 7α -Benzoxy-cholesterylbenzoat (XI) 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI) entstehen. Das während der Reaktion durch Epimerisierung entstandene 7β -Brom-cholesterylbenzoat (II) geht dabei analog dem 7β -Benzoxy-cholesterylbenzoat (XIV) durch Allylumlagerung über ein 3β -Benzoxy-5-brom- Δ^6 -cholesten (III)⁷⁾ in das $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien- 3β -ylbenzoat (VIII) über⁸⁾. Letzteres (VIII) wird je nach Reaktionsbedingungen in das $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) umgewandelt.

¹⁾ Vgl. dazu die thermische Zersetzung der beiden in 7-Stellung epimeren 7-Oxy-epi-cholesteryl-dibenzoate. *A. Windaus & J. Naggatz*, A. **542**, 204 (1939).

²⁾ *D. H. R. Barton*, Soc. **1949**, 2174.

³⁾ *O. Wintersteiner & W. L. Ruigh*, Am. Soc. **64**, 2453 (1942).

⁴⁾ *L. Ruzicka, V. Prelog & E. Tagmann*, Helv. **27**, 1149 (1944).

⁵⁾ Auf die Epimerisierung von 7-Oxy-cholesterin werden wir in einer nächsten Arbeit zurückkommen.

⁶⁾ *H. Schaltegger & F. X. Müllner*, Helv. **34**, 1096 (1951).

⁷⁾ *H. B. Henbest & E. R. Jones*, Soc. **1948**, 1792, haben bei der partiellen Hydrolyse von $7\alpha, \beta^{14}$ -Brom-cholesterylbenzoat als Nebenprodukt 3β -Benzoxy- Δ^6 -Cholesten- 5α -ol isoliert.

⁸⁾ Vgl. dazu die analoge Umwandlung von 7-Benzoxy- Δ^5 -cholesten in $\Delta^{4,6}$ -Cholesten durch thermische Zersetzung und von 7-Oxy- Δ^5 -cholesten in $\Delta^{4,6}$ -Cholesten durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid. *K. Dimroth & G. Trautmann*, B. **69**, 669 (1936), und *H. E. Stavely & W. Bergmann*, J. Org. Chem. **1**, 575 (1936).

*Eckhardt*¹⁾ hat bei der thermischen Zersetzung von 7-Amino-cholesterin-phosphat (XV) (Gemisch der Epimeren) ein Cholestatrien, Smp. 67–69°, $[\alpha]_D \pm 0^\circ$, Max. 302 m μ in Äther erhalten, dem die Formel XVI zukommen soll. *Windaus & Naggatz*²⁾ erhielten das gleiche Trien bei der thermischen Zersetzung von 7 α -Benzoxo-epi-cholesterylbenzoat. Wie schon *Fieser & Fieser*³⁾ und *Barton*⁴⁾ festgestellt haben, dürfte diesem Cholestatrien auf Grund des Maximums im UV. nicht Formel XVI, sondern Formel XVII zukommen. Unser $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) ist trotz dem Unterschied in der optischen Drehung sehr wahrscheinlich identisch mit dem Cholestatrien von *Eckhardt*¹⁾. Beide geben beim Schmelzen mit Chloralhydrat eine blaue Färbung. *Müller* und Mitarbeiter⁵⁾ haben durch thermische Zersetzung des Cholesta-dien-pyridiniumsalzes (XIX) ebenfalls ein Trien, Smp. 67–69°, $[\alpha]_D^{20} = -41,4^\circ$, Max. 304 m μ in Äther, erhalten, welches sie trotz des sehr grossen Unterschiedes in der optischen Drehung als identisch mit dem von *Eckhardt*¹⁾ erhaltenen Trien betrachten. Dieses Trien gab mit Chloralhydrat keine Blaufärbung und liess sich in Eisessig-Äther mit Pt bei 2 atü zu Cholestan hydrieren.

Wahrscheinlich sind diese erheblichen Unterschiede in der optischen Drehung durch schwer abtrennbare Verunreinigungen bedingt, was im Extinktionskoeffizienten zum Ausdruck kommt (*Eckhardt*¹⁾: Max. 302 m μ , $\epsilon = 11500$; *Müller* et al.⁵⁾: Max. 304 m μ , $\epsilon = 12000$; unser Trien: 306 m μ , $\epsilon = 15700$, alle in Äther).

