

säure gelöst und 16 Stunden bei 18° stehen gelassen. Die wie bei (VIII) durchgeführte Aufarbeitung lieferte nach Umkrystallisieren aus Äther-Petroläther 25 mg farbloser Nadeln vom Smp. 107—108°, die im Hochvakuum bei 80° getrocknet und unmittelbar vor der Verbrennung im Schiffchen geschmolzen wurden.

3,712 mg Subst. gaben 10,368 mg CO<sub>2</sub> und 3,31 mg H<sub>2</sub>O  
 C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub> (360,52) Ber. C 76,62 H 10,06%  
 Gef. „ 76,22 „ 9,98%

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich (Leitung *H. Gubser*) ausgeführt.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

## 55. Über Gallensäuren und verwandte Stoffe.

20. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Versuche zur Herstellung von Cholen-(9)-säure

von *H. B. Alther* und *T. Reichstein*.

(9. II. 43.)

Vor kurzem beschrieben wir die Cholen-(11)-säure (entsprechend (VI))<sup>2)</sup> sowie einige ihrer Umsetzungsprodukte. Es sollte nun auch versucht werden, die isomere Cholen-(9)-säure (XI) zu bereiten, um ihre Reaktionen und Derivate kennen zu lernen. Diese Säure entstand neben anderen Produkten durch Reduktion des 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylesters (X)<sup>3)</sup> mit Hydrazin und Alkali nach *Wolff-Kishner*<sup>4)</sup>, doch gelang die Reinigung auch in Form des Methylesters (XII) nicht vollständig. Dieser liess sich zwar krystallisieren, ist aber offenbar isomorph mit den noch zu erwähnenden, gleichzeitig entstehenden Nebenprodukten. Ein analoger Weg zur Gewinnung der entsprechenden 3 $\alpha$ -Oxy-cholen-(9)-säure ist von *Chakravorty* und *Wallis*<sup>5)</sup> beschrieben worden, doch geben diese Autoren keinerlei Beweise dafür an, dass sie den gesuchten Stoff tatsächlich erhalten haben. Aus Angaben in der Literatur ist zu entnehmen, dass  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Ketone und Aldehyde bei der Reduktion nach *Wolff-Kishner* recht verschiedene Stoffe liefern können. Wie sich (X) dabei verhalten würde, liess sich daher kaum mit Sicherheit voraussagen.

<sup>1)</sup> 19. Mitteilung vgl. *P. Grandjean, T. Reichstein, Helv. 26, 482 (1943)*.

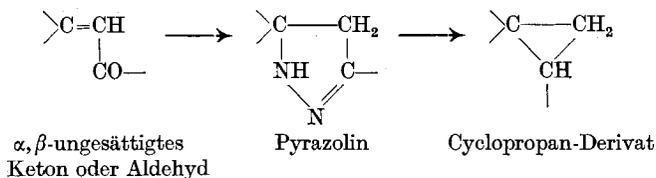
<sup>2)</sup> *H. B. Alther, T. Reichstein, Helv. 25, 805 (1942)*.

<sup>3)</sup> *J. Barnett, T. Reichstein, Helv. 21, 926 (1938)*.

<sup>4)</sup> Über eine andere Methode wird demnächst berichtet.

<sup>5)</sup> *P. N. Chakravorty, E. S. Wallis, Am. Soc. 62, 318 (1940)*, vgl. auch die Publikation von *B. B. Longwell, O. Wintersteiner, Am. Soc. 62, 200 (1940)*.

Von *Kishner* wurde vor allem die Bildung von Cyclopropan-Derivaten beobachtet, die über Pyrazoline nach folgendem Schema verläuft:



*Kishner* hat die Pyrazoline jeweils isoliert und sie hierauf durch Erhitzen mit Alkali und platinieren Tonscherben zersetzt. So liefert Zimtaldehyd das Phenyl-cyclopropan<sup>1)</sup>, analog reagiert Citral<sup>2)</sup>. Aus Phoron entsteht 1,1-Dimethyl-2-isobutenyl-cyclopropan<sup>3)</sup>, aus Isobutyliden-aceton das 1-Methyl-2-isopropyl-cyclopropan<sup>4)</sup>, aus Benzal-aceton das 1-Methyl-2-phenyl-cyclopropan<sup>5)</sup>, aus Benzal-acetophenon das 1,2-Diphenyl-cyclopropan<sup>6)</sup> und aus Furfural-aceton das 1-Methyl-2-furyl-cyclopropan<sup>7)</sup>. Bei Dibenzal-aceton wurde dagegen ein verschiedener Reaktionsverlauf beobachtet, je nachdem ob nur 1 Mol oder ein Überschuss von Hydrazin verwendet wurde<sup>8)</sup>. Im ersteren Falle bildete sich das Pyrazolin, das beim Erhitzen ohne Katalysator 1,2-Diphenyl-cyclopenten-(3) gab, im zweiten Fall wurde ein Hydrazino-pyrazolin erhalten, das beim Erhitzen mit Katalysatoren teilweise (unter Reduktion der Doppelbindung) 1-Phenyl-2-phenyläthyl-cyclopropan lieferte. Auch cyclische ungesättigte Ketone können Cyclopropan-Derivate geben, wenigstens wenn sich die Doppelbindung in semicyclischer Stellung befindet. Aus Pulegon wurde so Caran<sup>9)10)11)</sup> und aus Piperitenon das Caren<sup>12)13)</sup> erhalten, während Carvenon, dessen Doppelbindung im Ring gelegen ist, keinen Dreiring liefert<sup>14)</sup>.

Eine interessante Verschiebung von Doppelbindungen ohne Dreiringbildung wurde beim Furfurol beobachtet<sup>15)</sup>, aus dem ein instabiles Isomeres des  $\alpha$ -Methylfurans entstand.

<sup>1)</sup> *N. Kishner*, Ж. **45**, 949 (1913); C. **1913**, II, 2129.

<sup>2)</sup> derselbe Ж. **50**, 1 (1918); C. **1923**, III, 669.

<sup>3)</sup> derselbe Ж. **45**, 957 (1913); C. **1913**, II, 2130.

<sup>4)</sup> derselbe Ж. **45**, 987 (1913); C. **1913**, II, 2133.

<sup>5)</sup> derselbe Ж. **44**, 849 (1912); C. **1912**, II, 1925.

<sup>6)</sup> derselbe Ж. **47**, 1102 (1915); C. **1916**, I, 1063.

<sup>7)</sup> derselbe Bull. [4] **45**, 767 (1929); C. **1929**, II, 3011; Ж. **61**, 781 (1929); C. **1931**, II,

236.

<sup>8)</sup> derselbe Ж. **47**, 1819 (1915); C. **1916**, II, 318.

<sup>9)</sup> *N. Kishner, A. Sawadowski*, Ж. **43**, 1132 (1911); C. **1912**, I, 1456.

<sup>10)</sup> *N. Kishner*, Ж. **43**, 1554 (1911); C. **1912**, I, 1713.

<sup>11)</sup> *N. Kishner*, Ж. **44**, 165 (1912); C. **1912**, I, 2025.

<sup>12)</sup> *Y. R. Naves*, Helv. **25**, 737 (1942).

<sup>13)</sup> *Y. R. Naves, G. Papazian*, Helv. **25**, 984, 1023 (1942).

<sup>14)</sup> *N. Kishner*, Ж. **50**, 1 (1918); C. **1923**, III, 669.

<sup>15)</sup> *N. Kishner*, Ж. **1**(63), 1212 (1931); C. **1932**, II, 1173.



