

KURT SCHUBERT und KARL-HEINZ BÖHME

Zur Unterscheidung von zwei Reaktionstypen bei der Adduktbildung zwischen Ergosterin und Maleinsäureanhydrid

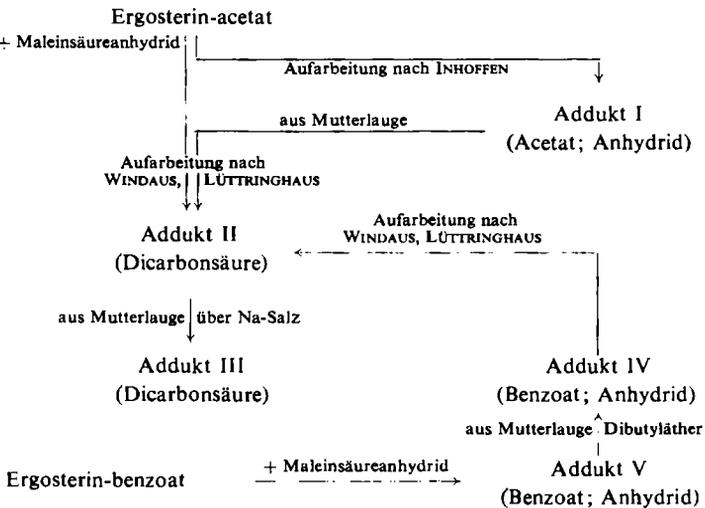
Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

(Eingegangen am 2. April 1960)

Bei der Umsetzung von Ergosterin-benzoat mit Maleinsäureanhydrid wurden drei neue Addukte erhalten. Es lassen sich zwei Reaktionstypen unterscheiden. Für die substituierende Addition werden Fragen zur Struktur der erhaltenen Addukte diskutiert.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Wachstumsbeeinflussung von Bakterien durch Sterine und deren Derivate zeigten die Maleinsäureaddukte der Ergosterinreihe bakteriostatische Eigenschaften¹⁾.

Die Bildung von zwei Addukten des Ergosterins wurde von WINDAUS und seiner Schule im Verlaufe der grundlegenden Arbeiten über das Ergosterin und seine Bestrahlungsprodukte beschrieben^{2,3)}. Es gelang uns, drei weitere Addukte aus dem Umsetzungsprodukt von Ergosterin-acetat bzw. -benzoat mit Maleinsäureanhydrid zu isolieren. Das nachstehende Schema bietet die Isolierungswege sowie die Zusammenhänge, wie sie sich jetzt ergeben.



Isolierungsschema der Addukte, ausgehend von Ergosterin-acetat und -benzoat.
I und II bekannte Addukte, III, IV und V neue Addukte

¹⁾ K. SCHUBERT, J. GRUNER, CH. KÜHN und K.-H. BÖHME, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh., Abt. II.

²⁾ A. WINDAUS und A. LÜTTRINGHAUS, Ber. dtsch. chem. Ges. **64**, 850 [1931].

³⁾ H. H. INHOFFEN, Liebigs Ann. Chem. **508**, 81 [1933].

Von den bekannten Tatsachen ausgehend, sollte man die Addukte I und II als Produkte einer Diensynthese zwischen Ergosterin und Maleinsäureanhydrid ansehen. Mit der Isolierung weiterer Addukte ergab sich die Frage, wie sich das Auftreten von nun fünf Addukten erklären läßt und wodurch sich die einzelnen Substanzen unterscheiden. Wir kamen dabei zu einigen überraschenden Feststellungen, die sich aus den nachfolgenden Ergebnissen ableiten lassen.