Nach Abschluss dieses Manuskriptes ist uns die Arbeit von *Gould* und Mitarbeiter⁶⁾ bekannt geworden. Die Autoren haben aus 7-Dehydro-cholesteryl-äthern ein Trien vom Smp. 67–69°, $[\alpha]_D^{24} = -122,4^\circ$, mit 3 Maxima bei 302,5, 315 und 330 m μ erhalten, dem die Formel eines $\Delta^{8,5,7}$ -Cholestatriens (XVI) zukommt. Abgesehen von der optischen Drehung und dem UV.-Spektrum unterscheidet sich dieses Trien von unserem $\Delta^{2,4,6}$ -Trien (XVII) noch bei der Hydrierung. Die Autoren erhielten dabei $\Delta^{8(14)}$ -Cholesten, was für eine Δ^{7-8} -Doppelbindung in ihrem Trien XVI spricht.

Experimenteller Teil.

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert. Substanzproben zur Drehung wurden 1½ Stunden im Hochvakuum bei 65° getrocknet.

HBr-Abspaltung aus 7 β -Brom-cholesterylbenzoat mit Ca(OH)₂.

10 g 7-Brom-cholesterylbenzoat, Smp. 139–140°, wurden in 150 cm³ abs. Xylo in einem 3-Halskolben mit Rührer, Rückflusskühler und Gaseinleitungsrohr gelöst, mit 25 g Ca(OH)₂⁷⁾ versetzt und 2 Stunden unter gereinigtem N₂ gekocht (Ölbad 150°).

¹⁾ *H. Eckhardt*, B. **71**, 461 (1938).

²⁾ *A. Windaus & J. Naggatz*, A. **542**, 204 (1939).

³⁾ *L. F. Fieser & M. Fieser*, "Natural Products related to Phenanthren", 3rd Ed., Reinhold, New York 1949, S. 189. ⁴⁾ *D. H. R. Barton*, Soc. **1949**, 2174.

⁵⁾ *E. Müller, A. Langenbeck & H. Neuhoff*, B. **77**, 141 (1944).

⁶⁾ *D. H. Gould, K. H. Schaaaf & L. Ruigh*, Am. Soc. **73**, 1263 (1951).

⁷⁾ Qualität Ph. Helv. V.

Darauf wurde das $\text{Ca}(\text{OH})_2$ abgesaugt und gut mit Benzol ausgewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in 100 cm^3 Benzol gelöst und in einem aliquoten Teil (nach Abdampfen des Benzols) in Cyclohexan $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) und 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI) spektrometrisch bestimmt; das $\text{Ca}(\text{OH})_2$ wurde im Vakuum getrocknet. Resultat: 32,8% $\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII) und 35,5% 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI).

Im $\text{Ca}(\text{OH})_2$ wurden 96,5% der theoretischen Brommenge gefunden.

Der in 100 cm^3 Benzol gelöste Rückstand wurde mit 150 cm^3 4-proz. methanolischer KOH während 25 Minuten unter N_2 gekocht. Eindampfen im Vakuum auf ca. 50 cm^3 und übliche Aufarbeitung mit Äther. Der Ätherrückstand (7,6 g) wurde in 800 cm^3 Benzol gelöst und an $250 \text{ g} \text{ Al}_2\text{O}_3$ ¹⁾ nach der Durchlaufmethode chromatographisch getrennt. Zum Nachwaschen dienten je 800 cm^3 der in der folgenden Tabelle genannten Lösungsmittel.

| Faktion Nr. | Lösungsmittel | Rückstand mg |
|-------------|------------------------------|--------------|
| 1—5 | Benzol | 2310 |
| 6—7 | Benzol-Äther (9:1) | 10 |
| 8—9 | Benzol-Äther (4:1) | 18 |
| 10—14 | Benzol-Äther (1:1) | 1945 |
| 15 | Benzol-Äther (1:1) | 37 |
| 16 | Benzol-Äther (1:4) | 22 |
| 17—19 | Äther | 11 |
| 20—23 | Äther- CHCl_3 (4:1) | 20 |
| 24—25 | Äther- CHCl_3 (1:1) | Spur |
| 26—34 | Chloroform | 2274 |

7-Dehydro-cholesterin (V): Fraktionen 10—14 aus Aceton-Methanol ergaben 1400 mg Nadeln, Smp. 136—139°; zweimal aus Aceton umkristallisiert, Smp. 140—142°, $[\alpha]_D^{23} = -116,3^\circ$ ($c = 1,451$ in CHCl_3). Die Substanz zeigte im UV. das für 7-Dehydro-cholesterin charakteristische Spektrum und gab mit einem authentischen Muster von 7-Dehydro-cholesterin, Smp. 143—143,5°, keine Depression.

