

Zusammenfassung.

Durch Reduktion von DL-Methionin-isopropylester und D-Methionin-isopropylester mittels Lithium-aluminiumhydrid wurden die Aminoalkohole DL-Methioninol und D-Methioninol dargestellt. Von beiden werden Hydrochloride, O,N-Di-[p-nitrobenzoyl]-Derivate und die entsprechenden Sulfone beschrieben.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

103. Vitamin D₃-4-¹⁴C-butyrat

von F. Hunziker.

(22. IV. 55.)

Für die Markierung von Vitamin D₃ mit isotopem Kohlenstoff nach Methoden der organisch-präparativen Chemie scheint die Partialsynthese aus markiertem Cholesterin der weitaus gangbarste Weg. Die Veröffentlichung einer derartigen Synthese (Markierung am C-Atom 3) durch *Havinga & Bots*¹⁾ veranlasst uns, eigene Resultate bekanntzugeben.

Für biologische Tracer-Versuche, über die wir anderwärts zu berichten hoffen, wurde im Ringsystem mit ¹⁴C markiertes Vitamin D₃ benötigt, und es gelang, durch Kombination von teilweise etwas abgeänderten, prinzipiell aber bekannten Methoden, Vitamin D₃-4-¹⁴C- auf einem relativ einfachen und ergiebigen Weg zu synthetisieren und als kristallisiertes Butyrat zu isolieren. Ausgehend von Derivaten der A-Nor-3,5-seco-cholestan-5-on-3-säure (I) führen bekannte Methoden unter Wiedereinbau des fehlenden Kohlenstoffatoms zu in 3- oder 4-Stellung markiertem Cholestenon (VI)²⁾³⁾⁴⁾. Gewählt wurde die Umsetzung des Enol-lactons 4-Oxa-cholest-5-en-3-on (II) mit markiertem Methylmagnesiumjodid. Die Keto-Säure I kann leicht durch Ozonisierung von Cholest-4-en-3-on und nachfolgende Oxydation des Spaltproduktes mit Wasserstoffsperoxyd und Perjodsäure erhalten werden²⁾⁵⁾. Durch Kochen der Ketosäure mit Acetanhydrid und Acetylchlorid wird das Enol-lacton II²⁾ erhalten. Bei der Umsetzung dieses Enol-lactons mit Methylmagnesiumjodid wurde in der inversen

¹⁾ E. Havinga & J. P. L. Bots, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **73**, 393 (1954).

²⁾ R. B. Turner, J. Amer. chem. Soc. **72**, 579 (1950).

³⁾ G. J. Fujimoto, J. Amer. chem. Soc. **73**, 1856 (1951).

⁴⁾ R. D. H. Heard & P. Ziegler, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4036 (1951).

⁵⁾ Eine grössere Menge Ketosäure I wurde uns von Herrn Prof. Dr. Kuno Meyer, Basel, freundlicherweise überlassen, wofür wir zu grossem Dank verpflichtet sind. Sie wurde von Herrn cand. chem. St. Pataki hergestellt.

Zugabe (*Grignard*-Reagens zu II nach *Fujimoto*¹⁾ und *Heard & Ziegler*²⁾) kein Vorteil gefunden gegenüber der experimentell einfacheren normalen Ausführung. Das nach der Zerlegung des Komplexes mit Salzsäure und Eis erhaltene Rohprodukt der *Grignard*-Reaktion, mehrheitlich bestehend aus dem Enol-halbacetal (3-Methyl-4-oxa-cholest-5-en-3-ol) (III), wurde mit Vorteil direkt mit methanolischer Kalilauge verkocht und das als Neutralstoff isolierte Cholest-4-en-3-on (VI) chromatographisch gereinigt. Von den verschiedenen veröffentlichten Methoden zur Reduktion von Δ^4 -3-Ketonen zu Δ^5 -3 β -Oxy-Verbindungen schien uns die Reduktion von Cholestenon-enolacetat (VII) mit Natriumborhydrid nach *Dauben & Eastham*³⁾ am besten geeignet. Unter geringen Abänderungen, die durch den grösseren Massstab bedingt waren, lieferte dieses Verfahren als Hauptprodukt Cholesterin (VIIIa), daneben etwas Epicholesterin (IXa) und ölige Anteile, die Cholesta-3,5-dien (X) enthielten. Aus dem Cholesterin wurde in üblicher Weise durch Acylierung mit Benzoylchlorid in Pyridin Cholesterylbenzoat (VIIIb) erhalten.

Schwieriger war die Ausarbeitung einer Synthese von Vitamin D₃ aus Cholesterin in kleinem Maßstab; Cholesteryl-benzoat wurde in 7-Stellung bromiert nach der erstmals von *Ziegler*⁴⁾ erwähnten und seither oftmals in verschiedenen Varianten⁵⁾ beschriebenen Methode mit N-Brom-succinimid (NBS). Zur Dehydrobromierung verwendete man in bekannter Weise N,N-Dimethylanilin. Nach Verseifung des rohen Abspaltungsproduktes wurde über das 3,5-Dinitrobenzoat XIIc reines 7-Dehydro-cholesterin (XIIa) erhalten.