Vergleich der Addukte

| Addukt | Ausb. in % d. Th. *) | Farbreaktion nach LIEBERMANN | Titration mit KOH in CH ₃ OH | Titration mit Benzo- persäure | $[M]_D^{25} - [M]_D^{25}$ = Δ^{**}) | thermische Spal- tung |
|------------|-------------------------|------------------------------------|---|-------------------------------------|--|-----------------------------|
| Addukt I | 19 | farblos | 1 Äquiv. | 1 Atom O | -94 | + |
| Addukt II | 10 | blauviolett | 2 Äquiv. | 3 Atome O | +631 | - |
| Addukt III | 4 | blauviolett | 2 Äquiv. | 3 Atome O | +393 | - |
| Addukt IV | 6 | hellgelb | 1 Äquiv. | 1 Atom O | -96 | + |
| Addukt V | 4 | blauviolett | 2 Äquiv. | 3 Atome O | +86 | - |

*) = Die Angaben beziehen sich auf die nach Umkristallisation erhaltenen reinen Substanzen.

** Δ = Molekulare Rotationsdifferenz.

$[M]_D^{25}$ = Molekulare Rotation von Ergosterin.

$[M]_D^{25}$ = Molekulare Rotation der Adduktsäuren.

Bei der Titration mit $n/10$ KOH in Methanol verbrauchen die Addukte II, III und V, wie zu erwarten, 2 Äquivalente, I und IV dagegen auffallenderweise nur eines. Auch INHOFFEN konnte bei der Titration von I in Methanol die Aufnahme von nur einem Äquivalent Alkali beobachten, während in Pyridin 2 Äquivalente aufgenommen wurden³⁾.

Die Sauerstoffaufnahme bei der Benzopersäure-Titration ergab in beiden Gruppen gleichartige Unterschiede.

Gruppe A (I, IV): 1 Atom Sauerstoff

Gruppe B (II, III, V): 3 Atome Sauerstoff

Bei der Auswahl geeigneter Farbreaktionen für analytische Zwecke zeigte sich wiederum — so bei der Reaktion nach LIEBERMANN/BURCHARDT — das gleiche Gruppenverhalten. Mit dem Phenol/Molybdän/Perchlorsäure-Reagenz, das sich nach R. F. WITTER und S. STONE⁴⁾ zum papierchromatographischen Nachweis von Δ^5 - 3β -Hydroxy-steroiden eignet und mit einer Rosafärbung anspricht, geben nur die Addukte II und III eine Farbreaktion. Es handelt sich hierbei um eine schwache Blau-Grün-Färbung.

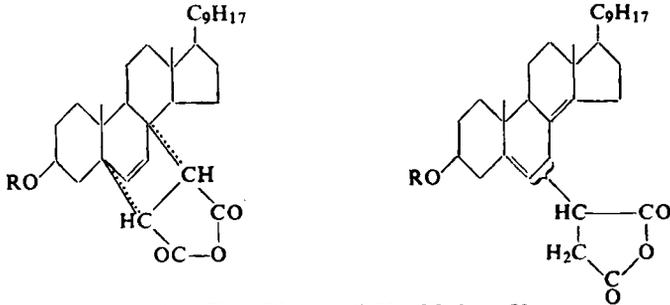
Die molaren Rotationsdifferenzen der beiden Gruppen haben entgegengesetzte Vorzeichen.

Unter variierten Bedingungen der thermischen Spaltung^{2,3,5)} gelang es nur bei I und IV, Ergosterin-acetat und Maleinsäureanhydrid zu fassen.

Das dargelegte Gruppenverhalten führte uns zur Unterscheidung zweier Reaktionstypen. Wir dürfen annehmen, daß es sich bei I und IV um die beiden stereoisomeren 5.8-Addukte handelt. Bei II und III haben wir es möglicherweise mit den

⁴⁾ Analytic. Chem. 29, 156 [1957].

Epimeren einer substituierenden Addition in 7-Stellung zu tun. Daneben ist aber auch eine Substitution in 6-Stellung in Betracht zu ziehen.



R = CH₃·CO bzw. C₆H₅·CO bzw. H

Formeltypus der Addukte I und IV

Formeltypus der Addukte II und III

Das Verhältnis von 1 : 3 bei der Sauerstoffaufnahme in den beiden Gruppen erklärt sich dadurch, daß die bei I und IV sterisch gehinderte Δ^6 -Doppelbindung durch Benzopersäure nicht angreifbar ist. Bekanntlich wird auch bei der katalytischen Hydrierung nur die Doppelbindung der Seitenkette gesättigt, ein Verfahren, das zur Darstellung von 22.23-Dihydro-ergosterin benutzt wird⁵⁾. Im Gegensatz hierzu sind die drei Doppelbindungen in den Produkten substituierender Addition (II, III und V) als frei zugänglich anzusehen.

