

Ein Vergleich der Werte ergibt für die zweite empfindlichere Messung eine geringe, aber deutlich über die Messgenauigkeit hinausgehende Differenz in der spezifischen Drehung von Methyl-isopropyl-phenyl-benzyl-ammonium-nitrat in H_2O und D_2O .

Es gilt für die Messung II:

$$\Delta [\alpha]_{H_2O-D_2O} (90,8) = + 0,78 \pm 0,23^{\circ}$$

und umgerechnet auf 100 proz. D_2O :

$$\Delta [\alpha]_{H_2O-D_2O} = + 0,86 \pm 0,25^{\circ}$$

oder

$$q [\alpha] \frac{H_2O}{D_2O} = 1,008.$$

Basel, Anstalt für anorganische Chemie.

170. Anreicherung von Vitamin D aus Thunfisch-leberöl¹⁾

von O. Neracher und T. Reichstein.

(2. XI. 36.)

Diese Arbeit wurde in der Absicht unternommen, das natürliche Vitamin D aus Fischtran zu isolieren, da bekanntlich in den letzten Jahren immer mehr Resultate erhalten wurden, die dafür sprachen, dass dieser Stoff nicht identisch ist mit dem durch U.V.-Bestrahlung aus Ergosterin erhaltenen Produkt, das heute Calciferol oder Vitamin D_2 genannt wird²⁾. Da diese Aufgabe inzwischen von Brockmann³⁾ in eleganter Weise gelöst wurde, haben wir unsere Arbeit abgebrochen. Es soll hier nur kurz angegeben werden, wie auf gut reproduzierbarem und relativ einfachem Wege Konzentrate erhalten werden können, die ca. 5000 I. E. D. pro mg enthalten. Nach der inzwischen bekannt gewordenen Wirksamkeit des reinen Vitamins D_3 ⁴⁾ müssen diese Konzentrate bereits ca. 20% reines Vitamin enthalten haben.

¹⁾ Vgl. die demnächst erscheinende Dissertation von O. Neracher. Für diese Arbeit wurden uns Mittel aus dem Jubiläumsfond an der Eidg. Techn. Hochschule zur Verfügung gestellt. Weitere Unterstützung gewährte uns die F. Hoffmann-La Roche & Co. A.-G. in Basel, in deren Laboratorien auch die Tierversuche zur Auswertung der D-Wirksamkeit durch Herrn Dr. V. Demole sowie A-Vitaminbestimmungen im „Vitameter“ durchgeführt wurden. Es sei auch hier für diese Zuwendungen der ergebenste Dank ausgesprochen.

²⁾ Am eindeutigsten spricht für die Verschiedenheit der biologische Vergleich der zwei Präparate an Ratten und Vögeln (meist werden Hühner verwendet). Bei Anwendung gleicher Mengen, in Ratteneinheiten ausgedrückt, ist das natürliche Produkt an Vögeln viel stärker wirksam.

³⁾ Z. physiol. Ch., **241**, 104 (1936).

⁴⁾ Windaus, Schenck und v. Werder, Z. physiol. Ch., **241**, 100 (1936), vgl. ferner Grab, Z. physiol. Ch., **243**, 63 (1936), wo sich eine sehr eingehende Literaturübersicht vorfindet.

Versuche, daraus mit 3,5-Dinitro-benzoylchlorid das Derivat des Vitamins in krystallisierter Form abzuscheiden, gaben mehrere krystallisierte Ester. Die zugrundeliegenden Alkohole erwiesen sich jedoch als biologisch inaktiv. Da in diesem Zeitpunkt die Arbeit von *Brockmann* erschien, wurden keine weiteren Versuche mehr unternommen.

Im folgenden sei der benützte Weg kurz skizziert. Aus zahlreichen Versuchen früherer Forscher waren wichtige Resultate bekannt, die für die Anreicherung geeignet schienen, aber nur teilweise benützt werden konnten.