Auch in der Sterinreihe sind Reduktionen  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigter Ketone nach *Wolff-Kishner* beschrieben worden. So erhielt *Lettré*<sup>1)</sup> aus Cholesten-(4)-on-(3) neben anderen Stoffen Cholesten-(4) und Cholesterin. *Dutcher* und *Wintersteiner*<sup>2)</sup> haben in einer sehr eingehenden Arbeit über die *Wolff-Kishner*-Reduktion von Keto-Steroiden vor allem auf das besondere Verhalten der 3-ständigen Ketogruppe hingewiesen und u. a. gefunden, dass beim Erhitzen von Cholestenon-semicarbazon mit Natriumäthylat die folgenden Stoffe entstehen: Koprostanol-(3 $\alpha$ ), Cholestanol-(3 $\beta$ ), Cholesterin, Allo-cholesterin und Cholesten-(4), während nach Erhitzen von Cholestenon-Ketazin mit überschüssigem Hydrazin und Natriumalkoholat auf 200° lediglich Cholesten-(4) isoliert werden konnte. *Stange*<sup>3)</sup> erhielt aus Cholesten-(4)-dion-(3,6)-disemicarbazon nur Cholesten-(4) und aus dem Mono-semicarbazon nur Cholestan-diol-(3,6). *Stavelly* und *Bergmann*<sup>4)</sup> erhitzen Cholestadien-(3,5)-on-(7)-semicarbazon mit Natriumäthylat und isolierten hierauf Cholestadien-(3,5). Hieraus lässt sich entnehmen, dass die Bildung von Dreiringen in der Steringruppe nicht bevorzugt wird, was vielleicht so zu erklären ist, dass bisher nur solche  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Ketone dieser Stoffgruppe der *Wolff-Kishner*-Reduktion unterzogen wurden, deren Doppelbindung in einem Ring gelegen ist.

Für den als Ausgangsmaterial benützten 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) fanden *Barnett* und *Reichstein*<sup>5)</sup> früher einen Smp. von 92–93° und ein U. V.-Absorptionsspektrum in Hexan mit einem Maximum bei 234 m $\gamma$  und  $\log \varepsilon = 3,86$ . Bei einem inzwischen bereiteten Präparat von 3 $\alpha$ -Acetoxy-12-ketocholen-(9)-säure-methylester wurde aber für das bei 241 m $\mu$  liegende Maximum des U. V.-Absorptionsspektrums in Alkohol ein  $\log \varepsilon = 4,06$  gefunden<sup>6)</sup>. Dies führte zur Vermutung, dass das von *Barnett* und *Reichstein* beschriebene Präparat von (X) noch nicht rein gewesen ist, was sich bei der folgenden Untersuchung tatsächlich bestätigte. Wie schon von den genannten Autoren gefunden wurde, ergibt die Bromierung der Säure (I) die zwei theoretisch zu erwartenden raumisomeren 11-Brom-12-keto-cholansäuren (III) und (VIII), die sich durch fraktionierte Krystallisation trennen lassen. Als Hauptprodukt entsteht die aus Eisessig in Nadeln krystallisierende Säure (III) und in geringer Menge die empfindlichere, aus Eisessig in Blättchen krystallisierende Säure (VIII). Von *Barnett* und *Reichstein* wurde zur Bereitung von (X) das Gemisch von (III) und (VIII) verwendet. Für die folgenden Untersuchungen wurden nun die zwei Bromsäuren

1) *H. Lettré*, Z. physiol. Ch. **221**, 73 (1933).

2) *J. D. Dutcher*, *O. Wintersteiner*, Am. Soc. **61**, 1992 (1939).

3) *O. Stange*, Z. physiol. Ch. **223**, 245 (1934).

4) *H. E. Stavelly*, *W. Bergmann*, J. Org. Chem. **1**, 567 (1936).

5) *J. Barnett*, *T. Reichstein*, Helv. **21**, 926 (1938).

6) Vgl. die demnächst erscheinende Arbeit von *E. Seebeck* und *T. Reichstein*.

zunächst durch Krystallisation möglichst getrennt und weiter in ihre Methylester (IV) und (IX) übergeführt<sup>1)</sup>. Die bei 192—195° (Zers.) schmelzende, in Nadeln krystallisierende Säure (III) (Hauptprodukt), die relativ leicht zu reinigen ist, gab einen schwer krystallisierbaren Methylester (IV) vom Smp. zirka 65°. Die bei 171—174° (Zers.) schmelzende, in Blättchen krystallisierende Säure (VIII) (Nebenprodukt), die naturgemäss schwer zu reinigen ist, gab einen leicht in Nadeln krystallisierenden Methylester (IX) vom Smp. 78°, der sich daher zur völligen Reinigung trefflich eignet. Beide Bromester können über Aluminiumoxyd ohne wesentliche Zersetzung chromatographiert werden und lassen sich auch so weitgehend trennen und fertig reinigen. Es zeigte sich, dass entsprechend den Beobachtungen von *E. Seebeck* an den analogen 3 $\alpha$ -Acetoxy-11-brom-12-ketoestern<sup>2)</sup> die Bromwasserstoffabspaltung aus den beiden raumisomeren Bromestern ganz verschieden leicht erfolgt. Der Ester (IX) vom Smp. 78° wird schon durch Kochen mit Pyridin völlig entbromt. Der so entstehende 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) stellt das reinste bisher erhaltene Präparat dieses Stoffes dar. Es schmolz bei 89—90°, also fast gleich wie das Präparat von *Barnett* und *Reichstein*, zeigte aber in Hexanlösung ein U. V.-Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 235 m $\mu$  und  $\log \epsilon = 4,07$  (vgl. Figur 1)<sup>3)</sup>, woraus hervorgeht, dass das alte Präparat noch mindestens 38% einer Verunreinigung (wahrscheinlich (II)) enthalten hat. Die Mischprobe von (II) mit (X) gibt keine Schmelzpunktserniedrigung, sodass auch eine relativ grosse Beimischung von (II) in (X), ausser durch die quantitative Auswertung des Spektrums, schwer zu erkennen ist. Der bei etwa 65° schmelzende Ester (IV) blieb beim Kochen mit Pyridin praktisch unverändert. Die Entbromung konnte hingegen, wie früher beschrieben, durch Erhitzen mit Natriumacetat in Eisessig oder durch Kochen mit Kollidin<sup>4)</sup> erreicht werden. In beiden Fällen wurden

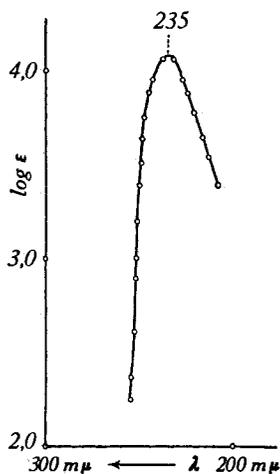


Fig. 1.

$c = 0,00031$  molar in Hexan.

<sup>1)</sup> Dieser mühsame Weg wurde gewählt, weil es sich in der erwähnten Arbeit von *E. Seebeck* gezeigt hatte, dass es bisher nur in dieser Weise möglich ist, zu einem wirklich reinen Präparat des ungesättigten Ketoesters zu gelangen.

<sup>2)</sup> Publikation erfolgt demnächst.

<sup>3)</sup> Diese und die anderen Messungen von U.V.-Absorptionsspektren verdanken wir Herrn P.-D. Dr. *H. Mohler*, Zürich.

<sup>4)</sup> Kollidin ist für ähnliche Zwecke von *A. Butenandt*, *L. Mamoli*, *H. Dannenberg*, *B. 72*, 1617 (1939), vgl. auch *A. Butenandt*, *H. Dannenberg*, *B. 73*, 206 (1940), vorgeschlagen worden.