Fraktionen 15 und 16 ergaben aus Aceton-Methanol 33 mg feine Nadeln, Smp. 183—189°. Durch wiederholtes Umkristallisieren stieg der Smp. auf 195—196°, $[\alpha]_D^{22} = -96,7^\circ$ ($c = 1,138$ in CHCl_3). Die Substanz zeigte mit *Lifschütz-Reagens*²⁾ eine blaugrüne Färbung (wie für 7-Oxy-cholesterin), gab aber mit 7α -Oxy-cholesterylbenzoat vom Smp. 191—193° eine starke Depression. Im UV. kein charakteristisches Spektrum.

7β -Oxy-cholesterin (XII): Fraktionen 26—34 ergaben aus Aceton-Methanol 1,7 g Kristalle vom Smp. 174—181°³⁾, zweimal aus Methanol umkristallisiert, Nadeln Smp. 183—185°, $[\alpha]_D^{23} = -79,8^\circ$ ($c = 1,548$ in CHCl_3). Keine Depressionen mit authentischem 7β -Oxy-cholesterin vom Smp. 184—185°.

Dibenzoat von XII: Benzoylierung von 775 mg 7β -Oxy-cholesterin, Smp. 181—184°, mit 4 cm^3 Benzoylchlorid in 10 cm^3 abs. Pyridin während 48 Stunden bei 20°. Übliche Aufarbeitung ergab aus Aceton-Methanol 680 mg Nadeln, Smp. 154—155°.

¹⁾ Hergestellt nach: *J. v. Euw, A. Lardon & T. Reichstein*, Helv. **27**, 1287 (1944), Seite 1294.

²⁾ Vgl. *S. Bergström & O. Wintersteiner*, J. Biol. Chem. **145**, 309 (1942).

³⁾ Auf Grund der leichten Epimerisierung von 7β -Brom-cholesterylbenzoat, *H. Schaltegger & F. X. Müllner*, Helv. **34**, 1096 (1951), könnten die Mutterlaugen noch 7α -Oxy-cholesterin enthalten haben.

Δ^{2,4,6}-Cholestatrien (XVII): Die Fraktionen 1–5 wurden in 200 cm³ Petroläther gelöst und nochmals an 80 g Al₂O₃ chromatographiert¹⁾ (5 Fraktionen zu je 200 cm³ Petroläther). Nach Abdampfen des Lösungsmittels kristallisierte das farblose Öl der Fraktionen 1–3 zu farblosen Nadeln, Smp. 65–68°. Leicht löslich in Petroläther, Benzol, Äther und Chloroform, schwer in Aceton, Alkohol und Methanol. Aus Äther-Aceton farblose Nadeln, Smp. 67–69°. Die Substanz wurde bei 10⁻³ mm Hg destilliert (Ölbad 100–108°), Smp. 70–72°, [α]_D²⁰ = 13,8° (c = 2,230 in CHCl₃). Das UV.-Spektrum ist im theoretischen Teil beschrieben.

| | | | |
|--|----------------|----------|--------|
| C ₂₇ H ₄₂ (366,61) | Ber. C 88,45 | H 11,55% | D.Z. 3 |
| | Gef. , , 88,12 | , 11,52% | , 2,79 |

D.Z. durch Mikrohydrierung mit Pt in Eisessig bei 725 mm bestimmt.

Farbreaktionen: Beim vorsichtigen Schmelzen mit Chloralhydrat schwach blau²⁾; mit 84-proz. H₂SO₄³⁾ violett; mit *Lifschütz*-Reagens⁴⁾ grünblau → blau.