Als Ausgangsmaterial diente Thunfischlebertran, der bekanntlich besonders reich an D-Vitamin ist (ca. 100—400mal reicher als der bekannte Dorschlebertran). Der verwendete Tran enthielt ca. 15 I.E.D. pro mg. Versuche, aus dem gesamten Tran, also vor einer Verseifung, das Vitamin durch Lösungsmittel herauszunehmen, entsprechend einem Vorschlage von *Zucker*¹⁾, erwiesen sich als wenig günstig. Es wurde daher die Verseifung mit methylalkoholischem Kali in Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Aus 2,85 kg Tran wurden dabei 144,5 g Unverseifbares erhalten, das praktisch das gesamte D-Vitamin noch enthielt²⁾.

Mit diesem Material wurden verschiedene Vorproben durchgeführt, die vor allem bezweckten, zunächst das äusserst oxydable und alle Farbreaktionen störende A-Vitamin abzutrennen. Der elegante Weg von *Dalmer, v. Werder* und *Moll*³⁾, die dies durch Einwirken von Maleinsäure-anhydrid in der Kälte erzielen, gab unerwarteterweise ein schlechtes Resultat. Schon unter sehr milden Bedingungen, unter denen nicht einmal alles A-Vitamin entfernt war, gingen schon sehr erhebliche Mengen D-Vitamin verloren. Viel besser geeignet war Citraconsäure-anhydrid, das *Windaus*⁴⁾ für die Reinigung von Calciferol benützte. Sehr brauchbar erwies sich ferner eine fraktionierte Ausschüttlung mit 88-proz., dann mit 95-proz. Methanol aus Pentanlösung, wobei mit dem 88-proz. Methanol zunächst die Hauptmenge A-Vitamin herausgelöst wird, fast ohne D-Vitamin mitzureissen; mit dem stärkeren Methanol kann dann allmählich das D-Vitamin erhalten werden⁵⁾. Angewendet wurde schliesslich ein einfacherer, wenn auch für diesen Zweck etwas weniger wirksamer Weg.

¹⁾ *Zucker*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **20**, 158 (1922).

²⁾ Eine weitere Menge solchen Materials wurde uns genau nach Angaben von Herrn Dr. *Werner Graf*, Norsk Vitaminproduksjon A/S, Oslo, bereitet, dem wir auch hier den verbindlichsten Dank aussprechen. Es enthielt pro mg sogar 500 I.E.D.

³⁾ *Z. physiol. Ch.* **224**, 86 (1934).

⁴⁾ *A.* **492**, 226 (1931).

⁵⁾ Ein ganz ähnliches Verfahren ist von *Brockmann* inzwischen beschrieben worden. Das sicherste Resultat wird nach unsern Ergebnissen erhalten, wenn zuerst die Pentan-Methanoltrennung angewandt und die D-Fraktion anschliessend noch mit etwas Citraconsäure-anhydrid nachbehandelt wird.

Löst man das rohe Unverseifbare in einer geeigneten Menge Methanol (eine grössere Menge schwer lösliches Cholesterin kann vorher entfernt werden) und kühlt längere Zeit auf -80° ab, so schlägt sich ca. 80—85% des vorhandenen D-Vitamins auf dem ausfallenden Cholesterin nieder und kann durch Abnutschen bei -80° und Nachwaschen mit ebenso gekühltem Methanol von der Hauptmenge A-Vitamin getrennt werden, das sich überwiegend in den Mutterlaugen vorfindet, zusammen mit den restlichen 15—20% D-Vitamin. Dieser Teil wurde zunächst vernachlässigt.

Das bei -80° ausgefrorene Roh-Cholesterin stellt bei Zimmertemperatur eine ölige, von Krystallen durchsetzte Masse dar. Eine weitere Menge von Cholesterin wurde durch Ausfrieren aus Pentan entfernt und so ein Öl erhalten, das ca. 1000 I. E. D. pro mg enthält.

