

Aus der Lehrkanzel für Lebensmittelchemie der Universität Wien

Aromatische Crackprodukte von Sterinen (III)

Von K. HOFFELNER, H. LIBERT und L. SCHMID*)

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 21. Januar 1964)

Während in den Mitteilungen I (1) und II (2) über die Hitzezersetzungsprodukte von Sterinen im wesentlichen von Crackprodukten des Cholesterins und in untergeordnetem Maße von solchen des Phytosterins die Rede war, sollen im folgenden Zersetzungsprodukte des Ergosterins beschrieben werden. Trotz der an sich umfangreichen Literatur über das Ergosterin ist über Produkte, welche ausschließlich durch Hitzeeinwirkung entstanden waren, zu Beginn dieser Arbeit nichts zu finden gewesen. Es war daher naheliegend, sich hinsichtlich der Abbaumethode an die in (1, 2) gesammelten Erfahrungen anzulehnen und das Ergosterin in analoger Weise zu behandeln.

Am rohen Reaktionsgemisch trennte man phenolische Reaktionsprodukte durch Ausschütteln mit Lauge von Kohlenwasserstoffen. Die Aufarbeitung der Kohlenwasserstoffe erfolgte auf zweierlei Art: Im 1. Fall (im experimentellen Teil unter Aufarbeitung A beschrieben) chromatographierte man ohne vorherige Destillation der Kohlenwasserstoffe.

Im 2. Fall (im experimentellen Teil unter Aufarbeitung B beschrieben) wurden diese im Vakuum fraktioniert und dann erst die einzelnen Fraktionen durch Kristallisation und Säulenchromatographie soweit gereinigt, daß man sie erfolgreich zur Zonenschmelze einsetzen konnte.

Als Arbeitsergebnis seien folgende Substanzen genannt, deren chemische Konstitution als gesichert, beziehungsweise als höchst wahrscheinlich gelten kann. Es sind dies:

1. 1,2-Cyclopentenophenanthren: identifiziert durch Schmelzpunkt, Mischprobe, Schmelzpunkt des Trinitrobenzolkomplexes und UV-Spektrum.

2. 3'-Methyl-1,2-cyclopentenophenanthren: soweit dies aus seinem Schmelzpunkt, Schmelzpunkt des Trinitrotoluolkomplexes UV-, IR-Spektrum und C,H-Werten geschlossen werden kann.

3. 1-Methyl-chrysen: dieser Befund stützt sich auf den Schmelzpunkt, Schmelzpunkt des 2,4,7-Trinitrofluorennonkomplexes, UV-, IR-Spektrum und auf C,H-Werte;

4. 1,2-Cyclopenteno-7-hydroxy-phenanthren: zufolge Laugenlöslichkeit, Phenoltest nach FEIGL und Schmelzpunkt des Methyläthers. Das Massenspektrum zeigt das berechnete Molekulargewicht von 234. Das UV-Spektrum läßt einen Phenanthrenkern erkennen.

5. Ein Phenanthrol, von dem zur Zeit nur gesagt werden kann, daß es alkylsubstituiert ist, wie aus dem UV- und IR-Spektrum hervorgeht. Es ist zufolge der Mischprobe verschieden von 1,2-Cyclopenteno 7-hydroxyphenanthren.

*) Herrn Prof. Dr. FRIEDRICH HECHT zum 60. Geburtstag gewidmet.

Beschreibung der Versuche

1. Hitzezersetzung

400 g Ergosterin vom Schmelzpunkt 157° – $161,5^{\circ}$ wurden in 5 Chargen von 30 bis 140 g in Glasgefäßen unter Stickstoff zersetzt. Man erhitzte binnen 45 Minuten auf 350° , hielt diese Temperatur 30 Minuten lang, steigerte dann rasch auf 410° und blieb bei dieser Temperatur der Schmelze 3 Stunden lang. Während des Erhitzens flüchtiggehende gasförmige und flüssige Produkte wurden – da nur schwach fluoreszierend – nicht untersucht.

Den Rückstand nach der Hitzezersetzung löste man in Benzin, filtrierte von insgesamt ca. 35 g Unlöslichem und schüttelte die Benzinlösung 5mal mit 10% iger Kalilauge zwecks Abtrennung der Phenole aus.

Rohausbeute an Kohlenwasserstoffen 133,6 g.