Zur Struktur der Addukte II und III können im einzelnen folgende Aussagen gemacht werden. Die Ringdoppelbindungen befinden sich nicht mehr in Konjugation. Dies geht aus der bis 220 μ fehlenden UV-Absorption hervor. Durch OPPENAUER-Oxydation werden α,β -ungesättigte Ketone mit einem Absorptionsmaximum bei 235 μ erhalten, woraus sich die Anwesenheit einer Δ^5 -Doppelbindung ergibt. Bemerkenswerterweise wird zwar bereits in Aceton/Benzol die CHOH-Gruppe dehydriert, doch erfolgt die Verschiebung der Doppelbindung nach Δ^4 erst in Cyclohexanon/Toluol.

Mit Palladium können die drei Doppelbindungen stufenweise hydriert werden. Nach dem Ergebnis der IR-Aufnahme wird in Essigester nur die Seitenketten-Doppelbindung hydriert. Ein weiteres Mol. Wasserstoff wird in Eisessig zur Hydrierung der Δ^5 -Doppelbindung aufgenommen. Die dritte Doppelbindung wird in Δ^8 angenommen, da sie erst unter isomerisierenden Bedingungen nach Zusatz von HCl hydriert wird. HCl bewirkt bekanntlich eine Verschiebung von Δ^8 ⁽¹⁴⁾ nach Δ^{14} (vgl. l. c.⁶⁾).

Aus den IR-Spektren der einzelnen Hydrierungsstufen ist nur die Hydrierung der Seitenketten-Doppelbindung in der ersten Stufe eindeutig erkennbar. In den beiden folgenden Stufen ist eine Zuordnung von Doppelbindungsbanden nicht zu treffen.

Wie zu erwarten, prägt sich die tetrasubstituierte Δ^8 -Doppelbindung im Spektrum nicht aus. Auffällig ist aber das Fehlen einer Bande für die in Betracht gezogene tri-

⁵⁾ A. WINDAUS und R. LANGER, Liebigs Ann. Chem. 508, 105 [1933].

⁶⁾ H. WIELAND, E. DIETZ und H. OTTAWA, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 244, 194 [1936].

substituierte Doppelbindung in Δ^5 . Möglicherweise ist dies auf den Einfluß der ungewöhnlichen Bernsteinsäure-Gruppe zurückzuführen. Die Verschiebung der Δ^7 -Doppelbindung nach Δ^8 dürfte wie bei anderen indirekten substituierenden Additionen an Allyl-Systemen im Zusammenhang mit der Substitution erfolgen.

Das Sonderverhalten von Addukt V kommt in folgendem zum Ausdruck. Es ist zwar ebenfalls eine Doppelbindung in Δ^5 vorhanden, doch hat das nach OPPENAUER-Oxydation erhaltene α,β -ungesättigte Keton ein Absorptionsmaximum bei 241 μ . Bei der Pd-Hydrierung in Essigester wurden 2 Moll. Wasserstoff aufgenommen.

Wir danken Herrn WEHRBERGER für die Auswertung der IR-Spektren und Herrn ROSE für die Ausführung der katalytischen Hydrierungen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Bildung und Isolierung der Addukte: In einem 1-l-Glasautoklav wurden 22 g *Ergosterinbenzoat* vom Schmp. 167–170° und $[\alpha]_D^{20}$: –70.8° (Chlf., $c = 1.00$) mit 8.25 g *Maleinsäureanhydrid* in 55 ccm Xylol 8 Stdn. auf 135° erhitzt und in bekannter Weise aufgearbeitet³).

Addukt V: Die Kristallisation des Rohadduktes aus Äther ergab 2.2 g eines Rohkristallisates vom Schmp. 215–222°. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Benzol wurde *Addukt V* in Nadeln erhalten. Ausb. 1.13 g (4.3% d. Th.).