Hier wurde eine grobe Chromatographie nach der Durchlaufmethode eingeschaltet. Das Öl wird, in Pentan gelöst, durch eine Säule von aktiviertem Aluminiumoxyd filtriert und erschöpfend mit Pentan nachgewaschen. Das Pentanfiltrat, ein zitronengelbes Öl, ist praktisch D-Vitaminfrei.

Die Säule wird mit Benzol, Äther und alkoholhaltigem Äther nachgewaschen, wobei die ganze D-Aktivität ins Filtrat geht. Es resultiert ein Produkt mit ca. 2000 I. E. D. pro mg. Dieses wird nach der Vorschrift von *Ender*, die sich sehr gut bewährt hat, mit Phthalsäure-anhydrid in eine Alkohol-Fraktion und in Alkohol-freies zerlegt. Das letztere ist biologisch inaktiv, die Alkoholfraktion enthält die ganze Aktivität mit ca. 3000—3500 I. E. D. pro mg. Aus der Alkoholfraktion wird das vorhandene Cholesterin und eventuell andere Sterine durch Digitonin vollständig entfernt. Das verbleibende cholesterinfreie Öl (8,5 g) wurde nochmals einer groben Chromatographie wie oben unterzogen und lieferte so Konzentrate (6,2 g) mit ca. 5000 I. E. D. pro mg.

Es wurde schliesslich noch versucht, solche Konzentrate durch Destillation im Hochvakuum weiter zu reinigen. Bei Anwendung eines guten Hochvakuums von ca. 10^{-4} mm und des in Figur 1 skizzierten Molekularkolbens gelingt es allerdings, bei einer maximalen Badtemperatur von 150° die gesamte D-Wirksamkeit ins Destillat überzuführen, das gegenüber dem Ausgangsmaterial eine wesentlich hellere Färbung aufweist. Es destillieren aber dabei ca. 75% der gesamten Gewichtsmenge, ausserdem ist bei Molekularkolben eine Fraktionierung bei der Destillation sehr wenig wirksam. Aus diesem Grunde wurde von der Anwendung Abstand genommen.

Es wurde weiter versucht, aus den höchst aktiven Konzentraten mit Dinitro-benzoylchlorid krystallisierte Derivate herzustellen. Es wurden drei verschiedene krystallisierte Dinitro-benzoesäure-ester erhalten, die aber alle bei der Verseifung keine aktiven Alkohole

lieferten. Es ist im experimentellen Teil eine Verseifungsmethode von Dinitro-benzoaten mit alkalischer Stannitlösung angegeben, welche die oxydative Wirkung der Nitrogruppen in alkalischer Lösung ausschaltet. Nur mit dieser Modifikation gelang es, aus einem der krystallisierten Dinitro-benzoate den zugrundeliegenden Alkohol unversehrt zurückzugewinnen. Sie dürfte auch für andere Zwecke geeignet sein.

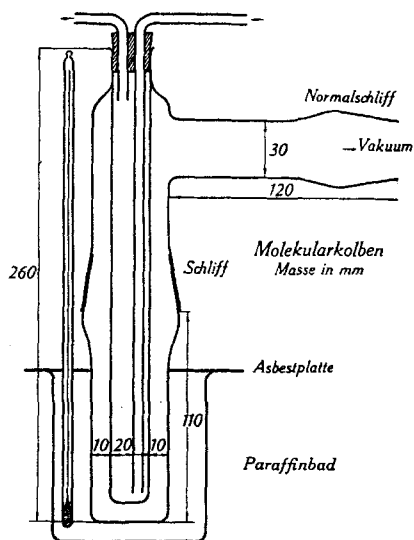


Fig. 1.

Hier wurde die Arbeit abgebrochen, da in diesem Zeitpunkt die Publikation von *H. Brockmann* erschien. Es sei jedoch noch erwähnt, dass das Cholesterin aus Thunfischleberöl in besonders reichem Masse einen Begleiter enthält, der im Ultraviolett bei ca. 250 m μ (Hexanlösung) eine sehr starke Absorptionsbande zeigt und mit Digitonin fällbar ist. Möglicherweise liegt hier das Provitamin vor. Der absorbierende Stoff lässt sich durch fraktionierte Krystallisation des Acetates weitgehend anreichern.