Zur Bestrahlung kleiner Mengen 7-Dehydro-cholesterin diente eine in bekannter Weise arbeitende Apparatur (2 hintereinander geschaltete Quarz-Hohlzyylinder mit Quecksilberdampf-Ultraviolett-lampen, Bestrahlung der Provitaminlösung im Durchlauf).

Die Aufarbeitung der Bestrahlungsprodukte erfolgte am besten durch Trennung der Dinitrobenzoate des rohen Bestrahlungsproduktes in einen leicht ätherlöslichen und einen in Äther äusserst schwerlöslichen Anteil (Dinitrobenzoat von nicht umgesetztem 7-Dehydro-cholesterin). Bei der Chromatographie des leichtlöslichen Dinitrobenzoat-Anteiles in Petroläther an aktiviertem, nicht alkalisch reagierendem Aluminiumoxyd wanderten die Dinitrobenzoate der 9,10-Seco-Bestrahlungsprodukte rasch, während diejenigen der intakten Vierring-Sterine (7-Dehydro-cholesterin, Lumisterin) weitgehend zu-

¹⁾ G. J. Fujimoto J. Amer. chem. Soc. **73**, 1856 (1951).

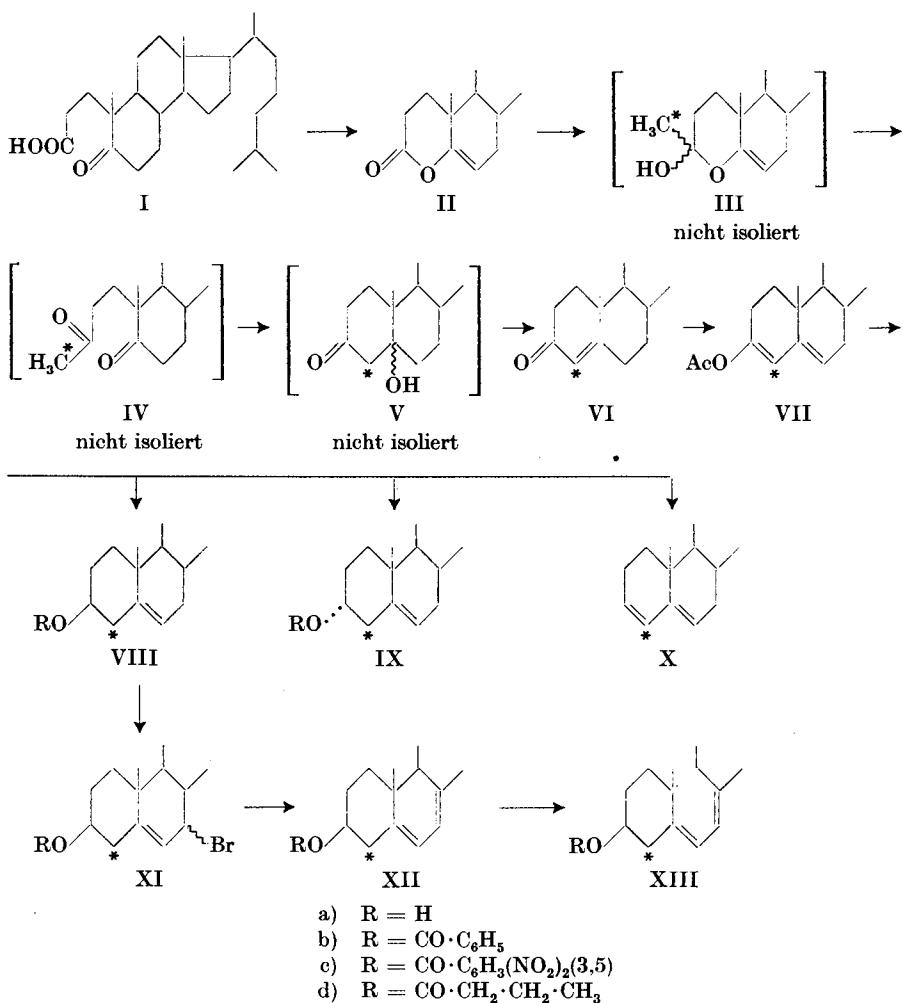
²⁾ R. D. H. Heard & P. Ziegler, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4036 (1951).

³⁾ W. G. Dauben & J. F. Eastham, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4463 (1951).

⁴⁾ K. Ziegler, A. Späth, E. Schaaaf, W. Schumann & E. Winkelmann, Liebigs Ann. Chem. **551**, 80 (1942).

⁵⁾ Als Beispiel einer der ersten ausführlichen Beschreibungen sei zitiert: A. E. Bide, H. B. Henbest, E. R. H. Jones, R. W. Peevers & P. A. Wilkinson, J. chem. Soc. **1948**, 1783.

rückgehalten wurden. Kristallisieren der Petroläthereluate aus Petroläther lieferte ein Vitamin-D₃- (3',5'-dinitrobenzoat) (XIIIc) von etwa 90% Reinheit.



