

95. Über Steroide.

49. Mitteilung¹).

Über Farbreaktionen

von K. Miescher²).

(29. III. 46)

Wir haben schon mehrfach über das Auftreten von Farbreaktionen, insbesondere in der Steroidreihe, berichtet. Sie dienten uns z. B. zur Unterscheidung a) 17-cisoider und 17-transoider Hydroxylgruppen, b) in der Seitenkette einfach oder doppelt ungesättigter Diphenyl-cholane und c) in 1-Stellung ungesättigter und gesättigter Bisdehydro-doisylnsäuren. Diesen Farbreaktionen war die Verwendung ausgesprochen elektronegativer Reagentien, insbesondere starker Säuren, wie Schwefelsäure, Acetylschwefelsäure und Trichlor-essigsäure, gemeinsam, und wir wiesen schon in unseren ersten Publikationen auf diesem Gebiete³) darauf hin, dass die den Färbungen zugrunde liegenden „Chromogene“ im allgemeinen stark ungesättigt sein müssten.

I. Die bisher von uns geprüften Farbreaktionen.

Nachfolgend möchten wir einen kurzen Überblick über unsere bisherigen Resultate unter Berücksichtigung neuer Befunde geben.

a) Farbreaktion nach Kägi und Miescher.

Zum Nachweis einer cisoiden, 17-ständigen Hydroxylgruppe in Steroiden kocht man nach der Vorschrift von Kägi und Miescher (l. c.) eine Lösung der Substanz in Eisessig mit einem Tropfen konz. Schwefelsäure⁴) und tropft nach dem Abkühlen eine Lösung eines Halogens, insbesondere Brom in Eisessig, zu. An Stelle des Halogens können auch Acetanhydrid, Propionsäure-anhydrid usw., nicht aber Ameisensäure-essigsäure-anhydrid, dagegen Chromsäure Verwendung finden. Mit Schwefelsäure wird das cisoiden Hydroxyl in 17-Stellung des Steroidkerns als Wasser abgespalten unter Bildung einer Doppelbindung. Somit handelt es sich in Wirklichkeit um eine Farbreaktion auf entsprechende kern-ungesättigte Verbindungen⁵). Zur Entstehung der Farbe ist eine retro-

¹) 48. Mitteilung, siehe Helv. **29**, 627 (1946).

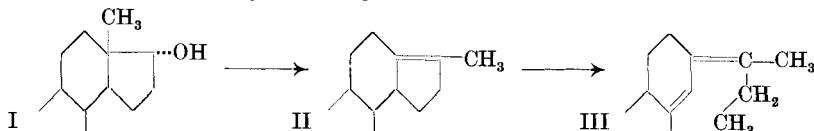
²) An den neueren Versuchen beteiligten sich die HH. Anner, Billeter, Kägi, Meystre, Neher und Rometsch; im übrigen wird auf die früheren Publikationen verwiesen.

³) H. Kägi und K. Miescher, Chem. and Ind. **57**, 256 (1938); Helv. **22**, 683 (1939).

⁴) Auch Bromwasserstoffsäure ist verwendbar.

⁵) Unsere Reaktion wurde in der Tat von V. Prelog, L. Ruzicka und Mitarb. (Helv. **27**, 61, 66 (1944); **28**, 618, 1651 (1945)) zum Nachweis von 16,17-ständigen Doppelbindungen mit Erfolg benützt. Über die Unterscheidung der Verbindungen vom Typus des $\Delta^{16,17}$ -Androstens und des Pseudo-androstens auf kolorimetrischem Wege werden wir demnächst berichten.