Präparate erhalten, die zwar auch gut schmolzen, aber in Hexanlösung ein U. V.-Absorptionsspektrum mit einem zu tiefen Maximum ( $\log \epsilon = 3,94$ ) zeigten. Es ist wahrscheinlich, dass solche Präparate etwas gesättigten Ketoester (II) enthalten<sup>1)</sup>, der wie oben erwähnt mit (X) offenbar Mischkrystalle bildet. Bei der energischen Behandlung, die zur Bromwasserstoffabspaltung nötig ist, ist es leicht möglich, dass ein Teil des Broms reduktiv entfernt wird. Nimmt man an, dass leichte Entbromung dann eintritt, wenn das Brom- und das Wasserstoffatom in trans-Stellung zueinander liegen, so ergibt sich die folgende Nomenklatur und Formulierung: Der Ester (IX), der schon beim Kochen mit Pyridin Bromwasserstoff verliert, ist als 11 $\beta$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IX) zu bezeichnen. Das Bromatom liegt also vor der Tafelenebene, da das 9-ständige Wasserstoffatom in den Gallensäuren als hinter der Tafelenebene liegend angenommen wird<sup>2)</sup>, und der Valenzstrich des Broms wird ausgezogen geschrieben. Der Ester (IV), der gegen siedendes Pyridin beständig ist, wird 11 $\alpha$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IV) genannt und der Valenzstrich des hinter der Tafelenebene zu denkenden Broms punktiert gezeichnet.

Bei dieser Gelegenheit soll noch eine Angabe von *Barnett* und *Reichstein*<sup>3)</sup> richtiggestellt werden, wonach sich der Ester (X) mit Platinoxid in Eisessig nicht katalytisch reduzieren lässt. Dies muss auf einer Vergiftung des Katalysators beruhen, denn wir fanden, dass sich der Ester (X) unter den genannten Bedingungen leicht hydrieren lässt, wobei ein Gemisch von Cholansäure-methylester (V) und 12 $\beta$ -Oxy-cholansäure-methylester entsteht. Schlussfolgerungen, die aus der schweren Reduzierbarkeit der Doppelbindung in (X) gezogen wurden<sup>4)</sup>, sind daher aus der Literatur zu streichen.

Leider war die Ausbeute an (VIII) so klein, dass dieses Isomere als Ausgangsmaterial zur Bereitung grösserer Mengen von reinem (X) nicht in Frage kam. Für die meisten weiteren Versuche mussten daher Präparate von (X) dienen, die aus (III) oder aus dem Gemisch von (III) und (VIII) gewonnen wurden, schwächer absorbierten ( $\log \epsilon = 3,85$  und  $3,94$ ) und demnach eine Verunreinigung, wahrscheinlich (II), enthielten.

Zunächst wurden solche Präparate von (X) der Reduktion durch Erhitzen mit Hydrazin und Natriumäthylat auf 170° nach *Wolff-Kishner* unterworfen. Das entstehende Säuregemisch wurde mit Diazomethan methyliert und gab ein Methylestergemisch, aus dem sich durch Umkrystallisieren aus Methanol ein nicht ganz scharf bei

<sup>1)</sup> Nimmt man an, dass das Präparat mit  $\log \epsilon = 4,07$  völlig einheitlich war, so müsste das Präparat mit  $\log \epsilon = 3,94$  etwa 26% (II) enthalten.

<sup>2)</sup> *L. Ruzicka, G. Thomann, Helv. 16, 216 (1933).*

<sup>3)</sup> *Helv. 22, 75 (1938).*

<sup>4)</sup> *C. W. Shoppee, Helv. 23, 740 (1940) u. a.*

etwa 64—68° schmelzendes Krystallisat gewinnen liess, das zwar auf die Formel  $C_{25}H_{40}O_2$  stimmende Analysenwerte lieferte, aber — wie sich aus dem Folgenden ergibt — noch ein Gemisch darstellte und wahrscheinlich zumindest die drei Ester (V), (VI) und (XII) enthielt. Durch Chromatographie konnte zwar eine teilweise Auftrennung erzielt werden; wegen der ungenügenden Kontrollmöglichkeiten durch Schmelzpunktsbestimmungen gelang jedoch keine völlige Reinigung. Die katalytische Hydrierung eines analogen, aber aus reinem (X) gewonnenen Krystallisates (vgl. weiter unten) gab Cholan-säure-methylester (V) (Mischprobe, keine Gelbfärbung mit Tetranitromethan), sodass es zur Hauptsache wohl Stoffe mit unverändertem Steringerüst enthält. Auf die Anwesenheit von Cholen-(9)-säure-methylester (XII) in dem genannten Krystallisat schliessen wir aus der Tatsache, dass sich bei der Oxydation mit Chromsäure der Ester (X) isolieren liess, der wohl kaum aus einem anderen Produkt als aus (XII) entstehen kann. Bei der Einwirkung von Benzopersäure auf das erwähnte Krystallisat vom Smp. 64—68° wurde ein Gemisch erhalten, aus dem sich durch Chromatographie drei Stoffe isolieren liessen, nämlich: Cholan-säure-methylester (V), 11,12-Oxydo-cholan-säure-methylester (VII)<sup>1)</sup>, sowie in guter Ausbeute ein neues Oxyd vom Smp. 75—77°, das einen der zwei theoretisch möglichen 9,11-Oxydo-cholan-säure-methylester (XIII)<sup>2)</sup> darstellen muss. Wir schliessen dies aus der Tatsache, dass das nach der Behandlung mit Benzopersäure erhaltene Gemisch, sowie der daraus isolierte und mit (XII) isomorphe Ester (V) mit Tetranitromethan keine Gelbfärbung mehr gab, also keinen ungesättigten Ester mehr enthielt, sodass der Ester (XII), dessen Anwesenheit im ursprünglichen Krystallisat durch die Bildung von (X) bewiesen wird, mit der Benzopersäure reagiert haben muss.

Eine starke Stütze für diese Schlussfolgerungen gab der folgende Versuch, für den ein Präparat von 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) eingesetzt wurde, dessen U.V.-Absorptionsspektrum in Hexan ein Maximum bei 235 m $\mu$  und  $\log \epsilon = 4,01$  zeigte, das somit relativ rein war. Bei der Reduktion mit Hydrazin und Natrium-äthylat und anschliessender Methylierung wurde daraus ein bei 59—68° schmelzendes Methylestergemisch erhalten. Dieses Krystallisat erwies sich als weitgehend frei von (V) und dürfte zur Hauptsache aus (VI) und (XII) bestanden haben, denn nach Behandlung mit Benzopersäure konnte kein (V), sondern nur noch die beiden Oxydoester (VII) und (XIII) isoliert werden. An reinen Krystallen wurden 19% (VII) und 46% (XIII) gewonnen. Eine Probe des Krystallisates vom Smp. 59—68° wurde mit Platinoxid in Eisessig

<sup>1)</sup> H. B. Alther, T. Reichstein, Helv. **25**, 805 (1942).

<sup>2)</sup> Nur eines derselben enthält noch das wahre Steringerüst, das andere ist in 9-Stellung raumisomer.

hydriert und gab sofort reinen Cholensäure-methylester (V), woraus hervorgeht, dass das Krystallinat vom Smp. 59—68° im wesentlichen aus Stoffen mit unverändertem Ringsystem besteht. Die gute Ausbeute an (XIII) zeigt ferner, dass es etwa 50% oder mehr an (XII) enthält.

Schliesslich wurde noch das Verhalten von (XIII) gegen Mineralsäure geprüft. Beim Kochen mit wässriger Schwefelsäure in Methanol und Remethylierung wurde ein Ester vom Smp. 88—90° erhalten, dessen Analysenwerte gut auf die Bruttoformel  $C_{25}H_{38}O_2$  passen und der, in Hexan gelöst, im U.V. starke selektive Absorption zeigte mit einem Maximum bei 245 m $\mu$  und  $\log \epsilon = 4,13$ . Es lag somit möglicherweise ein Choladiensäure-methylester vor. Gegen die nächstliegende Annahme, dass ihm die Formel (XIV) zukommt, spricht die Lage des Maximums, da zwei in einem Ring gelegene, konjugierte Doppelbindungen meist eine langwelligere Absorption ergeben<sup>1)</sup>. Es könnte sich vielleicht um den 1<sup>7-8, 9-11</sup>-Ester handeln, doch ist bisher nicht bewiesen, dass der Stoff noch das unveränderte Steringerüst besitzt.

#### Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die Bereitung von reinem 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) ist schwierig, da die meisten Präparate eine kaum zu entfernende Verunreinigung, wahrscheinlich 12-Keto-cholensäure-methylester (II), enthalten. Das beste Kriterium für die Reinheit ist die Höhe des U.V.-Absorptionsmaximums. Es wird die Gewinnung eines Präparates beschrieben, dessen Ultraviolett-Absorptionsspektrum in Hexanlösung bei 235 m $\mu$  liegt und einen  $\log \epsilon = 4,97$  besitzt, und das voraussichtlich weitgehend einheitlich ist. Die Gewinnung solcher Präparate war bisher nur möglich durch Isolierung des 11 $\beta$ -Brom-12-keto-cholensäure-methylesters und seine Verkochung mit Pyridin. Die Reduktion von solchem reinen 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) nach *Wolff-Kishner* gibt ein Gemisch von Cholen-(11)-säure und Cholen-(9)-säure (XI), in dem letztere überwiegt, die sich aber auch in Form ihrer Methylester (VI) und (XII) bisher nicht trennen liessen. Durch Überführung des Methylestergemisches in die zugehörigen Oxyde und deren Trennung lässt sich der Gehalt ungefähr bestimmen. Reduktion von unreinen Präparaten von (X) nach *Wolff-Kishner* gibt Gemische, die ausser den zwei genannten Cholen-säuren noch Cholensäure enthalten, von der sich die zwei ungesättigten Säuren auch in Form der Methylester bisher nicht glatt trennen liessen. Die Komponenten lassen sich auch in solchen ternären Gemischen nach Behandlung mit Benzopersäure nachweisen.

<sup>1)</sup> Lit. vgl. *H. Dannenberg*, Abh. Preuss. Akad. Wiss. **1939**, Math.-naturwiss. Kl. Nr. 21.

### Experimenteller Teil.

Alle Schmelzpunkte sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert (Fehlergrenze ca.  $\pm 2^\circ$ ).

#### 12-Keto-cholansäure-methylester (II).

20 g des nach der vereinfachten Vorschrift von *Alther* und *Reichstein*<sup>1)</sup> bereiteten 12 $\beta$ -Oxy-cholansäure-methylesters wurden in 80 cm<sup>3</sup> gegen Chromsäure beständigem Eisessig gelöst, unter Wasserkühlung mit der Lösung von 8 g Chromtrioxyd (1,6 Mol) in 8 cm<sup>3</sup> Wasser und 50 cm<sup>3</sup> Eisessig versetzt und 14 Stunden bei 18<sup>o</sup> stehen gelassen. Hierauf wurde im Vakuum bei 30<sup>o</sup> Badtemperatur auf etwa 50 cm<sup>3</sup> eingengt, mit Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die mit verdünnter Schwefelsäure, Sodalösung und Wasser gewaschene und über Natriumsulfat getrocknete Ätherlösung wurde eingedampft und der Rückstand aus Methanol umkrystallisiert, wobei 18 g farblose Blättchen resultierten, die bei 106–108<sup>o</sup> schmolzen. Zur Analyse wurde eine Probe nochmals aus Methanol umkrystallisiert und gab farblose Blättchen vom Smp. 107–108<sup>o</sup>, die im Hochvakuum bei 80<sup>o</sup> getrocknet wurden. Die spez. Drehung betrug:  $[\alpha]_D^{16} = +87,7^0 \pm 1^0$  (c = 2,024 in Aceton)<sup>2)</sup>.

20,670 mg Subst. zu 1,0125 cm<sup>3</sup>; l = 1 dm;  $\alpha_D^{16} = +1,79^0 \pm 0,02^0$

4,026 mg Subst. gaben 11,38 mg CO<sub>2</sub> und 3,68 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub> (388,57) Ber. C 77,27 H 10,38%

Gef. „ 77,14 „ 10,23%

Der Ester ist, soweit wir übersehen können, erstmals von *Barnett* und *Reichstein*<sup>3)</sup> beschrieben, aber nicht analysiert worden. Er wurde in unserem Institut öfters auf verschiedenen Wegen bereitet und schmolz immer bei ca. 107<sup>o</sup>. Vor einigen Jahren ist von *Ohta*<sup>4)</sup> angegeben worden, dass derselbe Stoff aus Methanol in Blättchen krystallisieren soll, die bei 152<sup>o</sup> schmelzen. Eine solche Form ist uns nie begegnet.

#### Bromierung von 12-Keto-cholansäure und Trennung der Isomeren.

Zur Bereitung der 12-Keto-cholansäure (I) wurde der 12-Keto-cholansäure-methylester (II) in üblicher Weise durch kurzes Kochen mit methylalkoholischer Kalilauge verseift. Die Bromierung der 12-Keto-cholansäure (I) gelang *Barnett* und *Reichstein*<sup>3)</sup> nur nach der älteren Vorschrift von *Wieland* und *Posternak*<sup>5)</sup>, die etwa 3 Mol Brom anwenden, während die spätere Vorschrift von *Wieland* und *Dane*<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> H. B. Alther, T. Reichstein, Helv. **25**, 805 (1942).

<sup>2)</sup> Von Hrn. Dr. H. Reich bestimmt.

<sup>3)</sup> J. Barnett, T. Reichstein, Helv. **21**, 933 (1938).

<sup>4)</sup> K. Ohta, Z. physiol. Ch. **259**, 53 (1939).

<sup>5)</sup> H. Wieland, T. Posternak, Z. physiol. Ch. **197**, 20 (1931).

<sup>6)</sup> H. Wieland, E. Dane, Z. physiol. Ch. **216**, 99 (1933).

keine brauchbaren Resultate lieferte. Dieser Widerspruch liess sich auf die Verwendung von gewöhnlichem Eisessig zurückführen. Benützt man reinen, gegen Chromsäure beständigen Eisessig, so gibt die Methode von *Wieland* und *Dane* gute Resultate. Wir geben nachstehend eine wenig modifizierte Vorschrift, die sich stets gut reproduzieren liess:

8,6 g 12-Keto-cholansäure vom Smp. 190—192° wurden im Vakuum bei 80° gut getrocknet, in einem Rundkolben mit eingeschliffenem Rückflusskühler in 86 cm<sup>3</sup> Eisessig (gegen Chromsäure beständig) gelöst und mit drei Tropfen 30-proz. Bromwasserstoff-Eisessiglösung versetzt. Bei einer Badtemperatur von 72—76° wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durch einen durch den Kühler bis auf den Boden des Kolbens reichenden Tropftrichter im Verlauf von 2 Stunden die Lösung von 1,8 cm<sup>3</sup> (= 5,5 g entspr. 1,5 Mol) Brom in 14 cm<sup>3</sup> Eisessig zugetropft, wobei öfters umgeschwenkt wurde. Die Bromwasserstoffabspaltung war schon nach 30 Minuten recht kräftig. Nach beendetem Eintropfen wurde noch 4—5 Stunden bei der angegebenen Temperatur gehalten. Hierauf wurde die hellbraune, klare Lösung im Vakuum bei 30° Badtemperatur vollständig eingedampft, der Rückstand in viel Äther gelöst, die Lösung mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und stark eingeengt, wobei bald Krystallisation eintrat. Die abgenutzten und mit Äther gewaschenen Krystalle schmolzen bei 189—193° und wogen 3,8 g. Durch Einengen konnten noch weitere Mengen von annähernd derselben Reinheit gewonnen werden. Unschärf schmelzende Fraktionen wurden für sich nochmals aus Äther umkrystallisiert. Es ist wichtig, auf diese Weise die hochschmelzende  $\alpha$ -Form möglichst vollständig abzutrennen, um die Gewinnung der  $\beta$ -Form zu erleichtern. Im ganzen wurden 5,2 g der hochschmelzenden  $\alpha$ -Form erhalten.