Daraus konnte durch vorsichtige Verseifung und anschliessende Butyrylierung mit n-Buttersäureanhydrid in Pyridin kristallisiertes Vitamin-D₃-butyrat (XIII d)¹⁾ erhalten werden, das bei besserer Beständigkeit mindestens gleiche molekulare Wirksamkeit besitzt wie freies D₃ (XIII a) und nach den bisherigen Erfahrungen auch sonst biologisch vollwertig ist.

Bei der Durchführung der ganzen Synthese mit ¹⁴C-Methyljodid wurden bei allen Stufen unter den gleichen Bedingungen dieselben Ausbeuten erhalten wie mit stabilem

¹⁾ H. Schallegger & F. X. Müllner; zum Patent angemeldet.

Material, mit einer Ausnahme: bei der Bromierung von Cholesteryl-benzoat (VIII b) mit NBS und katalytischen Mengen Dibenzoylperoxyd unter Bedingungen, die durch zahlreiche Blindversuche mit stabilem Material erprobt waren, trat eine Störung auf, die nur durch besondere Massnahmen (siehe exper. Teil) behoben werden konnte. Da kein äusserer Umstand als Ursache geltend gemacht werden kann, wäre an einen Einfluss des radioaktiven Kohlenstoffs zu denken. Bei der Bromierung in Allylstellung zu einer Doppelbindung mit NBS und Dibenzoylperoxyd in unpolaren Lösungsmitteln ist ein Radikalmechanismus vorgeschlagen und begründet worden¹⁾, nach dem Dibenzoylperoxyd primär in Radikale zerfällt und die Kettenreaktion auslöst. Möglicherweise haben die vom ¹⁴C emittierten Elektronen die Radikalbildung behindert. Eine Überschlagsrechnung für die konkreten Versuchsbedingungen gibt allerdings eine gewaltige Diskrepanz zwischen den im Spiel stehenden Grössenordnungen (emittierte, allenfalls gespeicherte Elektronen einerseits, Konzentration des Dibenzoylperoxyds anderseits). Nach Behebung der Störung, Dehydrebromierung, Verseifung und Dimitrobenzoylierung war die Ausbeute an reinem 7-Dehydro-cholesteryl-(3',5'-dinitrobenzoat) normal.

Die zur Verfügung stehende Methode zur Bestimmung der absoluten Radioaktivität war nicht so genau, dass man sichere Aussagen machen könnte über allfällige Isotopenkontraktionsverschiebungen während der Synthese infolge kinetischer Isotopie-Effekte²⁾, die an sich durchaus möglich wären bei den Reaktionsstufen, wo das markierte C-Atom an der Reaktion beteiligt war und die Reaktion nicht einheitlich oder nicht vollständig abließ. Auf jeden Fall zeigte das Endprodukt, Vitamin-D₃-4-¹⁴C-butyrat (XIII d) annähernd die erwartete Radioaktivität, die Zwischenprodukte VIII b und XII c hingegen eine zu niedrige.

Experimenteller Teil.

Messung der Radioaktivität (β -Strahlung).

(Die Messungen wurden von Dr. G. G. Poretti, Beta-Synchrotron-Institut, Inselspital Bern, ausgeführt⁴⁾). Zur Verfügung stand ein Geiger-Müller-Glockenzählrohr (Tracerlab) mit Glimmerfenster 1,7 mg/cm², kombiniert mit Impulsuntersetzer ELA 3 (Landis & Gyr). Abgemessene Chloroformlösungen bekannten Gehalts der Substanzen wurden auf polierten Messingplättchen eingedunstet. Aus den gemessenen „cpm“ (counts per minute) wurde die absolute Radioaktivität „dpm“ (disintegrations per minute) berechnet nach folgender Korrekturformel:

$$(cpm) = (dpm) \cdot f_{Ab} \cdot f_{Av} \cdot f_s \cdot f_b \cdot f_{Sa} \cdot E.$$

Die Bedeutung der experimentell bestimmten Korrekturfaktoren ist nachstehend aufgeführt, Zahlenwerte für den konkreten Fall in Klammern:

f_{Ab} = Faktor für Absorption der β -Teilchen in der Luft und im Zählrohrfenster (0,57 für ¹⁴C und 1,7 mg/cm² Glimmerfenster);

f_{Av} = Faktor für Auflösungsvermögen des Zählrohrs (0,993);

f_s = Faktor für „scattering“ der β -Teilchen in der Luft zwischen Quelle und Zählrohr (= 1, da zu vernachlässigen);

f_b = Faktor für „backscattering“ (1,16 für ¹⁴C und Messing);

f_{Sa} = Faktor für „scattering“ und Selbstabsorption in der Quelle (= 1, da zu vernachlässigen, weil Quelle nicht dicker als 0,02 mg/cm²);

E = Zählrohrwirksamkeit, wobei E_{reell} immer etwas kleiner als E_{geom} (13,5%).

