

recrystallized from EtOH. If a solid did not deposit, the reaction mixture was extracted with benzene and, after removal of benzene, the residue was recrystallized from EtOH to give 2-methyl-6-alkylsulfonyl-3-pyridazinol (III) or 2-ethyl-6-alkylsulfonyl-3-pyridazinol (IV).

Methylation of (II) with Diazomethane.—To an ethereal solution of CH_2N_2 powdered (II) was added and after evolution of nitrogen had subsided, the reaction mixture was placed in a refrigerator for 24 hrs. The solid that deposited was collected and recrystallized from EtOH to give corresponding 2-methyl-6-alkylsulfonyl-3-pyridazinol (III).

Reaction of (II) with Ethyl Chloroacetate—To a solution of (II) dissolved in 15 cc. of aq. solution of 1.1 equiv. K_2CO_3 , ethyl chloroacetate (1.1 equiv.) was added dropwise with stirring. The mixture was warmed at $60\sim 70^\circ$ for 30 mins. and extracted with benzene. After removal of benzene, the residue was recrystallized from EtOH to give ethyl 6-oxo-3-alkylsulfonyl-1,6-dihydro-1-pyridazine acetate (V).

UDC 547.92:582.272|.273

Kyosuke Tsuda, Saburo Akagi, Yukichi Kishida, Ryoichi Hayatsu und Kiyoshi Sakai:
Untersuchungen über Steroide. IX. Die Sterine aus Meeres-algen.

(*Institut für angewandte Mikrobiologie,* Universität Tokio, und Takamine
Forschungslaboratorium der Sankio-A.G.***)

In den vorherigen Mitteilungen^{1~4)} dieser Reihe haben wir Isolierung, Charakterisierung und Strukturbeweis der Sterine aus Meeres-algen beschrieben. Diese Untersuchungen können im folgenden kurz zusammengefasst werden: (1) Aus verschiedenen Gattungen der Braunalgen wurde meistens nur das Fucosterin isoliert. Eine Algen-art in der *Sargassum*-Gattung aber, gab ein neues Sterin, das Sargasterin, dessen Struktur durch Abbaureaktionen¹⁾ und synthetischen Versuche²⁾ eindeutig aufgeklärt und als das 20-Isofucosterin formuliert wurde. (2) Die geprüften Rotalgen, die auch zur verschiedenen Gattungen gehörten, gaben ausnahmslos das Cholesterin. Aus einigen Arten konnte neben Cholesterin das Chalinasterin isoliert werden.^{3,4)}

Es erscheint uns von Interesse, diese Untersuchungen weiter durchzuführen und so einerseits das allgemeine Vorkommen des Cholesterins in anderen Rotalgen nachzuweisen und andererseits das Sargasterin aus anderen Braunalgen zu gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über Untersuchungen, die wir zu diesem Zweck durchzuführen. Zur Reinigung des rohen Sterins verwendeten wir die Methode von Idler,²⁾ um das Begleitsterin möglichst zu erfassen. Die rohen Sterine aus Rotalgen von Nr. 1~9 (Tabelle I) wurden nämlich in *p*-Phenylazobenzoate übergeführt. Bei der Chromatographie dieses *p*-phenylazobenzoates erhielten wir orangefarbene Kristalle vom Schmp. 189° . Sie waren identisch mit Cholesteryl-*p*-phenylazobenzoat⁶⁾ und ihre Verseifungsprodukte erwiesen sich nach Vergleich des IR-Spektrum und Acylderivates mit dem authentischen Präparat, reines Cholesterin, ebenfalls identisch. Bei der Reinigung der Sterine aus Braunalgen von Nr. 1~3 (Tabelle II) nach dieser Methode wurde das Fucosterin gewonnen. Man konnte daher in diesen Meeres-algen nicht das Begleitsterin auffinden.

* Hongo, Bunkio-ku, Tokio (津田恭介).

** Nishishinagawa, Shinagawa-ku, Tokio (赤木三郎、岸田有吉、早津了一、酒井 浄)

1) K. Tsuda, R. Hayatsu, Y. Kishida, S. Akagi: J. Am. Chem. Soc., **80**, 921 (1958).