Addukt V (Benzoat; Anhydrid): Schmp. 229–231°; $[\alpha]_D^{20}$: –90° (Chlf., $c = 0.99$).

$C_{39}H_{50}O_5$ (598.8) Ber. C 78.23 H 8.41 Gef. C 78.42 H 7.85

Addukt V (Dicarbonsäure): 400 mg *Addukt V (Benzoat; Anhydrid)* wurden durch 1 stdg. Kochen mit 20 ccm 10-proz. methanol. Kalilauge verseift. Nach dem Verdünnen mit Wasser und Ansäuern mit verdünnter Essigsäure wurde die Säure ausgeäthert. Aus Äther farblose Nadeln vom Schmp. 221–223°; $[\alpha]_D^{20}$: –71.3° (Aceton, $c = 1.05$). Ausb. 295 mg (86.2% d. Th.).

$C_{32}H_{48}O_5$ (512.7) Ber. C 74.96 H 9.43 Gef. C 73.72 H 9.42

Addukt V (Acetat; Anhydrid): 500 mg *Addukt V (Dicarbonsäure)* wurden mit 2.5 ccm *Acetanhydrid* 1 Stde. auf dem Wasserbad erwärmt. Das nach dem Erkalten kristallisierte Rohprodukt wurde noch zweimal aus Eisessig umkristallisiert. Ausb. 293 mg (56% d. Th.). Schmp. 192–198°; $[\alpha]_D^{20}$: –133.5° (Chlf., $c = 1.04$).

$C_{34}H_{48}O_5$ (536.7) Ber. C 76.08 H 9.01 Gef. C 76.64 H 9.10

Addukt IV: Die Mutterlauge von *Addukt V* wurde i. Vak. zur Trockne gebracht. Aus Dibutyläther kristallisierte beim Abkühlen auf ca. –20° *Addukt IV* in Rosetten. Ausb. 1.55 g (5.9% d. Th.).

Addukt IV (Benzoat; Anhydrid): Schmp. 194–196°; $[\alpha]_D^{20}$: –22.1° (Chlf., $c = 1.00$).

$C_{39}H_{50}O_5$ (598.8) Ber. C 78.23 H 8.41 Gef. C 78.85 H 8.14

Addukt IV (Dicarbonsäure): Die Verseifung des *Adduktes IV (Benzoat; Anhydrid)* erfolgte, wie oben angegeben. Infolge der leichten Löslichkeit in den üblichen organischen Lösungsmitteln gelang es nicht, die amorphe Säure umzukristallisieren. $[\alpha]_D^{20}$: –35.9° (Aceton, $c = 1.23$).

$C_{32}H_{48}O_5$ (512.7) Ber. C 74.96 H 9.43 Gef. C 74.86 H 9.83

Addukt IV (Acetat; Anhydrid): Es wurde wie bei V verfahren. Aus 1.5 g *Addukt IV (Dicarbonsäure)* wurden 890 mg (56.6% d. Th.) erhalten; farblose Nadeln aus Ligroin vom Schmp. 178–182°; $[\alpha]_D^{20}$: –51.3° (Chlf., $c = 1.04$).

$C_{34}H_{48}O_5$ (536.7) Ber. C 76.08 H 9.01 Gef. C 76.64 H 9.10

Addukt III: Ausgehend von einem Ansatz mit 14 g *Ergosterin-acetat* vom Schmp. 168–170° und $[\alpha]_D^{20}$: –89.4° (Chlf., $c = 1.10$) hinterblieb nach Abtrennung der Addukte I und II ein harziger Rückstand von 9.55 g. Dieser wurde in wenig Methanol gelöst und mit methanol. Natronlauge neutralisiert. Nach Abdestillieren des Methanols wurde der Rückstand in Wasser gelöst und auf ein Volumen von 150 ccm gebracht. Zu dieser Lösung gab man 450 ccm Aceton, wonach bei +5° das Addukt III (Natriumsalz der Dicarbonsäure) kristallisierte. 5.87 g des Salzes wurden in Wasser gelöst, sodann wurde mit verd. Salzsäure die freie Dicarbonsäure ausgefällt, abgesaugt, getrocknet und viermal aus Essigester/Ligroin (1:1) sowie zweimal aus Benzol umkristallisiert. Ausb. 880 mg (9.2% d. Th., bez. auf harzigen Rückstand, bzw. 4% d. Th., bez. auf eingesetztes Ergosterin-acetat).