Die ätherischen Mutterlaugen wurden hierauf eingedampft (40—50° Badtemperatur), der Rückstand im Vakuum ganz von Äther befreit und vor Einsetzen der Krystallisation in wenig Eisessig gelöst, worauf bald Krystallisation eintrat. Die abgenutzten Krystalle wurden mit wenig Eisessig gewaschen und im Vakuum getrocknet. Sie wogen 2,3 g, schmolzen bei 159—176° und stellten die rohe  $\beta$ -Form dar.

### 11 $\alpha$ -Brom-12-keto-cholansäure (III).

Die bei der Krystallisation aus Äther erhaltene, hochschmelzende Säure wurde zur Reinigung nochmals aus sehr viel Äther durch Einengen umkrystallisiert und in farblosen, sechseckigen Blättchen vom Smp. 196—197° (Zers.) erhalten. Aus Eisessig krystallisierte sie in Nadeln. Die spez. Drehung betrug  $[\alpha]_D^{15} = +31,9^{\circ} \pm 2^{\circ}$  ( $c = 2,18$  in Chloroform).

22,115 mg Subst. zu 1,0125 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{15} = +0,68^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$

11 $\alpha$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IV).

Eine Probe der 11 $\alpha$ -Brom-12-keto-cholansäure (III) vom Smp. 196—197° wurde in Äther gelöst, mit überschüssiger ätherischer Diazomethanlösung versetzt und 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde stark eingeeengt, die Ätherlösung mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde mit etwas Petroläther versetzt, wobei nicht alles in Lösung ging, und mehrere Tage bei 0° stehen gelassen, wobei langsam Krystallisation unter Bildung von groben Blöcken eintrat, die gut mit kaltem Petroläther gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden. Die Krystalle schmolzen hierauf bei 58—63°. Zur Reinigung wurde in wenig Äther gelöst, die filtrierte Lösung mit Methanol versetzt, der Äther im Vakuum entfernt und die verbleibende Lösung nach Animpfen längere Zeit bei -10° stehen gelassen, wobei wiederum sehr langsam Krystallisation eintrat. Die mit vorgekühltem Methanol gewaschenen und im Vakuum getrockneten Krystalle (Prismen) schmolzen bei 60—64°. Die Krystalle wurden nochmals in wenig Äther gelöst, die filtrierte Lösung im Vakuum eingedampft, der amorphe Rückstand in Petroläther gelöst, angeimpft und bei -10° stehen gelassen. Der wiederum sehr langsam auskrystallisierende Ester schmolz nicht besser. Die spez. Drehung betrug:  $[\alpha]_D^{19} = +26,6^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 2,107$  in Aceton).

21,054 mg Subst. zu 0,9994 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{19} = +0,56^\circ \pm 0,03^\circ$

Zur Analyse wurde 2 Stunden im Hochvakuum bei 30° getrocknet.

4,260 mg Subst. gaben 10,05 mg CO<sub>2</sub> und 3,18 mg H<sub>2</sub>O

7,222 mg Subst. gaben 2,874 mg AgBr

C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> O <sub>3</sub> Br (467,48)	Ber. C 64,23	H 8,41	Br 17,09%
	Gef. .. 64,39	.. 8,35	.. 16,93%

11 $\beta$ -Brom-12-keto-cholansäure (VIII).

Die 2,3 g der rohen  $\beta$ -Form vom Smp. 159—176° wurden zur Reinigung in Äther gelöst, die filtrierte Lösung mit 2 cm<sup>3</sup> Eisessig versetzt und im Vakuum von Äther befreit. Die so erhaltene klare Eisessiglösung wurde mit einem ausgesuchten reinen Krystallblättchen der  $\beta$ -Form geimpft, worauf rasch Krystallisation eintrat. Die abgenutzten und mit wenig Eisessig gewaschenen Krystalle wurden nochmals analog umkrystallisiert und hierauf im Vakuum getrocknet. Sie stellten farblose, rautenförmige Blättchen dar, die bei 171—174° (Zers.) schmolzen. Die Ausbeute betrug 0,5 g. Die Mutterlauge wird zweckmässig über den Methylester gereinigt. Die Mischprobe mit der bei 196—197° schmelzenden  $\alpha$ -Form schmolz bei 161—172°. Die spez. Drehung betrug:  $[\alpha]_D^{15} = +16,3^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,96$  in Chloroform).

19,626 mg Subst. zu 0,9994 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{15} = +0,32^\circ \pm 0,03^\circ$

11 $\beta$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IX).

a) Aus reiner  $\beta$ -Säure (VIII). 0,5 g der reinen  $\beta$ -Säure vom Smp. 171—174° (Zers.) wurden in Äther gelöst und mit überschüssiger ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach viertelstündigem Stehen wurde etwas eingengt, hierauf mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand krystallisierte leicht aus Äther-Petroläther oder aus Methanol, wobei in beiden Fällen farblose, an den Enden schief abgeschnittene Stäbchen erhalten wurden, die bei 77—79° schmolzen. Die spez. Drehung betrug:  $[\alpha]_D^{17} = +19,8^{\circ} \pm 2^{\circ}$  (c = 2,12 in Aceton):

21,143 mg Subst. zu 0,9994 cm<sup>3</sup>; l = 1 dm;  $\alpha_D^{17} = +0,42^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$

Zur Analyse wurde 2 Stunden im Hochvakuum bei 65° getrocknet.

3,783 mg Subst. gaben 8,87 mg CO<sub>2</sub> und 2,78 mg H<sub>2</sub>O

6,712 mg Subst. gaben 2,676 mg AgBr

C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> O <sub>3</sub> Br (467,48)	Ber. C 64,23	H 8,41	Br 17,09%
	Gef. „ 63,99	„ 8,23	„ 16,96%

Die Mischprobe mit dem bei 60—64° schmelzenden  $\alpha$ -Ester (IV) schmolz bei 56—74°.

b) Aus unreiner  $\beta$ -Säure (VIII). Die verbleibenden Mutterlaugen der 11 $\beta$ -Brom-12-keto-cholansäure (VIII) vom Smp. 159 bis 174° wurden analog mit Diazomethan methyliert. Der erhaltene amorphe Methylester wurde nach der Durchlaufmethode über 30 Teile Aluminiumoxyd chromatographisch getrennt. Die ersten mit Petroläther-Benzol-Gemischen eluierbaren Anteile lieferten noch reichliche Mengen des gut krystallisierenden  $\beta$ -Esters (IX) vom Smp. 77—79°. Die weiteren mit Petroläther-Benzol-Gemischen von steigendem Benzolgehalt eluierbaren Anteile enthielten zur Hauptsache den  $\alpha$ -Ester, der sich aber infolge seiner schlechten Krystallisierbarkeit nur schwer auf diesem Wege rein erhalten liess.

12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X).

a) Reinstes Produkt aus 11 $\beta$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IX). 1,1 g 11 $\beta$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IX) vom Smp. 77—79° wurden mit 5 cm<sup>3</sup> absolutem Pyridin 3 Stunden unter Rückfluss gekocht (Badtemperatur 150°). Hierauf wurde das Pyridin im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit verdünnter Schwefelsäure und Äther in einen Scheidetrichter gespült. In der abgetrennten sauren Schicht liessen sich reichlich Bromionen nachweisen. Die ätherische Lösung wurde mehrmals mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde im Molekular Kolben bei 0,005 mm Druck und 170° Badtemperatur destilliert und

das Destillat dreimal aus Methanol umkrystallisiert, wobei 650 mg farbloser Nadeln erhalten wurden, die bei 89–90° schmolzen und im U. V.-Absorptionsspektrum in Hexan ein Maximum bei 235 m $\mu$  und  $\log \varepsilon = 4,07$  zeigten. (Vgl. Theoretischer Teil.) Die spez. Drehung betrug:  $[\alpha]_D^{20} = +93,1^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 2,32$  in Methanol).