2) R. Hayatsu: Dienes Bulletin, **5**, 452 (1957).

3) K. Tsuda, S. Akagi, Y. Kishida: Science, **126**, 927 (1957).

4) K. Tsuda, S. Akagi, Y. Kishida: Dienes Bulletin, **6**, 101 (1958).

5) D. R. Idler, S. W. Nicksie, D. R. Johnson, V. W. Meloche, H. A. Schuette, C. A. Baumann: J. Am. Chem. Soc., **75**, 1712 (1953).

6) K. Labenburg, F. Fernholz, E. S. Wallis: J. Org. Chem., **3**, 294 (1938).

Wenn das rohe Sterin ein Gemisch von Fucosterin und Sargasterin darstellt, so kann man auch nach folgender Methode jedes Sterin eindeutig nachweisen: Behandelt man das rohe Sterin mit Ac_2O und dann mit O_3 , so kann man ein Gemisch von 24-Ketocholesterylacetat und 20-Ketoisocholesterylacetat erhalten. Nach unseren früheren Erfahrungen kann dieses Gemisch durch Chromatographie leicht getrennt werden. Die rohe Sterine aus Braunalgen von Nr. 4, Nr. 5 bzw. Nr. 7 (Tabelle II), deren Untersuchungen in vorheriger Mitteilung¹⁾ gezeigt sind, wurden nach dieser Methode geprüft. Dabei wurde folgendes Resultat erhalten: (1) Aus Alge Nr. 7 ergibt sich nur das Fucosterin. (2) Das rohe Sterin aus Alge Nr. 5 besteht aus Fucosterin und Sargasterin im Verhältnis von 100 zu 35. (3) Das rohe Sterin aus Alge Nr. 4 besteht aus Sargasterin und Fucosterin im Verhältnis von 100 zu 19.

In Tabelle I und II sind die von uns bisher erhaltene Resultate zusammengestellt. Wie in Tabelle I gezeigt wird, kann das Cholesterin aus allen geprüften Rotalgen gewonnen werden. Es ist bemerkenswert, dass das typische tierische Sterin, cholesterin auch sehr weit in Rotalgen verbreitet ist. In Tabelle 2 wird das Vorkommen des Fucosterin bzw. Sargasterins in verschiedenen Braunalgen zusammengestellt. Beide Sterine sind bisher nur in Braunalgen gefunden worden und es ist nun interessant, Fucosterin als das verbreiteteste Sterin in diesem Reich darzustellen.

TABELLE I. Vorkommen von Sterinen in Rotalgen (Rhodophyta)

Algen		Sterine
Nr.	Name	
1	<i>Chondrus giganteus</i> OKAMURA	Cholesterin
2	<i>Grateloupia elliptica</i> HOLMS	Cholesterin
3	<i>Coeloseira pacifica</i> DAWSON	Cholesterin
4	<i>Tichocarpus crinitus</i> RUPRECHT	Cholesterin
5	<i>Rhodomela Larix</i> (TURNER) C. AGARDH	Cholesterin
6	<i>Iridophycus cornucopiae</i> SETCHELL et GARDNER	Cholesterin
7	<i>Gloidopeltis furcata</i> POSTELS et RUPRECHT	Cholesterin
8	<i>Chondrus ocellatus</i> HOLMES	Cholesterin
9	<i>Cyrtymenia sparsa</i> OKAMURA	Cholesterin
10*	<i>Rhodoglossum pulcherum</i> (KÜTZING) SET. et GARD.	Cholesterin
11*	<i>Gelidium subcostatum</i> OKAMURA	Cholesterin
12*	<i>Gelidium amansii</i> LAMOUREUX	Cholesterin, Chalinasterin**
13*	<i>Pterocladia tenuis</i> OKAMURA	Cholesterin, Chalinasterin**
14*	<i>Gelidium japonicum</i> OKAMURA	Cholesterin
15*	<i>Acanthopeltis japonica</i> OKAMURA	Cholesterin, Chalinasterin

* Dessen Untersuchung ist in vorherigen Mitteilungen beschrieben.^{3,4)}

** Dessen Existenz ist nach IR-Spektrum vermutet.^{3,4)}

TABELLE II. Vorkommen von Sterinen in Braunalgen (Phaeophyta)