Somit wird erhalten:

$$dpm = cpm / 0,0885; \text{ „dis/sec“} = dpm / 60.$$

¹⁾ C. F. Bloomfield, J. chem. Soc. 1944, 114.

²⁾ G. A. Ropp, Nucleonics 10, Nr. 10, 22 (1952).

³⁾ F. Weygand & H. Grisebach, Fortschr. chem. Forsch. 3, 172 (1954).

⁴⁾ Herrn Dr. G. G. Poretti sei bestens gedankt nicht nur für die Messungen, sondern auch für zahlreiche Auskünfte und Ratschläge in kernphysikalischen, radiologischen und messtechnischen Fragen im Zusammenhang mit dieser Arbeit.

Bei der Beschreibung der Synthese ist unter „theoretischer Erwartung“ oder „theoretischer Verdünnung“ immer zu verstehen: die aus der eingesetzten strahlenden Substanz (im konkreten Fall 1 mC ^{14}C -Methyljodid) und den willkürlich oder planmäßig vorgenommenen Isotopenverdünnungen errechnete Radioaktivität oder Verdünnung, ohne Berücksichtigung allfälliger möglicher Isotopen-Konzentrationsverschiebungen.

Beschreibung der Synthese:

(Smp. wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt, UV.-Absorptionsspektren mit einem *Beckman*-Spektralphotometer, Modell DU).

Zwei Qualitäten Aluminiumoxyd wurden zur Chromatographie verwendet, im folgenden Text als „aktiviert“ und „nicht aktiviert“ bezeichnet: „Nicht aktiviertes Aluminiumoxyd“: Gebrauchtes Al_2O_3 (*Merck*) wurde durch Sieben von Verunreinigungen befreit und wiederholt je 5 Min. unter Röhren mit Methanol aufgekocht, bis das abgesaugte Filtrat keinen Eindampfrückstand mehr aufwies. Dieselbe Prozedur wurde dreimal mit Essigester wiederholt. Das Produkt wurde 3 Std. im Vakuum auf dem Dampfbad getrocknet. Die Aufschämmung von 10 g davon in 100 cm³ dest. Wasser zeigte nach 15 Min. Röhren ein pH von 6,0 (Glaselektrode).

„Aktiviertes Aluminiumoxyd“: Produkt der vorstehenden Qualität 45 Min. bei 150° im Vakuum erhitzt, pH 4,3 unter denselben Bedingungen.

„Übliche Aufarbeitung“ von ausgeschütteten Ätherlösungen bedeutet: mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert, mit Äther gut nachgewaschen, vereinigte Ätherlösungen zur Trockne eingeengt, zuletzt am Vakuum.

Cholest-4-en-3-on-4- ^{14}C (VI): Aus 1,49 g Methyljodid (10,5 mMol), enthaltend 1 mC ^{14}C -Methyljodid¹⁾, 0,27 g Magnesiumspäne (11,0 mMol) und 24 cm³ abs. Äther wurde in normaler Weise eine Methylmagnesiumjodidlösung bereitet. Unter leichtem Erwärmen wurde innert 20 Min. die Lösung von 4,07 g Enol-lacton II²⁾ (10,5 mMol) in 10 cm³ abs. Äther und 10 cm³ abs. Benzol eingetropft. Die resultierende homogene Lösung wurde noch 1 Std. unter Rückfluss gehalten. Nach Zerlegung mit Eis und verd. Salzsäure wurde mit Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösung zweimal mit verd. Salzsäure und Eis, dreimal mit Wasser ausgeschüttelt und in üblicher Weise aufgearbeitet.

Den kristallinen Rückstand (4,46 g), mehrheitlich bestehend aus dem Enol-halbacetal III, kochte man 2 Std. mit 250 cm³ 4-proz. methanolischer Kalilauge unter Rückfluss. Nach Verdampfen der Hauptmenge Methanol wurde zwischen Äther und Wasser verteilt, die Ätherlösung viermal mit Wasser gewaschen und in üblicher Weise aufgearbeitet.

Durch Ansäuern der wässrig-alkalischen Anteile, Extraktion mit Äther und übliche Aufarbeitung wurden 1,1 g kristallisierende organische Säure erhalten: hauptsächlich durch Spaltung unverbrauchten Enol-lactons II erhaltene Keto-Säure I, die nicht weiter untersucht wurde.

Der glasige Rückstand der Neutralteile (3,17 g) wurde in Petrolätherlösung durch eine Säule aus 80 g Al_2O_3 (nicht aktiviert) filtriert: 1600 cm³ Petrolätherluat gaben 2,53 g völlig kristallisierenden Eindampfrückstand, der auf Grund der Vorversuche als ziemlich reines Cholestenon (VI) angesehen werden konnte und nicht weiter gereinigt wurde (Theor. Verdünnung 1 mC/10,5 mMol).