Addukt III (Dicarbonsäure): Schmp. 187–189°; $[\alpha]_D^{20}$: –131.3° (Aceton, $c = 1.07$).

$C_{32}H_{48}O_5$ (512.7) Ber. C 74.96 H 9.43 Gef. C 74.47 H 9.41

Addukt III (Acetat; Anhydrid): 1.4 g *Addukt III (Dicarbonsäure)* wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei V behandelt. Nach Kristallisation aus Eisessig sowie aus Ligroin wurden 663 mg (45.4% d. Th.) in Nadeln vom Schmp. 175–178° erhalten. $[\alpha]_D^{20}$: –190.9° (Chlf., $c = 1.08$).

$C_{34}H_{48}O_5$ (536.7) Ber. C 76.08 H 9.01 Gef. C 75.76 H 8.88

Addukt III (Benzoat; Anhydrid): 100 mg *Addukt III (Dicarbonsäure)* wurden mit 0.15 ccm *Benzoylchlorid* in 1 ccm Pyridin benzoiliert und nachfolgend mit Acetanhydrid in die „Anhydrid-Form“ übergeführt. Nach Umkristallisation aus Äther und anschließend aus Ligroin wurden 36 mg (30.8% d. Th.) farblose Nadeln vom Schmp. 199–206° erhalten. $[\alpha]_D^{20}$: –119.0° (Chlf., $c = 0.85$).

$C_{39}H_{50}O_5$ (598.8) Ber. C 78.23 H 8.41 Gef. C 78.36 H 8.31

Addukt I (Benzoat; Anhydrid): 100 mg des bekannten *Adduktes I (Dicarbonsäure)* vom Schmp. 198–199° und $[\alpha]_D^{20}$: –36.3° (Aceton, $c = 1.00$) wurden benzoiliert und mit Acetanhydrid behandelt. Es wurde einmal aus Äther und zweimal aus Dibutyläther umkristallisiert. Ausb. 38.3 mg (32.8% d. Th.); farblose Nadeln vom Schmp. 207–210°; $[\alpha]_D^{20}$: –13° (Chlf., $c = 1.12$).

$C_{39}H_{50}O_5$ (598.8) Ber. C 78.23 H 8.41 Gef. C 78.04 H 8.60

Addukt II (Benzoat; Anhydrid): 100 mg des bekannten *Adduktes II (Dicarbonsäure)* vom Schmp. 204–208° und $[\alpha]_D^{20}$: –177.7° (Aceton, $c = 1.00$) wurden in der gleichen Weise wie I behandelt. Aus Ligroin wurden 39.6 mg (33.4% d. Th.) farblose Nadeln vom Schmp. 168–172° erhalten. $[\alpha]_D^{20}$: –112° (Chlf., $c = 1.04$).

$C_{39}H_{50}O_5$ (598.8) Ber. C 78.23 H 8.41 Gef. C 78.35 H 8.40

Oppenauer-Oxydation der Addukte II, III und V

a) 50 mg Addukt (als Hydroxy-dimethylester) in 0.6 ccm Aceton wurden mit einer Lösung von 50 mg *Aluminiumisopropylat* in 1.5 ccm Benzol 10 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Dann wurde mit verd. Schwefelsäure ausgeschüttelt, die Benzolschicht mit Wasser gewaschen und eingedampft. Der Rückstand wurde zur Abtrennung und Bestimmung des ketonischen Anteils in Eisessig mit GIRARD-Reagenz T 3 Min. auf dem Wasserbad umgesetzt und nach ZYGMUNTOWICZ aufgearbeitet⁷⁾.

Aus Addukt II: Ausb. 62% Keton; kein UV-Absorptionsmaximum.