Maleinsäure-dimethylester-Addukt (XVIII): a) Kondensation bei 135°: 800 mg XVII, Smp. 66–69°, 400 mg Maleinsäureanhydrid (frisch sublimiert) wurden in 2 cm³ abs. Xylol 8 Stunden in einer Ampulle erwärmt (Ölbad 135°). Das Lösungsmittel wurde darauf im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 20 cm³ Methanol und 80 cm³ n. KOH unter schwachem Erwärmen und Schütteln 15 Minuten stehengelassen und zweimal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherauszüge wurden noch zweimal mit n. KOH und dann mit Wasser gewaschen und ergaben nach Trocknen und Eindampfen im Vakuum 80 mg (= ca. 10%) Neutralteil. Die alkalische Lösung wurde unter Kühlen mit konz. HCl angesäuert und dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Übliche Aufarbeitung der Ätherphase ergab 937 mg (= ca. 89%) saure Anteile. Aus Aceton und Methanol wurden nur schmierige Kristalle erhalten. Die sauren Anteile wurden deshalb in Äther gelöst und mit Diazomethan verestert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels kristallisierte der Rückstand sofort. Aus Äther-Methanol Nadeln, Smp. 164–166°, [α]_D²⁰ = +135,6° (c = 2,412 in CHCl₃).

| | | | |
|---|----------------|---------|--------------------------|
| C ₃₃ H ₅₂ O ₄ (512,75) | Ber. C 77,30 | H 10,22 | —OCH ₃ 12,10% |
| | Gef. , , 77,47 | , 10,14 | , 12,34% |

b) Kondensation bei 80°: 430 mg XVII, Smp. 66–69°, 210 mg Maleinsäureanhydrid (frisch sublimiert) und 4 cm³ abs. Benzol wurden in einer Ampulle 4 Stunden erwärmt (Ölbad 80–85°). Aufarbeitung wie unter a). Neutralteil: 331 mg (= ca. 77%), saure Anteile: 125 mg.

Abbauversuch mit *Δ^{2,4,6}-Cholestatrien* (XVII).

2,38 g XVII (Rohprodukt, Smp. 63–66°) wurden in 120 cm³ abs. Pyridin (KMnO₄-beständig) gelöst und innerhalb 1 1/2 Stunden unter Schütteln mit 8,6 g pulverisiertem KMnO₄ versetzt. Es wurde noch 3 Stunden auf der Maschine geschüttelt (KMnO₄ noch nachweisbar), darauf im Vakuum möglichst vollständig vom Pyridin befreit, der breiige Rückstand mit Wasser versetzt, unter Kühlen mit 4-n. H₂SO₄ angesäuert und nochmals mit Chloroform ausgeschüttelt (Abtrennung des MnO₂ durch Zentrifugieren). Die übliche Aufarbeitung ergab 1,34 g Chloroformrückstand. Dieser wurde in 10 cm³ Methanol gelöst, mit einer 10-proz. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung versetzt und in üblicher Weise mit Äther in Säure und Neutralteil getrennt. Neutralteil: 468 mg dunkelbraun. Saurer Anteil: 810 mg.

Die Säure wurde in Äther mit Diazomethan versetzt und wieder mit Kaliumhydrogencarbonat getrennt. Neutralteil (Ester): 780 mg. Dieser wurde in 100 cm³ Petroläther gelöst und an 24 g Al₂O₃ nach der Durchlaufmethode chromatographisch getrennt. Zum

¹⁾ Wird das rohe Bromabspaltungsprodukt direkt chromatographiert und nicht zuerst verseift, so erhält man das Trien sofort rein.

²⁾ Vgl. *H. Eckhardt*, B. 71, 461 (1938).

³⁾ Vgl. *J. v. Euw & T. Reichstein*, Helv. 33, 485 (1950).

⁴⁾ Vgl. *S. Bergström & O. Wintersteiner*, J. Biol. Chem. 145, 309 (1942).

Nachwaschen dienten je 100 cm³ der in der folgenden Tabelle genannten Lösungsmittel. Keine der erhaltenen Fraktionen konnte zur Kristallisation gebracht werden.

| Faktion Nr. | Lösungsmittel | Rückstand in mg |
|----------------|---------------------------------|--------------------|
| 1—2 | Petroläther | 4 |
| 3—6 | Petroläther-Benzol (4:1) | 5 |
| 7—9 | Petroläther-Benzol (1:1) | 82 |
| 10—12 | Benzol | 138 |
| 13—14 | Benzol-CHCl ₃ (19:1) | 36 |
| 15—18 | Benzol-CHCl ₃ (9:1) | 207 |
| 19—20 | Benzol-CHCl ₃ (4:1) | 21 |
| 21—22 | Benzol-CHCl ₃ (1:1) | 41 |
| 23—25 | CHCl ₃ | 90 |