Experimenteller Teil.

Alkalische Verseifung.

Der verwendete Methylalkohol war in Stickstoffatmosphäre über Kaliumhydroxyd destilliert. Das Wasser wurde ausgekocht und unter Stickstoffdruck erkalten gelassen. Der verwendete Äther wurde jeweils immer frisch über Calciumchlorid destilliert.

In einem mit Stickstoff gefüllten, 4 L fassenden Rundkolben, der mit Rückflusskühler versehen war, wurden 300 g festes Kalium-

hydroxyd in 150 cm³ Wasser gelöst, mit 1,3 L Methanol versetzt und nach Zugabe von 1 kg Thunfischleberöl (dieses enthielt ca. 15 I. E. D. pro mg) 1½ Stunden unter Rückfluss gekocht. Um Luft fernzuhalten, wurde durch ein Rohr, das bis zur Mitte des Kühlers reichte, reiner Stickstoff langsam eingeleitet, so dass sich das hinaufdestillierende Methanol nur mit Stickstoff sättigen konnte. Nach dem Erkalten wurde mit 4 L Stickstoff-Wasser verdünnt und viermal mit je 750 cm³ Äther ausgeschüttelt (in Stickstoffatmosphäre). Die Ätherlösungen wurden mehrmals mit 25-proz. Methanol, dann mit Wasser gewaschen und nach Zugabe von 0,1 g Hydrochinon über Natriumsulfat getrocknet und durch Destillation von Äther befreit. Ausbeute 144,5 g rohes Unverseifbares, als gelbe, von Kristallen durchsetzte Masse. Soweit es nicht sofort weiter verarbeitet wurde, schmolzen wir es, wie auch alle weiteren Stufen, stets sofort in Glasampullen im Vakuum ein.

Methanol-trennung.

Die 144,5 g rohes Unverseifbares wurden in ca. 400 cm³ Methanol heiss gelöst und hierauf durch Kühlung in Kohlendioxydatmosphäre der Hauptteil Cholesterin bei 0° kristallisieren gelassen. Die etwas schmierigen Kristalle wurden abgenutscht, mit wenig Methanol gewaschen und noch zweimal aus 200 und 150 cm³ Methanol umkristallisiert, worauf sie nur noch leicht gelblich und nicht mehr schmierig waren. (Sie zeigten eine Aktivität von weniger als 20 I. E. D. pro mg.) Ausbeute 48,7 g Roh-Cholesterin I.

Die gelbbraune Methanollösung, deren Volumen nicht mehr als 1,2 L betragen soll, wurde in einem entsprechenden länglichen Kolben in einem grossen *Dewar*-Gefäss unter Kohlendioxyd eine halbe Stunde unter öfterem Schwenken auf -80° abgekühlt, wobei sich reichlich kristallines Material ausschied. Nach dieser Zeit wurde auf einer grossen Nutsche über eine ca. 3 cm dicke Schicht fein gepulvertem und etwas gepresstem festen Kohlendioxyd abgenutscht und dreimal mit Methanol von -80° (insgesamt 750 cm³) nachgewaschen. Die Filtration dauerte ca. 3 Stunden; es muss eventuell durch Nachgeben von festem Kohlendioxyd eine Erwärmung vermieden werden.

Die feste Masse wird zusammen mit dem verbleibenden Kohlendioxyd in einen Rundkolben gegeben und auftauen gelassen. Nach eventueller Filtration wird im Vakuum zur Trockne gedampft. Ausbeute 60,0 g Cholesterinfraktion II als braunes, von wenig Kristallen durchsetztes Öl. Es zeigte eine D-Wirksamkeit von ca. 1000 I. E. D. pro mg und einen A-Vitamingehalt von ca. 520 I. E. A. pro mg.