2. Phenole

Die Phenollösung wurde unter Benzin mit Salzsäure (1:3) unter Eiskühlung angesäuert, unter Stickstoff filtriert und zwischen 130° – 160° /0,001 Torr destilliert. Ausbeute: 1,2 g Kristalle (Schmelzintervall 45° – 140°) aus 100,8 g Ergosterin. Nach Kristallisieren aus Methanol-Wasser ergaben 100 Dünnschichtchromatogramme bei Ansätzen von je ca. 10 mg auf Silicagel G (Merk) mit Chloroform neben einem am Start gebliebenen harzigen Rückstand zwei Zonen: P1 (die untere, 648 mg) und P2 (die obere, 205 mg), welche mit Methanol eluiert wurden.

P1 gibt nach abwechselndem Sublimieren im Hochvakuum und Umkristallisieren aus Methanol-Wasser, Benzin und Cyclohexan schließlich 6,8 mg weiße nadelförmige Kristalle, die von 184° – $188,5^{\circ}$ schmelzen. Eine Eisessiglösung des Phenols gibt mit 5% iger wäßriger Na-kobaltnitritlösung Gelbfärbung, die in Chloroform geht (3).

UV-Spektrum in Methanol (siehe P1 in Abb. 1)

IR-Spektrum an Kaliumbromidpreßling (siehe P1 in Abb. 2)

Massenspektrum: (aufgenommen an einem Apparat CH4-Atlaswerke Bremen) ergibt ein Molgewicht von 234 (Abb. 3). Das Spektrum zeigt auch geringe Substanzmengen vom Molgewicht 248 an.

Acetylderivat: durch 30 Minuten langes Kochen mit Essigsäureanhydrid. Kristalle aus Benzin, die von $149,5^{\circ}$ – 153° schmelzen.

Methyläther: dargestellt mit Dimethylsulfat; schmilzt nach Vakuumsublimation und Kristallisation aus Äthanol bei 131° – $134,5^{\circ}$. Schmelzpunkt des 1,2-Cyclopenteno-7-methoxyphenanthrens: $134,5^{\circ}$ – 136° (4,5).

$C_{18}H_{16}O$: Ber. OCH_3 : 12,49%

Gef. OCH_3 : 11,99%

P2: Nach Destillation zwischen 215° – 240° /10 mm und 8maligem Umlösen aus Benzin 2,3 mg weiße Nadeln, die von 213° – 218° schmelzen. Mischschmelzpunkt von P1 und P2: 164° – 197° . P2 ist in Lauge löslich. Positiver Phenoltest (3).

UV-Spektrum in Methanol (siehe P2 in Abb. 1)

IR-Spektrum am Kaliumbromidpreßling (siehe P2 in Abb. 2).

3. Kohlenwasserstoffe

Aufarbeitung A

Die nach Abtrennung der Phenole vorliegende Benzinlösung der Kohlenwasserstoffe befreite man vom Lösungsmittel und verwendete 30,7 g zur Weiterarbeit.

Es wurden jeweils 10,2 g an Aluminiumoxyd (Merck, Akt. Stufe I, Höhe 75 cm, Durchmesser 4,5 cm) mit Benzin chromatographiert. Man entwickelte so lange bis Fluoreszenz am Säulenende zu beobachten war. Im Benzinfiltrat waren 12,7 g Öl gelöst, an der Säule hatten sich 3 Zonen gebildet. Sie wurden mit Benzol-Äthanol (4:1) eluiert. Es ergaben:

Zone 1: 6,1 g Öl, nicht weiter untersucht.

Zone 2: 2 g Kristalle, Schmelzintervall 60–170°; Methylchrysenfraktion.

Zone 3: 9,5 g Kristalle, Schmelzintervall: 20–80°; Methylcyclopentenophenanthrenfraktion.

Methylchrysenfraktion

2 g gaben nach Kristallisation aus Methanol, Sublimation zwischen 125–138°/0,05 Torr sowie 10maligem Kristallisieren aus Äthanol und Benzin 9,2 mg weiße Plättchen (als K1 bezeichnet), die von 250,5–254° schmolzen. Schmelzpunkt des 1-Methylchrysens: 253 bis 254° (6).

$C_{18}H_{14}$: Ber. C = 94,18 H = 5,82

Gef. C = 94,08 H = 5,80.