HBr-Abspaltung aus 7 β -Brom-cholesterylbenzoat mit s-Collidin und Diäthylanilin¹⁾.

a) Mit s-Collidin: 2 g 7-Brom-cholesterylbenzoat, Smp. 139—140⁰, 1,5 g s-Collidin und 15 cm³ Xylol wurden 15 Minuten unter gereinigtem N₂ zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das ausgefallene s-Collidin-HBr abgenutscht, getrocknet und gewogen: 617 mg (= ca. 87%). Das Filtrat wurde mit Äther versetzt und mit eiskalter 2-n. HCl, Natriumhydrogencarbonat und Wasser wie üblich aufgearbeitet. Ätherrückstand 1,738 g, enthielt 28,3% 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI), aber kein Trien (spektrometrisch bestimmt).

b) Mit Diäthylanilin: 4 g 7-Brom-cholesterylbenzoat, Smp. 139—140⁰, 3 cm³ Diäthylanilin und 25 cm³ abs. Xylol wurden 12 Minuten unter gereinigtem N₂ zum Sieden erhitzt. Aufarbeitung wie unter a). Diäthylanilin-HBr: 1,026 g (= ca. 96%). Ätherrückstand: 3,650 g, enthielt 21,1% 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI), aber kein Trien (spektrometrisch bestimmt). Der Ätherrückstand (3,65 g) wurde in 350 cm³ Petroläther gelöst und an 100 g Al₂O₃ nach der Durchlaufmethode chromatographisch getrennt. Zum Nachwaschen dienten je 350 cm³ der in der folgenden Tabelle genannten Lösungsmittel.

| Faktion Nr. | Lösungsmittel | Rückstand in mg |
|----------------|--------------------------|--------------------|
| 1—8 | Petroläther | 480 |
| 9—10 | Petroläther-Benzol (9:1) | 590 |
| 19—20 | Petroläther-Benzol (4:1) | 120 |
| 21 | Petroläther-Benzol (1:1) | 110 |
| 22—25 | Petroläther-Benzol (1:1) | 265 |
| 26—27 | Benzol | Spur |
| 28—31 | Benzol-Äther (1:1) | 585 |
| 32—34 | Äther | 400 |
| 35—36 | Äther+1% Methanol | 360 |

$\Delta^{2,4,6}$ -Cholestatrien (XVII): Nach Abdampfen des Lösungsmittels kristallisierten die Fraktionen 2—4 in Nadeln, Smp. 67—69⁰ (265 mg); sie wurden direkt bei 10⁻³ mm Hg destilliert (Ölbad 100—108⁰); Smp. 70—72⁰, $[\alpha]_D^{20} = -12,5^0$ (c = 1,345 in

¹⁾ Vgl. S. Bernstein, L. J. Binovi, L. Dorfmann, K. J. Sax & Y. Subbarow, J. Org. Chem. **14**, 433 (1949).

CHCl_3). Die Substanz zeigte das für das $4^{2,4,6}$ -Cholestanatrien (XVII) charakteristische UV.-Spektrum mit einem Maximum bei $307 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 15100$ (Cyclohexan). Mischschmelzpunkt mit oben beschriebenem XVII gleich, Farbreaktion ebenso.

7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI): Fraktionen 9–21, aus Äther 760 mg, Nadeln, Smp. $135\text{--}138^\circ$. Umkristallisiert aus Aceton, Smp. $138\text{--}139^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -54,2^\circ$ ($c = 1,235$ in CHCl_3). Die Substanz zeigte im UV. das für 7-Dehydro-cholesterylbenzoat charakteristische Spektrum.

7 α -Oxy-cholesterylbenzoat (IX): Fraktionen 28–34, aus Äther-Methanol 610 mg Nadeln, Smp. $180\text{--}186^\circ$ ¹⁾; zweimal umkristallisiert aus Äther-Petroläther, Smp. $190\text{--}192^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = +12,5^\circ$ ($c = 1,636$ in CHCl_3). Mischschmelzpunkt mit authentischem 7 α -Oxy-cholesterylbenzoat gleich. (Die ölichen Fraktionen 22–25 und 35–36 wurden nicht näher untersucht.)