Cholestenon-4- ^{14}C -enolacetat (VII): Die 2,53 g Cholestenon wurden mit 2,19 g stabilem reinem Cholestenon vereinigt und nach *Westphal*³⁾ in das Enolacetat VII übergeführt. Alle aus Methanol kristallisierbaren Anteile wurden vereinigt (4,86 g) und nicht weiter gereinigt, da sie auf Grund der Vorversuche als nahezu rein anzusehen waren (theor. Verdünnung 1 mC/20 mMol).

Cholesterin-4- ^{14}C (VIIIa): 4,86 g Enolacetat der vorhergehenden Stufe wurden in einem Dreihalskolben mit Rückflusssieder, Rührwerk und Tropftrichter in 225 cm³ Äther gelöst und mit 625 cm³ Methanol verdünnt. Unter Röhren und Kühlen mit einem

¹⁾ 1 mC/26 mg bezogen von „The Radiochemical Centre“, Amersham, England.

²⁾ *R. B. Turner*, J. Amer. chem. Soc. **72**, 579 (1950).

³⁾ *U. Westphal*, Ber. deutsch. chem. Ges. **70**, 2128 (1937).

Eiswasserbad innert 1 Std. die Lösung von 5,0 g Natriumborhydrid in 125 cm³ Methanol zugetropft. Nach Stehenlassen bei 6° während 20 Std. wurde 2 Std. unter Rückfluss gerührt und nach Versetzen mit 19 cm³ 38-proz. Salzsäure noch 1 Std. Die vorübergehend vom ausgefallenen Salz abgegossene Lösung wurde im Vakuum möglichst konzentriert. Hierauf wurde alles Material zwischen Wasser und Äther verteilt, die Ätherlösung gut mit Wasser gewaschen und in üblicher Weise aufgearbeitet. Der kristallisierte Eindampfrückstand (4,40 g) wurde in Petrolätherlösung durch eine Säule aus 135 g Al₂O₃ (nicht aktiviert) chromatographiert. Erschöpfende Elution mit Petroläther (1800 cm³) gab einen Eindampfrückstand von 1,14 g. Nachfolgende Elution mit Äther (500 cm³) gab praktisch reines Cholesterin (VIIIa); Ausbeute 3,17 g.

Epicholesterin-4-¹⁴C (IXa): 1,14 g Rückstand aus den Petroläthereluataten (siehe oben) wurden in Petroläther noch einmal chromatographiert an 35 g Al₂O₃ (aktiviert). Mit Petroläther liessen sich total 1,03 g Substanz eluieren, zuerst ölige, dann kristallisierte Anteile. Aus den letzteren konnte durch Umkristallisieren aus Methanol unter Klärung mit Aktivkohle 0,32 g Epicholesterin (IXa) in farblosen Blättchen vom Smp. 140–141° gewonnen werden. Dieses wurde nicht weiter untersucht (theoretische Verdünnung 1 mC/20 mMol = 0,13 μC/mg).

Cholesteryl-4-¹⁴C-benzoat (VIIIb): 3,17 g Äthereluat aus der Reduktion mit Natriumborhydrid (siehe oben) wurden in normaler Weise mit Benzoylchlorid in Pyridin acyliert und aufgearbeitet. Die bis zur beginnenden Kristallisation eingeengte Ätherlösung des Rohproduktes wurde mit Methanol auf 125 cm³ verdünnt. Nach Stehen bei –10° wurde abgesaugt, mit Methanol derselben Temperatur nachgewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 3,80 g farblose Blättchen vom Smp. 146°–148° (doppelbrechende Schmelze). [α]_D²⁶ – 16,5° ± 1° (c = 0,842 in CHCl₃). Theor. Erwartung: 1 mC/20 mMol = 0,102 μC/mg; gezählt 0,05 cm³/0,0715 mg: cpm 600 ± 12, daraus berechnet 113 dis/sec/0,715 mg = 0,043 μC/mg.

Aus der Mutterlauge wurde noch eine unreine Fraktion von 0,05 g erhalten, die verworfen wurde.

7-Dehydrocholesteryl-4-¹⁴C-(3',5'-dinitrobenzoat) (XIIc): 3,78 g Cholesteryl-benzoat aus der vorstehenden Stufe wurden mit 0,14 g stabilem Material auf 3,92 g (8 mMol) ergänzt. Das gesamte Material wurde durch Erwärmen mit 20 cm³ abs. Petroläther (Sdp. 50–70°) und 20 cm³ abs. Benzin (70–110°) in einem Schließkolben mit Rückflusskühler und Trockenröhren zum Lösung gebracht. Nach 10 Min. gab man 1,70 g pulverisiertes N-Bromsuccinimid (9,6 mMol) und 5 mg Dibenzoylperoxyd zu und erhitzte das Gemisch in einem Bad von 85° unter Rückfluss. Unter diesen Bedingungen war bei den Blindversuchen mit stabilem Material innert 10 Min. immer glatt Bromierung eingetreten.