Aus Addukt III: Ausb. 60% Keton; kein UV-Absorptionsmaximum.

b) 10 mg des Dimethylesters, in 0.1 ccm Cyclohexanon gelöst, wurden mit einer Lösung von 10 mg *Aluminiumisopropylat* in 0.5 ccm Toluol 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Wasser-

⁷⁾ A. S. ZYGMUNTOWICZ, N. WOOD, E. CHRISTO und N. B. TALBOT, J. clin. Endocrinol. 11, 580 [1951].

dampfdestillation wurde das Reaktionsprodukt in Äther aufgenommen, mit verd. Schwefelsäure und Wasser gewaschen, zur Trockne gebracht und der GIRARD-Trennung unterworfen.

Aus Addukt II: Ausb. 57% Keton; UV-Spektrum (in 96-proz. Äthanol): λ_{\max} 234 μ ($\epsilon = 12640$).

Aus Addukt III: Ausb. 62% Keton; UV-Spektrum (in 96-proz. Äthanol): λ_{\max} 233 μ ($\epsilon = 14960$).

Aus Addukt V: Ausb. 65% Keton; UV-Spektrum (in 96-proz. Äthanol): λ_{\max} 241 μ ($\epsilon = 14000$).

Katalyt. Hydrierung von Addukt II

1. 1 g Addukt II (Acetat; Anhydrid) wurde in Essigester gelöst und mit 200 mg Palladiummohr hydriert. Innerhalb von $3\frac{1}{2}$ Stdn. wurde die für eine Doppelbindung berechnete Wasserstoff-Menge (41.8 ccm) aufgenommen. Der nach Abdestillieren des Essigesters erhaltene Rückstand wurde einmal aus Ligroin umkristallisiert. Ausb. 926 mg (92.6% d. Th.); Schmp. 204–205°. $[\alpha]_D$: -118.1° (Chlf., $c = 0.73$).

IR-Hauptbanden

Ausgangsprodukt in CCl_4 : 1870, 1794/cm (cycl. Säureanhydrid).

Ausgangsprodukt in CS_2 : 1742, 1032/cm (3β -Acetat); 1240/cm (3β -Acetat; cycl. Säureanhydrid); 972/cm (*trans* Δ^{22}).

Hydrierungsprodukt in CS_2 : 972/cm (Bande ist nur noch sehr schwach ausgeprägt).

2. 815 mg des vorstehenden Dihydroproduktes von Addukt II, in Eisessig gelöst, nahmen mit 200 mg Palladiummohr in 5 Stdn. die für eine Doppelbindung berechnete Wasserstoff-Menge (34.0 ccm) auf. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Ligroin wurden 373 mg (45.6% d. Th.) in farblosen Säulen erhalten. Schmp. 200–201°. $[\alpha]_D$: -109° (Chlf., $c = 0.69$).

3. 290 mg des vorstehenden Tetrahydroproduktes von Addukt II wurden in Eisessig nach Zusatz von 0.1 ccm Salzsäure mit 150 mg Palladiummohr hydriert. Nach $7\frac{1}{2}$ Stdn. wurde die für eine Doppelbindung berechnete Menge Wasserstoff (12.1 ccm) aufgenommen. Schmp. 195–197°. $[\alpha]_D$: -101.05° (Chlf., $c = 0.67$).

Die Spektren der Hydrierungsprodukte nach 2. und 3. sind im Bereich von 600–900/cm gleichartig.

Adduktspaltung: Aus 200 mg Addukt I (Acetat; Anhydrid) wurden bei der thermischen Spaltung bei 240°/1 Torr nach 2 Stdn. 23 mg Maleinsäureanhydrid und 89 mg Ergosterin-acetat (54.6% d. Th.) gefunden.

150 mg Addukt IV (Acetat; Anhydrid) ergaben unter den gleichen Spaltungsbedingungen 10 mg Maleinsäureanhydrid und 56 mg Ergosterin-acetat (50.3% d. Th.). Die Addukte II, III und V (jeweils Acetat; Anhydrid) wurden unter den gleichen Bedingungen nicht gespalten. Auch bei 10 Torr sowie bei 0.01 Torr und 240° konnte eine Abspaltung von Maleinsäureanhydrid nicht erreicht werden.

Addukt V destillierte unter den letztgenannten Bedingungen unzersetzt über.