XVII aus VIII mit Pyridin: 700 mg VIII vom Smp. $127\text{--}129^\circ$ und 8 cm^3 abs. Pyridin wurden in einer evakuierten Ampulle 6 Stunden erhitzt (Ölbad $135\text{--}140^\circ$). Übliche Aufarbeitung mit Äther ergab 578 mg Substanz, welche 37% Trien enthielt (spektrometrisch bestimmt). Diese wurde in 60 cm^3 Petroleum gelöst und an $20 \text{ g Al}_2\text{O}_3$ chromatographisch getrennt. Es wurden 5 Petrolätherfraktionen erhalten, die zusammen 223 mg wogen. Aus Fraktion 2 (176 mg), Smp. $64\text{--}67^\circ$, wurde XVII durch Destillation bei 10^{-3} mm Hg (Ölbad $100\text{--}108^\circ$) rein erhalten. Smp. $71\text{--}72^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -11,6^\circ$ ($c = 0,991$ in CHCl_3). UV.-Spektrum: Max. $307 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 14900$ (Cyclohexan).

| | | | |
|---------------------------------------|---------------|-----------|---------|
| $\text{C}_{27}\text{H}_{42}$ (366,61) | Ber. C 88,45 | H 11,45% | D.Z. 3 |
| | Gef. „, 88,45 | „, 11,58% | „, 2,99 |

D.Z. durch Mikrohydrierung mit Pt in Eisessig bei 722 mm bestimmt. Mischschmelzpunkt mit oben beschriebenem XVII gleich, Farbreaktion ebenso.

XVII aus VIII mit Essigsäureanhydrid: 520 mg VIII vom Smp. $127\text{--}129^\circ$ wurden mit 15 cm^3 Essigsäureanhydrid unter gereinigtem N_2 am Rückfluss $2\frac{1}{2}$ Stunden erhitzt (Ölbad $145\text{--}150^\circ$). Übliche Aufarbeitung mit Äther ergab 480 mg Substanz, welche ca. 47% Trien enthielt (spektrometrisch bestimmt). Diese wurde in 50 cm^3 Petroleum gelöst und an $15 \text{ g Al}_2\text{O}_3$ chromatographisch getrennt. Es wurden 3 Petrolätherfraktionen erhalten, die zusammen 218 mg wogen. Aus Fraktion 2 (114 mg), Smp. $68\text{--}70^\circ$, wurde XVII durch Destillation bei 10^{-3} mm Hg (Ölbad $100\text{--}108^\circ$) erhalten. Smp. $71\text{--}73^\circ$, $[\alpha]_D^{21} = -13,3^\circ$ ($c = 1,275$ in CHCl_3). UV.-Spektrum: Max. $307 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 13500$ (Cyclohexan).

| | | | |
|---------------------------------------|---------------|-----------|---------|
| $\text{C}_{27}\text{H}_{42}$ (366,61) | Ber. C 88,45 | H 11,55% | D.Z. 3 |
| | Gef. „, 88,40 | „, 11,48% | „, 2,11 |

D.Z. durch Mikrohydrierung mit Pt in Eisessig bei 722 mm bestimmt.

Mischschmelzpunkt mit oben beschriebenem XVII gleich, ebenso Farbreaktion.

Die zu tiefe D.Z. ist wahrscheinlich durch eine Verunreinigung der Substanz bedingt (siehe niedrigerer Extinktionskoeffizient).

XVII aus XIV: 620 mg 7β -Benzoxy-cholesterylbenzoat vom Smp. $154\text{--}156^\circ$ und 15 cm^3 Dimethylanilin wurden 8 Stunden in einer evakuierten Ampulle erhitzt (Ölbad $195\text{--}200^\circ$). Übliche Aufarbeitung mit Äther ergab 482 mg Substanz, die 54% Trien und 17% 7-Dehydro-cholesterylbenzoat enthielt (spektrometrisch bestimmt). Diese wurde in 50 cm^3 Petroleum gelöst und an $15 \text{ g Al}_2\text{O}_3$ chromatographisch getrennt. Es wurden 4 Petrolätherfraktionen erhalten, die zusammen 252 mg wogen. Aus Fraktion 2 (133 mg), Smp. $66\text{--}69^\circ$, wurde XVII durch Destillation bei 10^{-3} mm Hg (Ölbad $100\text{--}108^\circ$) erhalten. Smp. $70\text{--}72^\circ$, $[\alpha]_D^{19} = -25,3^\circ$ ($c = 2,013$ in CHCl_3). UV.-Spektrum: Max. $307 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 8630$ (Cyclohexan). Mischschmelzpunkt mit dem oben beschriebenen XVII $67\text{--}70^\circ$,

¹⁾ Auf Grund der leichten Epimerisierung von 7β -Brom-cholesterylbenzoat, H. Schaltegger & F. X. Müllner, Helv. **34**, 1096 (1951), könnten die Mutterlaugen noch 7β -Oxy-cholesterylbenzoat enthalten haben.