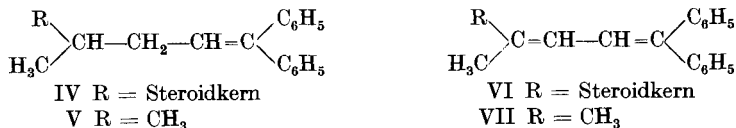
pinakolinartige Umlagerung unter Bildung eines „Pseudo-androstens“ erforderlich¹⁾. Dieses scheint aber noch nicht das eigentliche Chromogen darzustellen. Letzteres entsteht daraus erst unter dem Einfluss von Halogen, Acetyl-schwefelsäure, Chromsäure, aber auch von Licht, wobei sich offenbar, wohl unter weiterer Umlagerung oder Dehydrierung, ein konjugiert ungesättigtes System bildet (beispielsweise nach der Formelreihe I—III). Erst in III würde somit das eigentliche Chromogen vorliegen, das sich mit starken Säuren zu tief farbigen Verbindungen vereinigt.



Wir konnten zeigen, dass diese Farbreaktion auch bei Vitamin D₂, Ergosterin und, weniger ausgesprochen, bei Cholesterylen positiv verläuft, während z. B. Cholesterin, Cholestanol und die Δ^2 -, Δ^4 - und Δ^5 -Cholestene nicht ansprechen, was ganz besonders die Bedeutung konjugiert ungesättigter Systeme für das Auftreten der Färbungen zeigt.

b) Farbreaktionen auf Seitenketten-diene der Steroide²⁾.

In Tabelle 1 sind einige Farbreaktionen im Zusammenhang dargestellt, die wir an von uns gewonnenen Seitenketten-dienen der Formel VI im Vergleich zu den einfach ungesättigten Verbindungen der Formel IV ermittelt haben. Ergänzend geben wir auch die Reaktion der einfacheren Typen ohne Steroidkern, des 1,1-Diphenyl-4-methyl-pentens-(1) (V) und des 1,1-Diphenyl-4-methyl-pentadiens-(1,3) (VII), wieder.



Das 1,1-Diphenyl-4-methyl-pentens-(1) (V) war bereits von *P. Schorigin*³⁾ durch Einwirkung von Natrium auf Benzophenon und Isoamylbromid in Äther erhalten worden. Wir gewannen es nun aus Isoamyl-phenyl-keton über das Isoamyl-diphenyl-carbinol: Zu einer Lösung von Phenylmagnesiumbromid aus 38 g Brombenzol und 5,5 g Magnesium in 200 cm³ absolutem Äther liessen wir 40 g Isoamyl-phenyl-keton zutropfen. Nach Abklingen der Reaktion wurde 2 Stunden zum Sieden erhitzt, dann abgekühlt, mit Eis und Schwefelsäure zersetzt und die ätherische Schicht abgetrennt, gewaschen und getrocknet. Nach Verdampfen des Äthers nahmen wir den Rückstand in Xylol auf, versetzten die

¹⁾ Offenbar ohne Kenntnis der beiden Publikationen von *Kägi* und *Miescher* berichteten *Westphal* und Mitarb. (B. **72**, 1233, 1243 (1939)) über den anormalen Verlauf der HCl-Abspaltung mit Kaliumcyanid oder Natriumacetat aus 17-Chlorderivaten der Steroid-Reihe. Dabei entstanden Retro-Verbindungen mit tertiärer Doppelbindung, welche auf die der unseren ähnliche Farbreaktion von *Tortelli* und *Jaffé* (Ch. Z. **39**, 14 (1915)) positiv ansprachen.

²⁾ *Ch. Meystre, H. Frey, A. Wettstein* und *K. Miescher*, Helv. **27**, 1815 (1944); *Ch. Meystre* und *K. Miescher*, Helv. **28**, 1498, 1500 (1945); **29**, 35 (1946); *Ch. Meystre, H. Frey, R. Neher, A. Wettstein* und *K. Miescher*, Helv. **29**, 627 (1946).

³⁾ B. **41**, 2714 (1908).

Tabelle 1.