In diesem speziellen Fall war die Reaktion nach empirischen Anzeichen auch nach 18 Min. noch unvollständig. Beim Abkühlen auf 20° und Filtrieren wurde diese Vermutung bestätigt: unverbrauchtes Cholesteryl-benzoat schied sich zum Teil sogar auf dem Filter aus und wurde mit viel Petroläther wieder gelöst; auch das Gewicht des NBS/Succinimid-Filtrerrückstandes deutete auf unvollständige Bromierung hin.

Der völlig kristallisierte Rückstand des Petroläther-Benzin-Filtrats (erhalten nach Einengen im Vakuum bei 35°) wurde mit 0,85 g pulv. NBS, etwas Dibenzoylperoxyd, 20 cm³ Petroläther und 20 cm³ Benzin noch einmal zum Rückfluss gebracht, diesmal unter Belichtung mit einer 250-W-Glühbirne. Ein günstiger Einfluss starker Belichtung auf die Bromierung mit Bromsuccinimid war erstmals von *Miescher* und Mitarb.¹⁾ festgestellt worden.

Diesmal bot sich das Bild einer normal verlaufenden Bromierung. Nach 7 Min. wurde abgebrochen, auf 10° gekühlt, vom Niederschlag abgesaugt und mit Petroläther derselben Temperatur nachgewaschen. Das Filtrat lieferte nach Einengen im Vakuum bei 35° 5,04 g rohes 7-Bromcholesteryl-4-¹⁴C-benzoat (XIb) als hellgelbes Harz mit Ansatz zur Kristallisation.

¹⁾ *Ch. Meystre, L. Ehmann, R. Neher & K. Miescher, Helv. 28, 1252 (1945).*

Es wurde zur Dehydribromierung mit 25 cm³ frisch über Natrium dest. N,N-Dimethylanilin 1 Std. im Vakuum auf 140° erhitzt. Nach Verteilen zwischen Äther und überschüssiger, eiskalter verd. Salzsäure wurde die Ätherlösung je dreimal mit Salzsäure und Eis, dann mit Wasser gewaschen und in üblicher Weise aufgearbeitet. Der grösstenteils kristallisierte Rückstand enthielt neben 7-Dehydro-cholesteryl-benzoat (XII b) noch die normalen Begleitstoffe der Dehydribromierung (Cholesta-4,6-dien-3β-yl-benzoat und Cholesta-2,4,6-trien).

Zur Verseifung wurde 45 Min. mit 40 cm³ Benzol und 40 cm³ 5-proz. methanolischer Kalilauge unter N₂-Atmosphäre gekocht. Nach weitgehendem Einengen im Vakuum wurde zwischen Wasser und frisch dest. Äther verteilt, die Ätherlösung viermal mit Wasser gewaschen und in üblicher Weise aufgearbeitet. Der grösstenteils kristallisierte Rückstand (3,45 g) enthielt das freie 7-Dehydro-cholesterin (XII a).

Die Lösung des rohen Verseifungsproduktes in 25 cm³ abs. Pyridin wurde unter Umschwenken mit 3,8 g pulverisiertem 3,5-Dinitrobenzoylchlorid versetzt, wobei unter Erwärmung kristallisiertes Dinitrobenzoat ausfiel. Nach 63 Std. Stehen (evakuiert, im Dunkeln) wurde mit 50 cm³ Methanol versetzt. Nach weiteren 2 Std. Stehen bei Raumtemperatur wurde abgesaugt, je dreimal mit Methanol und kaltem Aceton nachgewaschen und aus Essigester umkristallisiert. Man erhielt 1,82 g 7-Dehydrocholesteryl-4-¹⁴C-3,5-dinitrobenzoat (XII c) in goldgelben Nadeln, die nach dem Zersetzungspunkt (205–210°) recht rein sein mussten. Theor. Erwartung: 1 mC/20,7 mMol = 0,083 μC/mg; gezählt 0,05 cm³/0,081 mg: cpm 536 ± 11,5, daraus berechnet 101 dis/sec/0,081 mg = 0,034 μC/mg.

Aus der Essigester-Mutterlauge wurden noch 0,10 g etwas weniger reines Dinitrobenzoat erhalten.

Vitamin D₃-4-¹⁴C-(3', 5'-dinitrobenzoat) (XII c): 1,81 g 7-Dehydrocholesterin-4-¹⁴C-3,5-dinitrobenzoat der vorstehenden Reaktionsstufe wurden zusammen mit 0,44 g stabilem Material (total 2,25 g der theoret. Verdünnung 1 mC/25,7 mMol) mit 12 cm³ Dioxan (frisch über Na dest.) und 9 cm³ 5-proz. methanolischer KOH (frisch bereitet) im Vakuum 1½ Std. bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei völlige Verseifung eintrat und das freie 7-Dehydrocholesterin z. T. auskristallisierte. Nach Verteilen zwischen frisch dest. Äther und viel Wasser wurde abgetrennt, gründlich mit Wasser gewaschen und in üblicher Weise aufgearbeitet.