Farbreaktion gleich. Das Trien konnte nicht rein erhalten werden (siehe optische Drehung und Extinktionskoeffizient).

Aus den 4 Fraktionen mit Petroläther-Benzol (4:1) (108 mg) wurden aus Äther Nadeln vom Smp. 137—139° erhalten, die das für 7-Dehydro-cholesterylbenzoat (VI) charakteristische UV.-Spektrum zeigten.

Δ^{4,6}-Cholestadien-3β-ol (VII).

In einem Kolben mit Rührer wurden 76 mg LiAlH₄ in 60 cm³ abs. Äther gelöst. Darauf wurde unter Feuchtigkeitsausschluss und starkem Rühren eine Lösung von 764 mg *Δ^{4,6}-Cholestadien-3-on* (IV)¹⁾ vom Smp. 79—81° in 30 cm³ abs. Äther innerhalb 20 Minuten zugetropft. Nachdem noch 2 Stunden bei 20° gerührt worden war, wurde vorsichtig mit einer gesättigten *Seignette*-Salzlösung zersetzt und die Ätherphase mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ und Abdampfen des Äthers betrug der Rückstand 762 mg. Dieser wurde in 150 cm³ Alkohol gelöst, mit 3,2 g Digitonin versetzt, 15 Minuten unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei 20° stehengelassen. Die Digitonid-Fällung wurde darauf abgenutscht, mit wenig Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Digitonid = 2,987 g ~ 710,5 mg VII (= ca. 93%).

Die alkoholische Lösung wurde im Vakuum zur Trockne gebracht, mit Äther extrahiert, filtriert und eingedampft. Rückstand 36 mg.

Die Digitonid-Fällung wurde in 35 cm³ abs. Pyridin warm gelöst, mit 350 cm³ abs. Äther gefällt, abgenutscht und die Ätherphase mit Wasser pyridinfrei gewaschen, getrocknet und eingedampft. Rückstand aus Aceton: 630 mg Kristalle vom Smp. 112—114°, $[\alpha]_D^{20} = -31,9^\circ$ (c = 1,302 in CHCl₃). Acetat: aus Aceton Nadeln vom Smp. 74—75°, $[\alpha]_D^{20} = -63,6^\circ$ (c = 1,481 in CHCl₃). UV.-Spektrum: Max. bei 239 m μ , $\epsilon = 28156$ und 233 m μ , $\epsilon = 21970$ (in Alkohol).

Die Mikroanalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium von Herrn *Aug. Peisker-Ritter*, Brugg, ausgeführt.

Die UV.-Spektren wurden mit einem *Beckman*-Spektrophotometer, Modell DU, aufgenommen.

Zusammenfassung.

1. Bei der HBr-Abspaltung aus 7 β -Brom-cholesterylbenzoat wurde als Nebenprodukt ein Trien isoliert, dem sehr wahrscheinlich die Formel eines *Δ^{2,4,6}-Cholestatriens* zukommt.

2. Dasselbe *Δ^{2,4,6}-Cholestatrien* wurde aus *Δ^{4,6}-Cholestadien-3 β -ylbenzoat* durch Einwirkung von Pyridin und Essigsäureanhydrid erhalten, ebenso aus 7 β -Benzoxy-cholesterylbenzoat mit Dimethyl-anilin.

3. Es wird der Mechanismus der HBr-Abspaltung aus 7-Brom-cholesterylbenzoat besprochen.

Wissenschaftliche Abteilung der *Dr. A. Wander AG.*, Bern
Leiter: *P.-D. Dr. med. G. Schönholzer.*

¹⁾ *E. Dane, Y. Wang & W. Schulte*, Z. physiol. Ch. **245**, 80 (1937).