Die durchgesaugte Methanollösung hinterliess ein dunkelrot-braunes Öl in einer Ausbeute von 35,2 g mit einem Gehalt von ca. 250 I.E.D. pro mg und ca. 1333 I.E.A. pro mg. Dieses Material wurde zunächst nicht weiter benützt und im Vakuum eingeschmolzen.

Will man es aufarbeiten, so ist eine Verteilung zwischen Pentan und Methanol mit nachfolgender Behandlung mit Citraconsäure-anhydrid die geeignete Methode. Diese wird dann zweckmässig mit dem ganzen Öl, ohne vorheriges Ausfrieren, vorgenommen. Für die Anreicherung durch Pentan-Methanoltrennung werden zweckmässig drei Scheidetrichter benützt, in den ersten kommt die Lösung des Öls in der 20-fachen Menge Pentan, in die zwei folgenden wird reines Pentan vorgelegt. Man schüttelt zunächst 15mal mit je ca. demselben Volumen 88-proz. Methanol aus, das die Hauptmenge A-Vitamin, aber sehr wenig D-Vitamin aufnimmt. Anschliessend vereinigt man den Inhalt der zwei ersten Scheidetrichter und schüttelt 25mal mit 95-proz. Methanol aus, wodurch das D-Vitamin gewonnen wird. Die Citraconsäure-anhydrid-Behandlung des letzteren Anteils kann genau nach den Angaben von *Windaus*¹⁾ für die Reinigung des Calciferols durchgeführt werden.

Die Weiterverarbeitung des Konzentrates 3 erfolgte in zwei Portionen: 30 g davon wurden in Pentan aufgenommen und längere Zeit zunächst bei Zimmertemperatur, dann bei 0° und schliesslich bei -15° stehengelassen, wobei sich reichlich Cholesterin abschied. (Kühlt man zu rasch, so wird es so fein abgeschieden, dass es kaum filtrierbar ist.) Die Krystalle wurden abgenutscht und mit kaltem Pentan gewaschen. Ausbeute 8 g rein weisse Krystalle vom Smp. 146°, die nach den Farbreaktionen weder A- noch D-Vitamin enthielten und vernachlässigt wurden. Die Lösung der verbleibenden 22 g wurde einer groben Chromatographie unterzogen.

Chromatographie der Cholesterinfraktion II.

Es wird nur die definitiv benützte Methode beschrieben. Für die Aufnahme der Säule diente ein 60 cm langes und 45 mm weites Rohr, das unten einen Hahn trug. Nach Einsetzen einer passenden Platte wurde zuerst eine Scheibe Filterpapier aufgelegt, diese mit etwas Watte gut belegt und hierauf ca. 3 cm hoch grober, reiner Quarzsand eingefüllt. Darauf wurden 500 g Aluminiumoxyd (*Merck*, standardisiert nach *Brockmann*) in Pentan aufgeschlemmt aufgegossen. Nachdem alles Material eingetragen und eine gleichmässige Säule entstanden war, wurde die Lösung von 22 g Konzentrat Nr. 3 (im Vakuum von allen Methanolresten völlig befreit) in ca. 200 cm³ Pentan aufgegossen. Zur Beschleunigung der Filtration wurde ein leichter Kohlendioxidruck angesetzt. Es wurde mit ca. 2 L reinem Pentan nachgewaschen, bis dieses farblos ablief. Die grünlichgelbe Pentanlösung zeigt äusserst starke Fluoreszenz (hellgelb) bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht und hinterlässt 2,608 g Öl mit einer D-Wirksamkeit von weniger als 10 I.E.D. pro mg.

¹⁾ A. a. Orten.

Die Säule wurde hierauf zunächst mit absolutem Benzol, dann mit frisch über Calciumchlorid destilliertem Äther nachgewaschen, bis dieser nur noch ganz schwach gefärbt war und eine Probe beim Einengen Cholesterinkristalle ergab. Dieses Filtrat hinterliess 5,872 g mit einer D-Wirksamkeit von fast 2000 I.E.D. pro mg.