Algen		Sterine
Nr.	Name	
1	<i>Alaria crassifolia</i> KIELLMANN	Fucosterin
2	<i>Myelophycus caespitosus</i> (HARVEY) KIELLMANN	Fucosterin
3	<i>Sargassum thumbergii</i> (MERTENS) O. KUNTZE	Fucosterin
4*	<i>Sargassum ringgoldianum</i> HARVEY	Sargasterin, Fucosterin**
5*	<i>Eisenia bicyclis</i> (KIELLMAN) SET. et GARD.	Fucosterin, Sargasterin**
6*	<i>Cystophyllum hakodatense</i> YENDO	Fucosterin
7*	<i>Fucus evanescens</i> J. AGARDH	Fucosterin
8*	<i>Pelvetia wrightii</i> (HARVEY) YENDO	Fucosterin
9*	<i>Costaria costata</i> (TURNER) SAUNDERS	Fucosterin

* Dessen Untersuchung ist in vorheriger Mitteilung beschrieben.¹⁾

** Es ist als Begleitsterin diesmal erfasst worden.

Prof. Dr. Y. Yamada der Universität Hokkaido und Dr. S. Sudo der Tokai-Versuchsstation für Fischerei hatten die Freundlichkeit die Meeres-algen zu begutachten; wir möchten ihnen dafür herzlich danken. Ferner danken wir auch Herren Prof. Dr. T. Uchida, Dr. Y. Nakamura und Dr. M. Yamada der Universität Hokkaido, Herrn K. Harada des Strandlaboratoriums Ibaragi, Herren R. Enoguchi und I. Ono des Strandlaboratoriums Chiba sowie den Angestellten des Strandlaboratoriums Ito für ihre freundliche Hilfe bei der Sammlung des Untersuchungsmaterials.

Experimenteller Teil

Extraktion der Sterine—Getrocknete Algen wurden als fein gemahlene Pulver mit Benzol in der Hitze extrahiert. Dieser ölige Eindampfrückstand gab nach Verseifung die unverseifbare Substanz, welche aus MeOH kristallisiert werden konnte. Ausbeute der Algen-Sterin bei allen Herstellungsstufen sind in Tabelle III gezeigt.

TABELLE III

Algens-Nr.*	Ausbeute (%**)		
	Benzol-extrakt	Unverseifbarer Anteil	Rohes Sterin***
Rotalgen			
1	0.52	14.9	14.8
2	0.48	16.2	12.2
3	0.52	15.4	9.35
4	0.93	11.6	13.5
5	1.35	21.1	14.0
6	0.94	14.3	33.8
7	0.35	18.8	28.6
8	0.41	22.6	19.9
9	0.51	20.5	23.0
Braunalgen			
1	1.33	9.72	28.5
2	2.29	9.35	31.1
3	1.01	18.4	37.1

* Siehe Tabellen I und II.

** Die Prozentzahlen der Ausbeute beziehen sich immer auf jeder Vorstufe.

*** Die aus Rotalgen stammende Sterine zeigen Schmp. 139~144°, die aus Braunalgen gekommenen Sterine zeigen aber etwas niedrigeres Schmelzpunkt, d.h. Schmp. 116~118°.

Aufarbeitung der Extrakte nach der Methode von Idler⁵⁾—Allgemeine Arbeitsvorschriften: 1 g rohes Sterin wurde mit 0.9 g *p*-Phenylazobenzoylchlorid in 15 cc Pyridin 2 Stdn. unter Rückfluss gekocht. Nach Zusatz von Wasser, wurde die sofort entstandene Fällung abgesaugt und getrocknet. Dieses *p*-Phenylazobenzoat wurde im folgenden chromatographisch gereinigt: Zur Chromatographie wurde eine SiO₂-Säule von 80 cm Länge und 7.6 cm Durchmesser benutzt; zum Nachwaschen dienten Petroläther-Benzol (4:1). Man setzte das Nachwaschen so lange fort, bis die orangefarbene Zone in die Mitte der Säule herunterkam. Aus der Zone wurde das *p*-Phenylazobenzoat mit Benzol ausgezogen und aus Benzol-EtOH kristallisiert.