2,4,7-Trinitrofluorenonkomplex, Fp: 241,5–242° (orangefarbige Nadeln aus Benzol). Der entsprechende 1-Methylchrysenkomplex schmilzt bei 242–242,5° (6).

UV-Spektrum in Methanol (siehe K1 in Abb. 1)

IR-Spektrum eines Kaliumbromidpreßlings (siehe K1 in Abb. 2).

Methylcyclopentenophenanthrenfraktion

Man löste 9,5 g aus Methanol um; die Kristalle und die Mutterlauge wurden derart aufgearbeitet, daß jeweils die beim weiteren Umkristallisieren anfallenden Mutterlauge und die aus der ursprünglichen Mutterlauge beim Einengen ausfallenden Kristalle vereinigt und gemeinsam weiterverarbeitet wurden. Man kristallisierte wiederholt aus Methanol, bereitete einen Trinitrotoluolkomplex, regenerierte daraus den Kohlenwasserstoff durch Filtrieren der Benzollösung über Aluminiumoxyd und kristallisierte mehrfach aus Methanol.

Ausbeute: 30 mg weiße Plättchen (als K2 bezeichnet). Schmelzintervall: 124,2–127,3°.

Das 3'-Methyl-1,2-cyclopentenophenanthren schmilzt bei 125–126° (7). Schmelzpunkt des Trinitrotoluolkomplexes: 87,7°–90° (gelbgrüne Nadeln aus Äthanol).

UV-Spektrum in Methanol (siehe K2 in Abb. 1).

IR-Spektrum eines Kaliumbromidpreßlings (siehe K2 in Abb. 2).

Aufarbeitung B

102 g der von Phenolen und dem Benzin befreiten Kohlenwasserstoffe gaben unter 0,2 Torr 5 Fraktionen, und zwar bei:

130–165°: 17,9 g Öl

165–179°: 11,7 g Kristalle: Methylcyclopentenophenanthrenfraktion

179–190°: 9,0 g Kristalle; Cyclopentenophenanthrenfraktion

190–223°: 22,6 g Kristalle; Methylchrysenfraktion

230–308°: 8,4 g glasartig erstarrte Substanz.

Ein nicht destillierbarer Rückstand (32,8 g) hinterblieb.

Methylcyclopentenophenanthrenfraktionen

Nach 3maligem Kristallisieren aus Methanol brachte man 0,95 g (Schmelzintervall: 40–90°) zur Zonenschmelze (Rohrdurchmesser 0,27 cm, Füllhöhe 16 cm, Wanderungsgeschwindigkeit 8 cm/Stunde).

Nach 376 Schmelzvorgängen löste man die aus dem vordersten, 1 cm langen Abschnitt des Rohres erhaltenen 54 mg (Schmelzintervall: 110–116°) in Äthanol und trennt durch Einengen geringe Mengen einer Spitzenfraktion ab. Beim weiteren Einengen fielen 26 mg (Schmelzintervall: 119–126°) an, die mit Trinitrotoluol gelbgrüne Nadeln geben. Nach zweimaligem Umlösen aus Äthanol regenerierte man den Kohlenwasserstoff durch Filtrieren der Benzollösung des Komplexes über Aluminiumoxyd.

Ausbeute: 15 mg.

Schmelzintervall: 123–127°. Mischprobe mit K2: 123–127°.

Cyclopentenophenanthrenfraktion

Nach 5maligem Umkristallisieren aus Methanol chromatographierte man 1 g an Aluminiumoxid (Merck, Akt. Stufe I, Füllhöhe 80 cm, Durchmesser 2,1 cm) mit Benzin. Es bildeten sich 2 Zonen aus, von denen die untere (405 mg, Schmelzintervall: 100–125°) nach Eluieren mit Äthanol-Benzol (1:3) 2mal aus Äthanol umkristallisiert und zur Zonenschmelze (Durchmesser 0,2 cm, Füllhöhe 10 cm) eingesetzt wurde.