Die Säule wurde nun mit einer Mischung von Äther-Methanol (1:1) nachgewaschen, die sehr rasch eluierte. Es wurden daraus 11,682 g Substanz erhalten, die sehr stark cholesterinhaltig war und noch eine D-Wirksamkeit von ca. 250 I.E.D. pro mg zeigte. Sie wurde nachträglich mit dem obigen Benzol-Ätherfiltrat zusammen verarbeitet.

Der Verlust in der Säule betrug somit 1,838 g Substanz, hauptsächlich stark gefärbte Verunreinigungen.

Phthalsäure-Trennung.

Diese wurde fast genau nach der Vorschrift von *Ender*¹⁾ durchgeführt, und zwar mit dem Benzol-Äther sowie mit dem Äther-Methanol-filtrat. Es sei die gesamte Ausbeute angegeben. Erhalten wurden aus 17,554 g Material: 12,7 g pentanlösliche Alkohole, 0,569 g pentanunlösliche Alkohole (vernachlässigt) sowie 3,67 g Alkohol-freies, das letztere war praktisch inaktiv. (Die pentanlöslichen Alkohole aus dem Benzol-Ätherfiltrat allein, die in einer Ausbeute von 3 g vorlagen, wurden speziell geprüft und zeigten eine D-Wirksamkeit von ca. 3000—3500 I.E.D. pro mg, also war kein nachweisbarer Verlust eingetreten.)

Die 12,7 g pentanlöslichen Alkohole wurden nunmehr in üblicher Weise mit Digitonin von Cholesterin vollständig befreit. Angewendet wurden 30 g Digitonin in 2 L 90-proz. Alkohol. Erhalten wurden 8,48 g cholesterinfreie Alkohole sowie 4,22 g Cholesterin aus Digitonid. Das Cholesterinfreie wurde ein zweites Mal mit der 25-fachen Menge Aluminiumoxyd wie oben chromatographiert. Nur wurden diesmal das Benzolfiltrat und das Ätherfiltrat separat aufgefangen, was sich jedoch als zwecklos erwies.

Erhalten wurden:

		D-Wirksamkeit in I. E. D.
Pentanfiltrat	2,00 g	ca. 5
Benzolfiltrat	3,05 g	„ 6000
Ätherfiltrat	3,13 g	„ 5000
Methanol-Ätherfiltrat	0,24 g	„ 300

¹⁾ Z. Vitaminforschung, 2, 241 (1933).

Übersicht der Ausbeuten auf die ganze Menge umgerechnet.

Bezeichnung der Fraktion	Menge	D-Wirksamkeit in I. E. D.	
		pro mg	total
Ausgangsöl	2850 g	ca. 15	ca. $42,7 \times 10^6$
Cholesterin II	60,0 g	„ 1000	„ $60,0 \times 10^6$
Methanollösung	35,2 g	„ 250	„ $9,0 \times 10^6$
Pentanfiltrat	5,2 g	unter 10	unter $0,02 \times 10^6$
Benzol-Ätherfiltrat	11,6 g	ca. 2000	ca. $23,2 \times 10^6$ (?)
Äther-Methanolfiltrat	23,4 g	„ 250	„ $4,6 \times 10^6$
Pentanlösliche Alkohole	25,4 g	—	—
dito cholesterinfrei	8,4 g	—	—
Pentanfiltrat (II)	4,0 g	„ 5	
Benzolfiltrat (II)	6,1 g	„ 6000	„ $36,6 \times 10^6$
Ätherfiltrat (II)	6,26 g	„ 5000	„ $31,3 \times 10^6$
Methanol-Ätherfiltrat (II)	0,48 g	„ 250	„ $0,1 \times 10^6$

Die scheinbare Wirksamkeits-Steigerung von total $42,7 \times 10^6$ I. E. D. beim Ausgangsöl auf insgesamt ca. $67,9 \times 10^6$ I. E. D. in den Endkonzentraten überschreitet die Fehlergrenze der biologischen Bestimmungen kaum, da diese jeweils nicht bis zur höchstmöglichen Genauigkeit gesteigert wurden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass in der beim Ausfrieren anfallenden Methanollösung ebenfalls noch total ca. $9,0 \times 10^6$ I. E. D. enthalten waren und daher nicht in die Endkonzentrate gelangten.