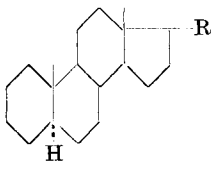
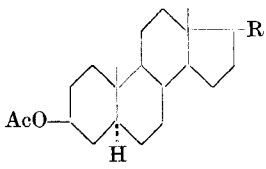
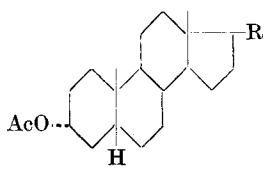
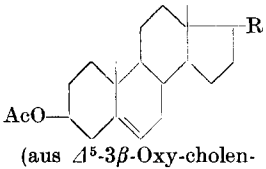
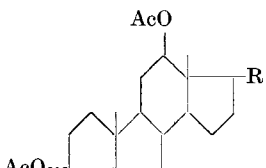
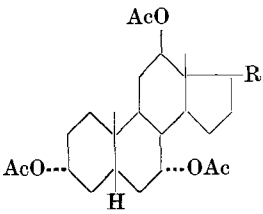
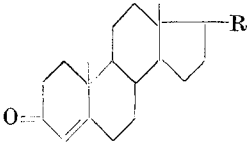
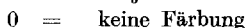
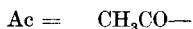
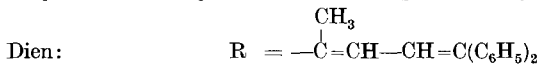
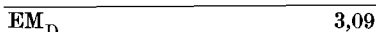
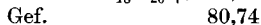
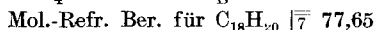
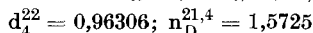
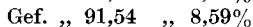
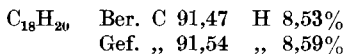
Formeln	Tetranitromethan		Trichloressigsäure		Liebermann-Burchard	
	Äthylen-Verbindung	Dien	Äthylen-Verbindung	Dien	Äthylen-Verbindung	Dien
 (aus allo-Cholansäure)	gelb	braun	0	rot-violett-	0	rosa-bordeauxviolettgrün
 (aus 3β-Oxy-allo-cholansäure)	gelb	braun	0	violett	schwach violettgrau	rosagelbbordeauxviolett
 (aus Lithocholsäure)	gelb	braun	0	rosagelbgrün	schwach bräunlich	orangebordeauxdunkelgrün
 (aus Δ⁵-3β-Oxy-cholensäure)	gelb	braun	schwach rötlich	rot-violett	schwach violettgrauschwarz	rotviolettschwarz
 (aus Desoxy-cholsäure)	gelb	braun	0	schwach rosa	0	orangebordeaux

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Formeln	Tetranitromethan		Trichloressigsäure		Liebermann-Burchard	
	Äthylen-Verbindung	Dien	Äthylen-Verbindung	Dien	Äthylen-Verbindung	Dien
 (aus Cholsäure)	gelb	braun	0	grün	gelbgrünstichig	orange
		braun		gelbbraun		rotbordeaux
CH ₃ —R	gelb	dunkelbraun	0	rotbraun	schwach gelbrotgrün	stark gelbrotgrün



Lösung mit Jod und kochten sie zur Wasserabspaltung. Hierauf verdünnte man sie mit Äther, wusch sie mit Natriumthiosulfatlösung und Wasser und dampfte sie ein. Nach Abtrennung ketonischer Verunreinigungen mit Girard-P-Reagens ging der Hauptteil des Reaktionsproduktes unter 10 mm Druck bei 160—170° über. Durch Redestillation und wiederholtes Ausschütteln einer Hexan-Lösung mit konz. Schwefelsäure erhielten wir das 1,1-Diphenyl-4-methyl-penten-(1) als farblose Flüssigkeit, welche unter 0,15 mm Druck bei 112—113° destillierte.



Zur Herstellung des 1,1-Diphenyl-4-methyl-pentadiens-(1,3) (VII) wurden 5 g (V) in 30 cm³ alkoholfreiem Tetrachlorkohlenstoff mit 3,8 g Brom-succinimid unter Belichten

zum Sieden erhitzt. Nach 35 Minuten saugte man vom Succinimid ab, versetzte das Filtrat mit 5 cm³ Dimethylanilin, destillierte den Tetrachlorkohlenstoff ab und erhitzte $\frac{1}{2}$ Stunde auf 200°. Nun wurde mit Äther verdünnt, die Lösung mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand lieferte beim Destillieren als Hauptfraktion das 1,1-Diphenyl-4-methyl-pentadien-(1,3), das unter 0,15 mm Druck bei 121,5–125° als hellgelbe Flüssigkeit überging.