Der Rückstand, 1,51 g kristallisiertes 7-Dehydro-cholesterin (XII a), wurde in der Bestrahlungsapparatur 3 Std. im Hochvakuum belassen, wobei zwischenhin ein zweimal das Vakuum mit Stickstoff abgelöst wurde. Dann wurde in 2,1 l frisch destilliertem peroxydfreiem Äther gelöst und unter Stickstoffatmosphäre nach der für die Apparatur gegebenen Vorschrift im Durchlauf bestrahlt, Bestrahlungsdauer total 60 Min. Der Eindampfrückstand der Bestrahlungslösung (1,57 g gelbliches Harz) wurde in 5 cm³ frisch über Na dest. Dioxan und 5 cm³ abs. Pyridin gelöst und mit 1,5 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (pulv.) unter Wasserkühlung und Umschwenken versetzt. Nach 63 Std. Stehen (evakuiert, im Dunkeln) wurde mit Eiswasser auf 100 cm³ verdünnt. Der ausgefallene gelbe Niederschlag, zunächst klebrig, war nach einigem Stehen unter gelegentlicher mechanischer Bearbeitung filtrierfähig. Er wurde abgesaugt, gründlich mit Wasser ausgewaschen und wiederholt mit kaltem Äther extrahiert. Die abgesaugten Ätherextrakte wurden über Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Eis gesammelt.

Der Filterrückstand, mit Methanol und Aceton nachgewaschen, bestand aus 0,38 g ziemlich reinem 7-Dehydro-cholesteryl-dinitrobenzoat.

Der gesamte Ätherextrakt wurde dreimal mit Kaliumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt und in üblicher Weise aufgearbeitet, Rückstand 1,95 g gelbrotes Dinitrobenzoat-harz. Es löste sich bis auf geringe amorphe Bestandteile in Petroläther. Die Lösung wurde durch eine Säule aus 60 g Al₂O₃ (aktiviert) chromatographiert; die Elution mit Petroläther war nach total 2500 cm³ vollständig, Gesamtrückstand 1,40 g hellgelbes Harz. Aus einer Lösung in etwa 10 cm³ Petroläther kristallisierte bei -10° Vitamin-D₃-dinitrobenzoat aus. Es wurde abgesaugt und mit gekühltem Petroläther nachgewaschen. Beim Wiederauflösen dieses Niederschlags in wenig kaltem Äther blieb etwas 7-Dehydro-cholesteryl-dinitro-

benzoat ungelöst. Es wurde abfiltriert und mit kaltem Äther nachgewaschen. Das vereinigte Filtrat wurde zur Trockne eingeengt und noch einmal aus Petroläther umkristallisiert; ebenso wurden auch aus den Mutterlaugen noch Kristallisate gewonnen. Total wurden erhalten: 0,40 g, Smp. 131,5–132,5°, $[\alpha]_D^{25} + 93,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,564$ in CHCl_3); 0,04 g, Smp. 131–133°, $[\alpha]_D^{23,5} + 89,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,520$ in CHCl_3); 0,06 g (erst nach langerem Stehen der letzten Mutterlauge erhalten, nicht weiter charakterisiert).

Alle drei Fraktionen waren ganz blassgelb und haben die theoretische Aktivität 1 mC/25,7 mMol. Vitamin-D₃-dinitrobenzoate mit den Konstanten von Fraktion 1 oder 2 haben erfahrungsgemäß eine Reinheit von etwa 90%.

Vitamin-D₃-4-¹⁴C-butyrat (XIII d): 115 mg Vitamin-D₃-4-¹⁴C-(3',5'-dinitrobenzoat) (XIII c, theor. Aktivität 1 mC/25,7 mMol) wurden mit frisch über Na dest. Dioxan und frisch bereiteter 5-proz. methanolischer KOH (je 4 cm³) 1 Std. im Vakuum bei Raumtemperatur belassen, wobei eine rotviolette Lösung entstand. Nach Verdünnen mit frisch destilliertem Äther wurde viermal gegen viel Wasser verteilt und die Ätherlösung in üblicher Weise aufgearbeitet.

Das erhaltene Harz von freiem Vitamin-D₃ (85 mg) wurde mit 3 cm³ abs. Pyridin und 1 cm³ dest. n-Buttersäureanhydrid 63 Std. im Vakuum bei Raumtemperatur belassen. Nach Zusatz von etwas Methanol und Stehen für eine weitere Std. bei Raumtemperatur wurde im Vakuum im Warmwasserbad möglichst eingeengt, der Rückstand zwischen Eiswasser und frisch dest. Äther verteilt, die Ätherlösung dreimal mit verd. Salzsäure und Eis, zweimal mit Wasser, dreimal mit Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Eis und einmal mit Sole ausgeschüttelt und in üblicher Weise aufgearbeitet.