Herstellung der Dinitro-benzoesäure-ester.

3,025 g des oben erwähnten Ätherfiltrates (II) (mit 5000 I. E. D. pro mg) wurden, in 10 cm³ wasserfreiem Pyridin gelöst, mit der Lösung von 4 g 3,5-Dinitro-benzoylchlorid in 6 cm³ absolutem Benzol versetzt und 5 Minuten unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. (Besser bewährt sich sonst ein grösserer Überschuss an Dinitro-benzoylchlorid und weniger Pyridin in ca. der dreifachen Menge Benzol.) Hierauf wurde abgekühlt, mit viel absolutem Äther versetzt, filtriert und mit Äther nachgewaschen. Die Ätherlösung wurde im Scheidetrichter mit eisgekühlter Salzsäure ausgespült, dann erschöpfend mit verdünnter kalter Lauge neutral gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und durch Destillation von Äther befreit. Da der Rückstand mit etwas Pentan versetzt auch nach längerem Stehen nicht krystallisierte, wurde eine chromatographische Vortrennung ebenfalls nach der Durchlaufmethode eingeschaltet. Hierzu wurde wieder die 25-fache Menge Aluminiumoxyd verwendet. Die Elution wurde mit Pentan-Benzolgemischen von steigendem Benzolgehalt begonnen, anschliessend wurde reines Benzol, dann Benzol-Äther und schliesslich reiner Äther und Äther-Acetongemisch verwendet. Das Adsorbat wurde auf diese Weise in 12 ungefähr gleiche Teile aufgetrennt.

Dinitro-benzoat I. Aus den Fraktionen 4—6 (Pentan—Benzol 1:1 und reines Benzol) schieden sich nach Zusatz von wenig Äther 500 mg fleischfarbige Krystalle aus. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Aceton, zuletzt aus Benzin (Sdp. 110°) wurden schöne flache, fleischfarbige Nadeln erhalten. Smp. 202° (Korr.). Sie zeigen bei der Tüpfelprobe auf einem festen Krystall von Antimontrichlorid oder von Trichloressigsäure eine intensive Purpurfärbung, die allmählich in Braun übergeht. Eine im Hochvakuum bei 100° getrocknete Probe gab die folgenden Analysenwerte:

3,216 mg Subst. gaben	8,012 mg CO ₂ und	3,00 mg H ₂ O
3,332 mg Subst. gaben	0,147 cm ³ N ₂ (20°, 724 mm)	
C ₃₂ H ₄₀ O ₇ N ₂	Ber. C 68,20	H 7,16 N 4,97%
	Gef. „ 67,95	„ 6,95 „ 4,89%

Unter der Annahme, dass ein Mono-ester vorliegt, würde dem zugrundeliegenden Alkohol ungefähr die folgende Formel zukommen: C₂₅H₃₈O₂.

Reduktive Verseifung: 50 mg des Dinitro-benzoates I wurden in einem Schliffkölbchen von 50 cm³ Fassungsvermögen in 6 cm³ absolutem Benzol gelöst, mit 10 cm³ absolutem Benzol verdünnt und hierauf mit einer Lösung versetzt, die wie folgt bereitet worden war. 200 mg krystallisiertes Zinn(II)chlorid wurden in ganz wenig Wasser gelöst und mit so viel 50-proz. Kalilauge versetzt, dass sich die anfangs entstehende Fällung bei leichtem Wärmen auflöste. Dann wurde mit 10 cm³ absolutem Alkohol vermischt und sofort zu obiger Lösung gegeben, bevor das Stannit Zeit fand, auszukrystallisieren. Nur im ersten Moment entsteht eine Rotfärbung, die sofort verschwindet unter Ausfällung unlöslicher Zinnsalze. Die Mischung wird 15 Minuten unter Rückfluss gekocht, mit luftfreiem Wasser verdünnt und mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit verdünnter Salzsäure und Natronlauge neutral gewaschen, getrocknet und hinterliess 34 mg des zugrundeliegenden Alkohols als leicht gelbliches, dickes Öl. Die Verbindung erwies sich als antirachitisch unwirksam an Ratten. Dass tatsächlich der unveränderte Alkohol vorlag, wurde dadurch bewiesen, dass ein Teil bei der Wiederveresterung dasselbe Dinitro-benzoat zurück lieferte. Bei gewöhnlicher Verseifung ohne Zusatz von Zinn(II)chlorid, die vom Derivat des Calciferols getragen wird¹⁾, gab das entstandene Öl bei der Wiederveresterung keine Krystalle mehr.