23,197 mg Subst. zu 0,9994 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{20} = +2,16^\circ \pm 0,03^\circ$

Die Mischprobe mit dem bei 108° schmelzenden 12-Keto-cholansäure-methylester (II) schmolz bei 88–100°. Die Substanz gab, in wenig Chloroform gelöst, mit Tetranitromethan keine Gelbfärbung. Zum Unterschied von weniger reinen Präparaten schied sich dieser reine Ester bei langsamer Krystallisation aus Methanol immer in Nadeln aus. Lediglich durch plötzliches Abkühlen der stark verdünnten Lösung in Methanol auf –80° liess sich öfters auch eine in Blättchen krystallisierende Modifikation gewinnen, die bei etwa 72–74° schmolz, bei weiterem Erwärmen aber meist sofort rekrystallisierte, um bei 88–90° definitiv zu schmelzen. Liegt einmal etwas reine Blättchenform vor, so lässt sie sich wieder erhalten, wenn die auf etwa –40° unterkühlte Methanollösung damit angeimpft wird. Erneutes Umkrystallisieren der Blättchen aus Methanol bei nicht zu tiefer Temperatur gab stets wieder die Nadelform. Unreine Präparate von (X) lieferten hingegen auch bei langsamer Krystallisation oft bevorzugt und spontan die Blättchenform, die sich oft sogar nach Animpfen mit der Nadelform abschied.

b) Aus 11 $\alpha$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IV).

1. Verkochungsversuch mit Pyridin. 100 mg 11 $\alpha$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IV) vom Smp. 59–64° wurden mit 1 cm<sup>3</sup> Pyridin 3 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Eindampfen im Vakuum wurde mit Äther und verdünnter Schwefelsäure in einen Scheidetrichter gespült. In der schwefelsauren Schicht konnten keine Bromionen nachgewiesen werden. Die Ätherlösung lieferte nach Waschen mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser, sowie Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen einen Rückstand, der 95 mg wog und aus Petroläther nach langem Stehen bei 0° Krystalle vom Smp. 58–64° lieferte, die sich als unverändertes Ausgangsmaterial erwiesen.

2. Durch Kochen mit Kollidin. 835 mg 11 $\alpha$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IV) wurden zur völligen Trocknung kurz im Vakuum auf 100° erwärmt und dann mit 4,5 cm<sup>3</sup> frisch destilliertem Kollidin 5 Stunden unter Rückfluss gekocht (Ölbad 215°). Bei der wie oben durchgeführten Aufarbeitung konnten in der schwefelsauren Waschlösung reichlich Bromionen nachgewiesen werden. Die neutral gewaschene und getrocknete Ätherlösung hinterliess 640 mg Rohprodukt, das nach Umkrystallisieren aus Methanol meist

farblose Blättchen lieferte, die bei 75—77° schmolzen, dann wieder kristallisierten, um bei 85—88° definitiv zu schmelzen. Auch die Nadelform konnte gelegentlich erhalten werden. Beide gaben unter sich und bei der Mischprobe mit dem reinsten aus (IX) bereiteten Präparat keine Schmelzpunkterniedrigung. Im U. V.-Absorptionsspektrum in Hexan wurde das Maximum bei 233 m $\mu$  und log  $\epsilon$  = 3,94 gefunden.

3. Durch Erhitzen mit Natriumacetat. 100 mg 11 $\alpha$ -Brom-12-keto-cholansäure-methylester (IV) vom Smp. 59—64° wurden nach der Vorschrift von *Barnett* und *Reichstein*<sup>1)</sup> behandelt und lieferten ebenfalls den Ester (X), der erst nach mehrmaligem Umkrystallisieren gut schmolz.

c) Aus dem Gemisch der Isomeren (IV) und (IX). 2,6 g eines Methylestergemisches der beiden Isomeren (IV) und (IX), das zur Hauptsache die  $\alpha$ -Form enthielt, wurden mit 18 cm<sup>3</sup> Kollidin verkocht und lieferten 1,94 g Rohprodukt, das aus Methanol zur Hauptsache wieder die Blättchenform vom Smp. 75—77° und 85—88° lieferte. Nur eine kleine Menge Nadeln, die direkt bei 84—86° schmolzen, wurde erhalten. Die Blättchenform gab bei der Mischprobe mit dem reinsten aus (IX) gewonnenen Produkt wiederum keine Schmelzpunktserniedrigung und bei der Analyse stimmende Werte.

3,828 mg Subst. gaben 10,906 mg CO<sub>2</sub> und 3,407 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub> (386,56)	Ber. C 77,67	H 9,91%
	Gef. „ 77,75	„ 9,96%

Wie sich jedoch aus dem Spektrum ergibt, war dieses Präparat relativ unrein. Das Maximum in Hexanlösung lag bei 235 m $\mu$  und log  $\epsilon$  = 3,85.

#### 12-Keto-cholen-(9)-säure.

25 mg reiner 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) wurden mit der Lösung von 30 mg Kaliumhydroxyd in 50 mg Wasser und 1,5 cm<sup>3</sup> Methanol 30 Minuten unter Rückfluss gekocht. Nach Zusatz von Wasser wurde das Methanol im Vakuum entfernt, der Rückstand mit viel Salzsäure versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschene und über Natriumsulfat getrocknete Ätherlösung hinterliess beim Eindampfen 24 mg Rückstand, der nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Petroläther farblose Krystalldrusen lieferte, die bei 145—146° schmolzen. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

3,710 mg Subst. gaben 10,532 mg CO<sub>2</sub> und 3,254 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub> (372,53)	Ber. C 77,37	H 9,74%
	Gef. „ 77,47	„ 9,81%

<sup>1)</sup> *J. Barnett, T. Reichstein, Helv. 21, 934 (1938).*

### Hydrierung von 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X).

40 mg reinster, aus (IX) gewonnener 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) vom Smp. 89—90° wurden mit 15 mg Platinoxid in 3 cm<sup>3</sup> reinstem Eisessig hydriert. Die Gasaufnahme war schon nach einer Stunde beendet, doch wurde im ganzen 3 Stunden geschüttelt. Nach Filtration wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther aufgenommen, die Lösung mit verdünnter Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Da der Rückstand sehr unscharf schmolz, wurde er nach der Durchlaufmethode über 1 g Aluminiumoxyd chromatographisch getrennt. Die ersten mit Petroläther eluierbaren Anteile schmolzen bei 81° und erwiesen sich nach Mischprobe als identisch mit Cholan-säure-methylester (V). Die weiteren mit Petroläther-Benzol eluierbaren Anteile lieferten aus Methanol flache, gerade abgeschnittene Blättchen vom Smp. 117—119°. Die Mischprobe mit 12 $\beta$ -Oxy-cholansäure-methylester vom Smp. 120° gab keine Schmelzpunkts-erniedrigung. Diese Krystalle und die zugehörigen Mutterlaugen (zusammen 25 mg) wurden in 0,5 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und nach Zusatz von 3 cm<sup>3</sup> 2-proz. Chromtrioxyd-Eisessiglösung 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die übliche Aufarbeitung lieferte 22 mg Rückstand, der aus Methanol in farblosen Blättchen vom Smp. 105—107° kristallisierte. Die Mischprobe mit 12-Keto-cholan-säure-methylester (Smp. 107°) gab keine Schmelzpunktserniedrigung. Im U. V.-Absorptionsspektrum wurden keine Messpunkte gefunden, die ungesättigtem Ester entsprechen würden.