Die aus Rotalgen stammende Sterin-*p*-phenylazobenzoate stellten immer orangefarbene Nadeln vom Schmp. 188~189° dar und wurden mit Cholesteryl-*p*-phenylazobenzoat⁶⁾ identifiziert. C₄₀H₅₄O₂N₂-Ber.: C, 80.76; H, 9.15; N, 4.71. Gef.: C, 80.72; H, 9.08; N, 4.98.

Andererseits stellten die aus Braunalgen stammende Sterin-*p*-phenylazobenzoate die orangefarbenen Platten vom Schmp. 168~169° dar. C₄₂H₅₆O₂N₂-Ber.: C, 81.24; H, 9.09; N, 4.51. Gef.: C, 81.18; H, 9.04; N, 4.82. Dieses erwies sich nach Schmp. und Mischprobe als identisch mit Fucosteryl-*p*-phenylazobenzoat.

Beide Verbindungen wurden nach von Idler gezeigten Bedingungen⁵⁾ verseift und die erhaltene Sterine aus MeOH umkristallisiert, wobei Cholesterin sowie Fucosterin in reiner Form erhalten wurden. Cholesterin, Schmp. 147~148°, [α]_D -40.6°(CHCl₃); Acetat, Schmp. 115~114°, [α]_D -42°(CHCl₃); Benzoat, Schmp. 144~145°, [α]_D -14.0°(CHCl₃). Fucosterin, Schmp. 123~124°, [α]_D -38.5°(CHCl₃); Acetat, Schmp. 120~122°, [α]_D -42.1°(CHCl₃). Benzoat, Schmp. 118~119°, [α]_D -18.5°(CHCl₃).

Nachweis des Fucosterins bzw. Sargasterins in einem Gemisch—Das aus Braunalgen von Nr. 4, 5 bzw. 7 gewonnene rohe Sterin wurde acetyliert und dann das Acetat mit 1 Mol O₃ ozonisiert. Beim Sterin aus *Eisenia*-Gattung (Tabelle II, Nr. 5) wurde folgendes Resultat erhalten; 3 g Sterin-acetat vom

Schmp. 117~121° wurden bei 15° mit 1 Mol O₃ ozonisiert. Dieses Ozonisierungsprodukt wurde an 100 g Al₂O₃ chromatographiert. Zum nachwaschen jeder Fraktion dienten je 40 ccm Lösungsmittel.

TABELLE IV

Fraktions-Nr.	Lösungsmittel	Eluat (mg)	Schmp. (°C)
1	Petroläther-Benzol (1:1)	40~50	70~80*
2~4	Petroläther-Benzol (1:1)	43	135~138*
6~9	Petroläther-Benzol (1:3)	700	127~129**
13~15	Petroläther-Benzol (1:5)	260	115~117***

* Dessen Struktur ist noch nicht bekannt.

** 24-Ketocholesterylacetat^{1, 2)}

*** 24-Keto-20-isocholesterylacetat^{1, 2)}

Verlauf der Chromatographie wurde in Tabelle IV gezeigt. Dadurch war es bewiesen, dass diese *Eisenia*-Art als Hauptsterin das Fucosterin und als Begleitsterin das Sargasterin enthält.

10 g Sterin-acetat, das aus *Fucus*-Art von Nr. 7 gewonnen wurde, wurden ozonisiert und nach der Aufarbeitung konnten 6.8 g 24-Ketocholesterylacetat^{1, 2)} vom Schmp. 129~131° erhalten werden. Daraus kann man schliessen, dass dieser Alge ausser dem Fucosterin kein anderes Sterin enthält.

Aus *Sargassum ringgoldianum* HARVEY wurde von uns früher nur das Sargasterin nachgewiesen.¹⁾ Durch exakten Aufarbeitung nach dieser Methode aber, konnte das Fucosterin als Begleitsterin nachgewiesen werden. Aus 3 g Sterin-acetat wurden also 1 g 24-Keto-20-isocholesterylacetat^{1, 2)} und 190 mg 24-Ketocholesterylacetat^{1, 2)} erhalten.

(Eingegangen am 8. September, 1958)