Dinitro-benzoat II. Diese Verbindung wurde aus den eingengten Mutterlaugen des Dinitro-benzoates I gewonnen durch längeres Stehen in Pentanlösung. Aus Aceton wurden 230 mg blass gelblich gefärbte filzige Nadeln vom Smp. 182° erhalten. Sie wurden zur Analyse zunächst aus Äther durch Einengen, dann nochmals

¹⁾ Askew, Bourdillon, C. S., Proc. Roy. Soc. [B] **109**, 490 (1932).

aus Aceton umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt war dann 181,5—182,5° (korr.).

3,971 mg Subst. gaben	9,80 mg CO ₂	und	2,44 mg H ₂ O
3,701 mg Subst. gaben	0,196 cm ³ N ₂	(22°, 720 mm)	
C ₂₇ H ₃₃ O ₆ N ₂	Ber. C 67,4	H 6,87	N 5,82%
	Gef. .. 67,30	.. 6,87	.. 5,80%

Unter der Annahme, dass ein Mono-ester vorliegt, würde dem zugrundeliegenden Alkohol die Formel C₂₀H₃₀₋₃₂O zukommen. Durch alkalische Verseifung unter Zusatz von Zinn(II)chlorid wie oben wurde ein fast farbloses Öl erhalten, das keine D-Wirksamkeit zeigte.

Dinitro-benzoat III. Dieses wurde aus den verbleibenden Mutterlaugen nach Reinigung über die α -Naphthylaminverbindung¹⁾ erhalten, und zwar in sehr geringer Menge, die zu einer Analyse nicht ausreichte. Es zeigte den Schmelzpunkt 113°. Die Verseifung mit alkalischem Stannit gab eine sehr geringe Menge Substanz, die keine D-Wirksamkeit zeigte.

Die verbleibenden Fraktionen wurden nicht weiter auf krystallisierte Bestandteile abgesehen, da die Arbeit hier abgebrochen wurde.

Die Mikroanalysen wurden in der Mikrochemischen Abteilung des Institutes (Leitung Dr. Furter) ausgeführt.

Laboratorium für organische Chemie,
Eidg. Techn. Hochschule Zürich.

171. Polyterpene und Polyterpenoide CVIII²⁾.

Synthese des bei der Dehydrierung pentacyclischer Triterpene entstehenden Trimethyl-naphtols

von L. Ruzicka, K. Hofmann und H. Schellenberg.

(2. XI. 36.)

Ausgehend von dem homologen Picen vom Smp. 306°, welches bei der Dehydrierung einer Anzahl pentacyclischer Triterpene isoliert werden konnte³⁾, wurde arbeitshypothetisch die Anwesenheit eines hydrierten Picengerüsts in den Ausgangsstoffen angenommen. Eine mögliche Verteilung der Seitenketten (Schema I) ergab sich aus der Konstitution der als Hauptprodukt der Dehydrierung auftretenden homologen Naphtalinkohlenwasserstoffe, des 2,7-Dimethyl-, des 1,2,7-Trimethyl- und des 1,2,5,6-Tetramethyl-naphtalins

¹⁾ Reichstein, Helv. 9, 799 (1926).

²⁾ CVII. Mitt. Helv. 19, 1136 (1936).

³⁾ Helv. 15, 431 (1932).