### Reduktion von 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) mit Hydrazin und Natriumäthylat.

a) Von unreinem 12-Keto-cholen-(9)-säure-methyl-ester (X). 0,9 g 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) (Präparat der Blättchenform vom Smp. 75—77° und 85—88°, das im U. V.-Absorptionsspektrum in Hexan ein Maximum bei 235 m $\mu$  und  $\log \epsilon = 3,85$  zeigte) wurden mit 4,5 cm<sup>3</sup> Hydrazinhydrat und 18 cm<sup>3</sup> einer frisch aus 1 g Natrium und 20 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol bereiteten Natriumäthylatlösung vermischt, in einem Bombenrohr im Vakuum eingeschmolzen und 14 Stunden auf 175° erhitzt. Nach Abkühlen und Öffnen des Rohres wurde merklicher Gasdruck festgestellt. Der Inhalt wurde im Vakuum von Äthanol befreit, der Rückstand mit verdünnter Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt, mit Äther ausgeschüttelt, die Lösung mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Es verblieben 800 mg rohe Säure, die in Äther gelöst und mit ätherischer Diazomethanlösung 15 Minuten methyliert wurde. Hierauf wurde mit verdünnter Salzsäure, Soda-

lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, eingedampft und zweimal aus Methanol umkrystallisiert, wobei 500 mg lange Nadeln vom Smp. 65—68° resultierten. In der Mutterlauge verblieben 266 mg amorphes Material. Die Krystalle gaben, in wenig Chloroform gelöst, mit Tetranitromethan eine deutliche Gelbfärbung. Die spez. Drehung betrug:  $[\alpha]_D^{21} = +32,9^{\circ} \pm 2^{\circ}$  ( $c = 1,882$  in Aceton).

18,80 mg Subst. zu  $0,9994 \text{ cm}^3$ ;  $l = 1 \text{ dm}$ ;  $\alpha_D^{21} = +0,62^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$

Die Mischprobe mit Cholen-(11)-säure-methylester vom Smp. 59 bis 61° schmolz bei etwa 55°, diejenige mit Cholansäure-methylester (85°) bei 68—82°. Zur Analyse wurde 2 Stunden im Hochvakuum bei 60° getrocknet.

2,836 mg Subst. gaben 8,335 mg CO<sub>2</sub> und 2,902 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> (372,57)	Ber. C	80,59	H	10,82%
C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> (374,59)	Ber. „	80,16	„	11,30%
	Gef. „	80,24	„	11,45%

b) Von fast reinem 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X). 650 mg eines Präparates der Nadelform des 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylesters, dessen U.V.-Absorptionsspektrum in Hexan ein Maximum mit einem  $\log \epsilon = 4,01$  zeigte, der also relativ rein war, wurde analog mit Hydrazin und Alkali reduziert. Der aus dem Reduktionsgemisch mit Diazomethan bereitete Methylester (490 mg) wurde chromatographisch über Aluminiumoxyd gereinigt und gab 380 mg mit Petroläther leicht eluierbare Anteile und daraus durch Umkrystallisieren aus Methanol 200 mg farbloser Krystalle vom Smp. 59—68°. Das Produkt gab, in wenig Chloroform gelöst, mit Tetranitromethan eine deutliche Gelbfärbung. Zur Analyse wurde im Schiffehen im Hochvakuum bei 70° getrocknet.

3,144 mg Subst. gaben 9,293 mg CO<sub>2</sub> und 3,019 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> (372,57)	Ber. C	80,59	H	10,82%
	Gef. „	80,66	„	10,74%

Cholansäure-methylester (V) aus (VI) und (XII).

35 mg des obigen Krystallisates vom Smp. 59—68° (aus Versuch b)) wurden in 3 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und nach Zusatz von 10 mg Platinoxid in Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Nach 20 Minuten waren 3,9 cm<sup>3</sup> Wasserstoff aufgenommen. Obwohl eine weitere Gasaufnahme nicht beobachtet werden konnte, wurde zur Sicherheit noch 12 Stunden weiter geschüttelt. Nach Filtration wurde eingedampft, der Rückstand in Äther gelöst, die Lösung mit verdünnter Sodaaufnahme und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (31 mg) lieferte nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Methanol farblose Nadeln, die bei 83—85° schmolzen und mit Tetranitromethan keine Gelbfärbung mehr gaben. Die Mischprobe mit Cholansäure-methylester (V) (Smp. 84—85°) gab keine Schmelzpunktserniedrigung.

12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) aus (XII).

60 mg des Krystallisates vom Smp. 64—68° (roher Cholen-(9)-säure-methylester (XII) aus Versuch a)) wurden mit 1,2 cm<sup>3</sup> 2-proz. Chromtrioxyd-Eisessiglösung (= 24 mg CrO<sub>3</sub>) 20 Stunden bei 20° stehen gelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit Wasser versetzt, mit Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösung mit verdünnter Schwefelsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (51 mg) wurde über 1,5 g Aluminiumoxyd nach der Durchlaufmethode chromatographisch getrennt. Die ersten mit Petroläther eluierbaren Anteile lieferten aus Methanol prismatische Krystalle, die bei 62—64° schmolzen und mit dem Ausgangskrystallisat bei der Mischprobe keine Schmelzpunktserniedrigung gaben. Die weiteren mit Benzol eluierbaren Anteile, welche die Hauptmenge darstellten, krystallisierten aus Methanol in Blättchen, die bei 74° schmolzen, hierauf wieder erstarrten, um bei 85—87° erneut zu schmelzen. Die Mischprobe mit 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylester (X) gab keine Schmelzpunktserniedrigung. Die Mischprobe mit dem Krystallisat vom Smp. 64—68° schmolz bei 63—74°. Im U. V.-Absorptionsspektrum (Hexanlösung) wurde ein Maximum bei 235 m $\mu$  und log  $\epsilon$  = 3,85 gefunden, also ähnlich wie bei den nicht ganz reinen Präparaten von (X). Zur Analyse wurde unmittelbar vor der Verbrennung im Vakuum bei 85° geschmolzen.

3,735 mg Subst. gaben 10,617 mg CO<sub>2</sub> und 3,319 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>25</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub> (386,56)	Ber. C 77,67	H 9,91%
	Gef. „ 77,57	„ 9,94%

9,11-Oxydo-cholansäure-methylester (XIII).

1) Aus Krystallisat vom Smp. 64—68° aus Versuch a).

500 mg des Krystallisates vom Smp. 64—68° (roher Cholen-(9)-säure-methylester (XII) aus Versuch a)) wurden mit 5,24 cm<sup>3</sup> einer Lösung von 372 mg (= 2 Mol) Benzopersäure in Chloroform versetzt und 16 Stunden im Dunkeln bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde mit verdünnter Essigsäure und Kaliumjodid versetzt und in üblicher Weise mit Natriumthiosulfatlösung titriert, wobei sich ein Verbrauch von 1,1 Mol Benzopersäure ergab. Das austitrierte Gemisch wurde mit Wasser und Äther in einen Scheidetrichter gespült, die Ätherlösung mehrmals mit verdünnter Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (540 mg) liess sich aus Methanol leicht krystallisieren, doch erwies es sich als besser, die ganze Menge über Aluminiumoxyd (18 g) nach der Durchlaufmethode chromatographisch zu trennen. Die ersten mit Petroläther eluierbaren Anteile lieferten beim Umkrystallisieren aus Methanol flache Nadeln vom Smp. 84—85°, die

sich nach Mischprobe und Analyse als Cholansäure-methylester (V) erwiesen. Sie gaben, in wenig Methanol gelöst, auf Zusatz von Tetranitromethan keine Gelbfärbung. Zur Analyse wurde eine Probe 2 Stunden im Hochvakuum bei 70° getrocknet.

3,605 mg Subst. gaben 10,634 mg CO<sub>2</sub> und 3,549 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub> (374,59) Ber. C 80,16 H 11,30%  
 Gef. „ 80,50 „ 11,02%

Die weiteren mit Benzol-Petroläther (1:4) eluierbaren Anteile lieferten beim Umkrystallisieren aus Methanol 100 mg farblose gerade abgeschnittene Nadeln vom Smp. 72—74°. Die Substanz gab, in wenig Chloroform gelöst, auf Zusatz von Tetranitromethan keine Gelbfärbung. Die Mischprobe mit Cholansäure-methylester vom Smp. 84—85° gab keine eindeutige Schmelzpunktserniedrigung, ebensowenig diejenige mit 11,12-Oxydo-cholansäure-methylester vom Smp. 97—98°. Hingegen gab die Mischprobe mit der Blättchenform des 12-Keto-cholen-(9)-säure-methylesters vom Smp. 74—76° eine kleine, aber deutliche Erniedrigung; die Mischung schmolz bei 67 bis 70°. Zur Analyse wurde das Material nochmals aus Methanol umkrystallisiert und im Hochvakuum 2 Stunden bei 64° getrocknet. Es schmolz hierauf bei 74,5—76° und zeigte die spez. Drehung:  $[\alpha]_D^{13} = +18,8^\circ \pm 2^\circ$  (c = 1,437 in Aceton).