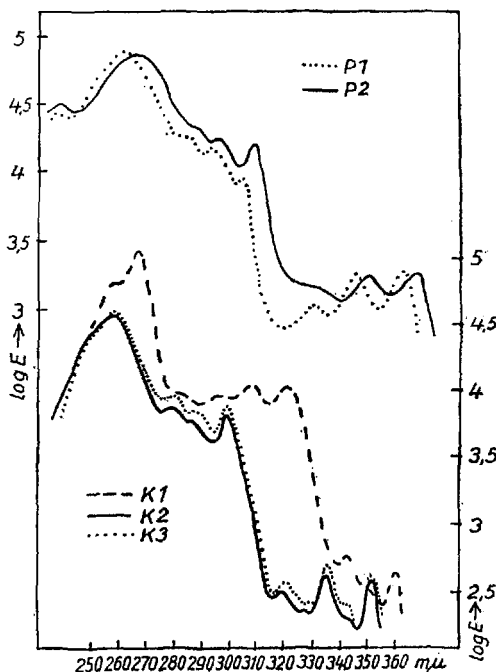


Abb. 1. Vgl. Text.

Nach 476 Schmelzvorgängen chromatographierte man die aus dem vorderen 4 cm langen Abschnitt des Rohres erhaltenen 145 mg (Schmelzintervall: 113–120°) an Aluminiumoxid (Merck, Akt. Stufe I, Füllhöhe 70 cm, Durchmesser 0,8 cm) mit Benzin. Es bildeten sich 3 Zonen. Die aus der oberen Hälfte der mittleren Zone mit Äthanol-Benzol (3:1) eluierten 39 mg ergaben nach wiederholtem Umlösen aus wäßrigem Äthanol 3 mg Kristalle, die bei 132–135° schmelzen. Mischprobe mit 1,2-Cyclopentenophenanthren: 132–135°. Trinitrobenzolkomplex: 163–166° (gelbe Nadeln aus Äthanol). Der entsprechende 1,2-Cyclopentenophenanthrenkomplex schmilzt bei 165–166° (8).

UV-Spektrum in Methanol (siehe K3 in Abb. 1).

Methylchrysenfraktion

22,6 g wurden in Benzin gelöst und in der Hitze mit wenig Äthanol versetzt. Den auftretenden Niederschlag löste man zweimal aus Benzin um und chromatographierte 372 mg davon an Aluminiumoxid (Merck, Akt. Stufe I–II, Füllhöhe 60 cm, Durchmesser 1,5 cm) mit Benzin. Im UV-Licht waren 3 Zonen sichtbar. Die mittlere Zone gab nach Elution mit

Äthanol-Benzol (1:4) 281 mg (Schmelzintervall 200–230°), die zur Zonenschmelze eingesetzt wurden. Nach 360 Schmelzvorgängen (Rohrdurchmesser 0,2 cm, Füllhöhe 7 cm) erhielt man aus dem vorderen 1 cm langen Rohrabchnitt 43 mg Kristalle (Schmelzintervall: 240–250°), die mehrfach aus Benzin umkristallisiert wurden. Ausbeute: 6,2 mg weiße Kristalle, die bei 251–254° schmolzen. Mischprobe mit K1: 251–254°.

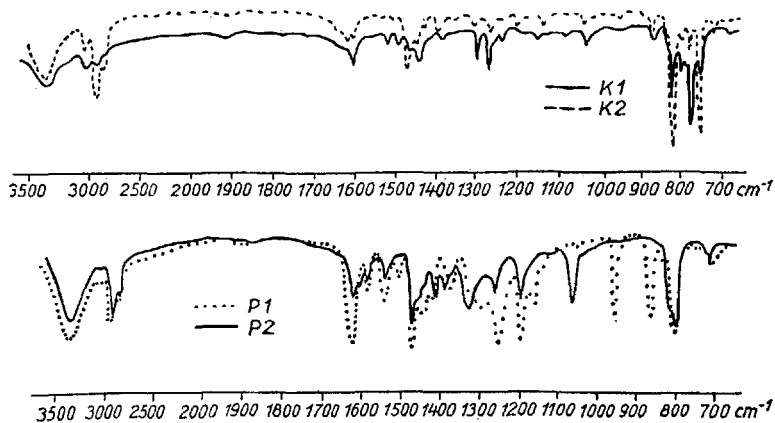


Abb. 2. Vgl. Text.