Die 0,20 g harziger Rückstand lösten sich nicht ganz in Petroläther; etwas weisse kristalline Substanz blieb ungelöst. Die Petrolätherlösung wurde durch eine Säule aus 6,0 g Al_2O_3 (nicht aktiviert) filtriert. Beim Nachwaschen in Petroläther war alle eluierbare Substanz in den ersten 120 cm³ enthalten, Eindampfrückstand 159 mg farbloses Öl. Es kristallisierte aus kalter konzentrierter Acetonlösung auf vorsichtigen Methanolzusatz. Die Kristallisation wurde bei –10° vervollständigt. Nach dem Absaugen wurde mit gekühltem Methanol nachgewaschen. Das Kristallat wurde in Petroläther gelöst und zusammengeküsst und der Eindampfrückstand noch einmal aus Aceton-Methanol umkristallisiert. Erhalten wurden 43 mg Vitamin-D₃-butyrat als farblose Nadelchen:

Smp. 62–64°, $[\alpha]_D^{25} + 39,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,315$ in CHCl_3).

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$: 343,1; 390,2; 329,4 für λ 255, 265, 273 m μ bzw. (Cyclohexan);

entspricht einem Gehalt von 92% Vitamin-D₃-butyrat.

Theor. Erwartung: 1 mC/25,7 mMol = 0,085 $\mu\text{C}/\text{mg}$; gezählt 0,03 cm³/0,01656 mg; cpm 232 ± 5, daraus berechnet 43,7 dis/sec/0,01656 mg = 0,071 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

(Konstanten von reinem Vitamin-D₃-butyrat: Smp. 63–65°, $[\alpha]_D + 39^\circ$ (CHCl_3), λ_{max} 265 m μ , $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 423$.)

Erhaltene Ausbeuten.

Produkt	Erhalten in % der Theorie aus:						
	II	VI	VII	VIIIa	VIIIb	XIIc	XIIId
VI	63						
VII	58	93					
VIIIa	42	67	72				
VIIIb	39	63	68	94			
XIIc	16	26	28	39	41		
XIIId	3,2	5,2	5,6	7,7	8,2	20	45
XIIIf	1,45	2,3	2,5	3,5	3,7	9,0	

Zusammenfassung.

Es wird die Synthese von Vitamin-D₃-4-¹⁴C-butyrat durch eine Kombination grundsätzlich bekannter, etwas vereinfachter Methoden beschrieben.

Forschungsinstitut der
Dr. A. Wander AG., Bern,
Leitung: PD. Dr. med. G. Schönholzer.

104. 1-Methyl-4-benzyl-piperidin-4-carbonsäure-äthylester und neue Synthese des 1-Methyl-4-cyano-piperidins

von J. Schmutz und F. Künzle.

(22. IV. 55.)

Kürzlich haben wir, ausgehend von Malonester, die Synthese des N-Methyl-piperidin-4,4-dicarbonsäure-diäthylesters¹⁾ beschrieben, welche durch stufenweisen Aufbau des Piperidinringes nach der Methode von *Kägi & Miescher*²⁾ gelang. Diese Methode liess sich nun auch auf den Cyanestiger übertragen.

Wir erhielten durch Umsetzen von N,N-Dimethyl-β-amino-äthyl-cyanessigsäure-äthylester (I)³⁾ und N-Benzyl-methyl-β-amino-äthyl-cyanessigsäure-äthylester (II) mit Äthylenbromid die entsprechenden quaternären Bromide III und IV. Die Ausbeuten waren allerdings bedeutend geringer als bei der Synthese des N-Methyl-piperidin-4,4-dicarbonsäure-esters¹⁾.

Durch saure Verseifung des 1,1-Dimethyl-piperidinium-4-cyano-4-carbonsäure-äthylester-bromides (III) in der Kälte erhielten wir die entsprechende Säure V. Die Pyrolyse dieses quaternären Bromides V ergab in guter Ausbeute unter gleichzeitiger Decarboxylierung und Methylbromid-Abspaltung das gesuchte 1-Methyl-4-cyano-piperidin (X). Unser Produkt erwies sich als identisch mit dem kürzlich von *Grob & Renk*⁴⁾ synthetisierten 1-Methyl-4-cyano-piperidin. Diese Autoren erhielten das Nitril X über das N-Methyl-isonipecotinsäureamid durch Wasserabspaltung mittels Thionylchlorid.

Für einen Konstitutionsbeweis, auf den wir später zurückkommen werden, benötigten wir den 1-Methyl-4-benzyl-piperidin-4-carbonsäure-äthylester (VIII). Das 1-Methyl-4-cyano-piperidin (X)

¹⁾ J. Schmutz, F. Künzle & R. Hirt, Helv. **37**, 1762 (1954).

²⁾ H. Kägi & K. Miescher, Helv. **32**, 2489 (1949).

³⁾ W. Huber, R. O. Clinton, W. Boehme & M. Jackmann, J. Amer. chem. Soc. **67**, 1618 (1945).

⁴⁾ C. A. Grob & E. Renk, Helv. **37**, 1672 (1954).