14,366 mg Subst. zu 0,9994 cm<sup>3</sup>; l = 1 dm;  $\alpha_D^{13} = +0,27^\circ \pm 0,02^\circ$

3,674 mg Subst. gaben 10,405 mg CO<sub>2</sub> und 3,431 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub> (388,57) Ber. C 77,27 H 10,38%  
 Gef. „ 77,29 „ 10,45%

Diese Krystallé dürften somit den 9,11-Oxydo-ester (XIII) darstellen.

Die weiteren mit Petroläther-Benzol-Gemischen von über 20% Benzolgehalt eluierbaren Anteile lieferten nach Umkrystallisieren aus Methanol 11,12-Oxydo-cholansäure-methylester vom Smp. 97 bis 98° (Mischprobe).

Auch die 266 mg amorphe Mutterlaugen des Rohkrystallisates vom Smp. 65—68° (roher Cholen-(9)-säure-methylester (XII)) wurden analog mit Benzopersäure oxydiert und lieferten bei der Chromatographie zunächst dieselben drei Stoffe. Ein weiterer Stoff wurde noch aus den mit Benzol-Äther eluierbaren Fraktionen erhalten. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Äther-Petroläther bildete er lange, farblose Nadeln, die bei 140—143° schmolzen. Zur Analyse wurde 2 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

3,663 mg Subst. gaben 9,986 mg CO<sub>2</sub> und 3,186 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> (402,55) Ber. C 74,59 H 9,51%  
 Gef. „ 74,40 „ 9,73%

Nach der Analyse könnte es sich um ein Dioxyd oder ein Keto-oxyd handeln, das seine Entstehung einer doppelt ungesättigten Verbindung im Rohkrystalliat verdankt.

2) Aus Krystallisat vom Smp. 59—68° aus Versuch b).

125 mg des Krystallisates vom Smp. 59—68° (aus Versuch b)) wurden mit der Lösung von 125 mg Benzopersäure in 5 cm<sup>3</sup> Chloroform 16 Stunden bei 20° stehen gelassen. Die wie oben beschrieben durchgeführte Aufarbeitung gab nach chromatographischer Trennung 60 mg reinen 9,11-Oxydo-ester (XIII) vom Smp. 72—74° und 25 mg 11,12-Oxydo-ester (VII) vom Smp. 96—98°. Aus den ersten mit Petroläther eluierten Anteilen wurden daneben 23 mg öliges Material erhalten, aus dem sich etwas Krystalle abschieden, die bei 51—55° schmolzen. Cholansäure-methylester konnte daraus nicht isoliert werden.

#### Behandlung von 9,11-Oxydo-cholansäure-methylester (XIII) mit wässriger Schwefelsäure.

50 mg 9,11-Oxydo-cholansäure-methylester (XIII) vom Smp. 72—74° wurden in einem Rundkolben mit eingeschliffenem Rückflusskühler mit 0,2 cm<sup>3</sup> einer Mischung gleicher Gewichtsteile Wasser und konz. Schwefelsäure versetzt. Hierauf wurde so viel Methanol zugegeben, dass in der Siedehitze eben klare Lösung eintrat und diese 30 Minuten unter Rückfluss gekocht. Nach Verdünnen mit Wasser wurde das Methanol im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Äther ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach 15 Minuten wurde mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand krystallisierte aus Methanol in rechteckigen Blättchen vom Smp. 88—90°. Zur Analyse wurde 1 Stunde im Hochvakuum bei 60° getrocknet.

2,500 mg Subst. gaben 7,415 mg CO<sub>2</sub> und 2,322 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> (370,56)	Ber. C 81,02	H 10,34%
	Gef. „ 80,94	„ 10,39%

Die Substanz gibt, in wenig Chloroform gelöst, auf Zusatz von Tetranitromethan eine starke Braunfärbung. Das U. V.-Absorptionsspektrum in Hexan zeigte ein Maximum bei 245 m $\mu$  und  $\log \epsilon = 4,13$ . Die Mischprobe mit Cholansäure-methylester vom Smp. 84—85° schmolz bei 75—83°.

#### Einwirkung von Eisessig auf 9,11-Oxydo-cholansäure-methylester (XIII).

50 mg 9,11-Oxydo-cholansäure-methylester (XIII) vom Smp. 72—74° wurden mit 0,5 cm<sup>3</sup> reinem Eisessig 3 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Eindampfen im Vakuum wurde mit Wasser versetzt, mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung mit Wasser

gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und mit ätherischer Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach 15 Minuten wurde mit verdünnter Salzsäure, Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand lieferte aus Petroläther etwa 5 mg kurze Prismen vom Smp. 184–198°. Das Produkt ist nicht weiter untersucht worden.

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich (Leitung *H. Gubser*) ausgeführt.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

## 56. Über Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandte Stoffe.

59. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Pregnen-(4)-ol-(21)-trion-(3, 12, 20) und Pregnen-(4)-diol-(12 $\beta$ , 21)-dion-(3, 20)

von *H. G. Fuchs* und *T. Reichstein*.

(9. II. 43.)

Von den sechs aus Nebennieren isolierten Steroiden, die das Leben nebennierenloser Ratten zu erhalten vermögen<sup>2)</sup>, zeigen insbesondere diejenigen Vertreter starke Wirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel („Gluconeogenesis“<sup>3)</sup>), die in 11-Stellung Sauerstoff enthalten, wobei es aber ziemlich gleichgültig zu sein scheint, ob dieser in Form einer Keto- oder Hydroxyl-Gruppe vorliegt<sup>4)</sup>.

Zur Prüfung der Frage, wieweit diese Wirkung spezifisch ist und ob sie auch bei Stoffen eintritt, die das Sauerstoffatom des Ringes C in 12-Stellung statt in 11-Stellung tragen, wurden die drei Stoffe (XVI), (XVII) und (XVIII) bereitet. Die Substanzen (XVI) und (XVII) unterscheiden sich von den natürlichen Hormonen 11-Dehydro-corti-

<sup>1)</sup> 58. Mitteilung, vgl. *C. W. Shoppee, D. A. Prins*, *Helv.* **26**, 201 (1943).

<sup>2)</sup> Es sind dies nach unserer Nomenklatur: Corticosteron, 11-Dehydro-corticosteron, 11-Desoxy-corticosteron und die Substanzen Fa, M und S.

<sup>3)</sup> *C. N. H. Long, B. Katzin, E. G. Fry*, *Endocrinology* **26**, 309 (1940); *D. J. Ingle*, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **44**, 176 (1940); *B. B. Wells, E. C. Kendall*, *Proc. Staff Meetings Mayo Clinic* **15**, 565 (1940); *B. B. Wells*, *ibid.* **15**, 294 (1940); *H. Jensen, J. F. Grattan*, *Am. J. Physiol.* **128**, 270 (1940); *J. F. Grattan, H. Jensen*, *J. Biol. Chem.* **135**, 511 (1940).

<sup>4)</sup> Die Substanzen Corticosteron, Fa und M sind beispielsweise im Anti-Insulin-Test nach *J. F. Grattan* und *H. Jensen*, *J. Biol. Chem.* **135**, 511 (1940) mit 0,5 mg pro Maus wirksam. Dehydro-corticosteron dürfte in diesem Test eine ähnliche Wirksamkeit entfalten, während das im Lebenserhaltungstest, sowie im *Everse-de Fremery*-Test viel wirksamere Desoxy-corticosteron-acetat im Anti-Insulin-Test mit 2 mg noch unwirksam ist.