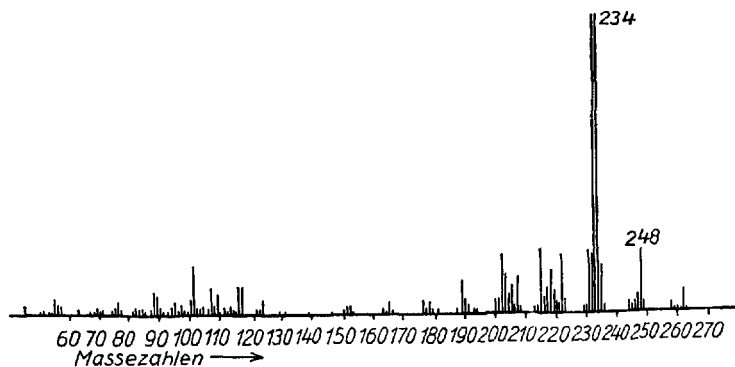


Abb. 3. Vgl. Text.

Schmelzpunkt des 2,4,7-Trinitrofluorenonkomplexes: 241–243° (orangefarbene Nadeln aus Benzol).

UV-Spektrum: in Methanol, identisch mit K1 (siehe Abb. 1).

Die Reinigung der Lösungsmittel erfolgte wie in (2) beschrieben.

Für die Aufnahme des Massenspektrums danken wir Herrn Dr. SPITTELER verbindlich.

Für die kostenlose Überlassung des Ergosterins möchten wir der Fa. Zellstoffabrik Waldhof-Mannheim unseren besonderen Dank aussprechen.

Zusammenfassung

Bei der Hitzezersetzung des Ergosterins konnten drei aromatische Kohlenwasserstoffe und zwei Phenole erhalten und charakterisiert werden.

Schrifttum

1. SCHMID, L. u. W. WAITZ, Z. Ernährungswiss. Suppl. **3**, 45 (1963). — 2. LIBERT, H., K. HOFFELNER u. L. SCHMID (im Druck). — 3. FEIGL, F., Spot tests in Organic Analysis 5. Auflage, S. 188 (New York 1955). — 4. GIRARD, A., A. COHEN, J. W. COOK u. C. L. HEWETT, J. Chem. Soc. **1934**, 653. — 5. COOK, J. W. u. Mitarb., Nature **133**, 377 (1934). — 6. DAVIES, W. u. J. R. WILMSHURST, J. Chem. Soc. **1961**, 4081. — 7. KARPA, S. H., G. A. R. KON u. F. C. J. RUZICKA, J. Chem. Soc. **1934**, 124. — 8. JACOBS, CRAIG, J. biol. Chem. **159**, 617 (1945).

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. L. SCHMID, Wien IX, Währingerstr. 38

From the Department of Applied Chemistry, University College of Science, Calcutta 9 (India)

Metabolic studies on scorbutic guinea pigs**IV. Fatty acid metabolism in vitro**

By R. GUCHHAIT, B. C. GUHA*), and N. C. GANGULI**)

With 2 figures and 5 tables

(Received February 13, 1964)

Fatty acid metabolism in scurvy

The premise that scurvy affects fat metabolism originated with the work of QUASTEL and WHEATLEY (1). Reports in literature have revealed that both fatty acids (2-5) and cholesterol (6-9) metabolisms are disturbed in scurvy. Both anabolism (6, 10, 11) and catabolism (1-3) of fatty acids were reported to be altered in this disease. The oxidation of fatty acids by scorbutic guinea pig liver slices was found to yield lower quantity of acetoacetate compared to the normal animal (1). Addition of ascorbic acid increased the rate of acetoacetate production from which these authors concluded that this vitamin might have some role on the respiration of and on the power to oxidise fatty acids. ABRAMSON (2) has also observed a decreased oxidation of unsaturated fatty acids by different tissues from scorbutic guinea pig and ascorbic acid could correct this subnormal oxidation. DONNAN (3) reported that ascorbic acid plays as an excellent catalyst in the oxidation of unsaturated fatty acids. An increased lipid oxidation by liver slices with ascorbic acid was also shown by OTTOLENGHI et al. (4). The observation by DEBOUS et al. (5) have also indicated that scorbutic guinea pig liver had a lesser capacity for the production of ketone bodies in comparison with the control animal.

The recent report by GUCHHAIT, GUHA and GANGULI (9) has shown that cholesterol-4-¹⁴C catabolism to bile acids is depressed in scorbutic guinea pig both *in vivo* and *in vitro* and ascorbic acid could stimulate the catabolism of cholesterol *in vitro*.

*) Deceased March 20, 1962.

**) Present address: National Dairy Research Institute, Karnal, Punjab (India).