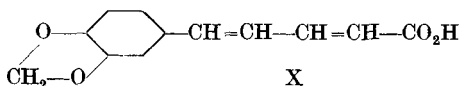
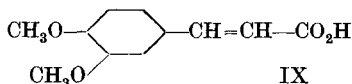
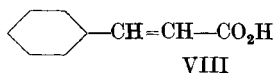
$C_{18}H_{18}$	Ber. C 92,26	H 7,74%
	Gef. „ 92,08	„ 7,87%
	$d_4^{22} = 0,98158$; $n_D^{20} = 1,5985$	
Mol.-Refr.	Ber. für $C_{18}H_{18}$	$\bar{M} 77,19$
	Gef.	81,68
EM_D		4,49
$E\Sigma_D$		1,92

Die molare Exaltation (EM_D) von (VII) ist wesentlich höher als diejenige von (V). Die für Verbindungen von verschiedenem Mol.-Gewicht zum Vergleich heranzuziehenden spezifischen Exaltationen ($E\Sigma_D$) liegen in beiden Fällen im Bereich der an vergleichbaren Körpern gefundenen Werte.

Das U. V.-Spektrum von (VII) zeigt als Ausdruck der zusätzlichen, konjugierten Doppelbindung erwartungsgemäß gegenüber demjenigen von (V) eine starke Verschiebung der Haupt-Absorptionsbande um ca. 680 Å nach dem langwelligen Gebiet¹⁾.

Einheitlich verlaufen die Reaktionen mit Tetranitromethan, indem der Übergang von der Diphenyl-cholen- zur Diphenyl-choladien-Verbindung eine starke Intensivierung der Farbe von hellgelb nach tiefbraun verursacht.

Auch mit Trichloressigsäure (90-proz.)²⁾ geben nur die Diene charakteristische Färbungen. In diesem Zusammenhang interessiert unser Befund, dass Zimtsäure (VIII) und Veratryl-acrylsäure (IX) mit diesem Reagens keine Reaktion zeigen, während sich die konjugierte Kohlenstoff-Doppelbindungen aufweisende Piperinsäure (X) damit sofort gelb färbt, worauf beim Stehen die Farbe in grün übergeht.



Gegenüber dem *Liebermann-Burchard*'schen Reagens ist der Unterschied zwischen Äthylen- und Dien-Verbindung weniger charakteristisch, wenn auch die erstere durchwegs schwächere Färbung zeigt als die letztere, ja überhaupt nicht anspricht, wenn der Steroidkern keine ungesättigten oder abspaltbaren Gruppen aufweist.

¹⁾ Vgl. die Absorptionsspektren entsprechender Steroidderivate: *Ch. Meystre, H. Frey, A. Weltstein und K. Miescher, Helv.* **27**, 1820 (1944).

²⁾ *O. Rosenheim, Biochem. J.* **23**, 47 (1929).

Während die einfacheren Typen (V) und (VII) gegenüber Tetranitromethan und Trichloressigsäure sich in ihrer Reaktionsweise den Steroidderivaten anschliessen, reagiert gegenüber dem *Liebermann-Burchard*'schen Reagens auffälligerweise bereits die Äthylen-Verbindung, wenn auch schwächer als das Dien¹⁾.

Interessanterweise färbt sich (V) mit Antimontrichlorid in Chloroform-Acetanhydrid zunächst nicht, erst innert 1 Stunde wird die Lösung gelb bis grün, das Dien (VII) wird sofort kirschrot, während alle Steroide der Formeln (IV) und (VI) keine Reaktion zeigen. Die Frage, wie weit die Grösse des Restes R in (IV) bis (VII) die Farbreaktion beeinflusst, bedarf noch weiterer Abklärung.

c) Farbreaktionen semicyclisch ungesättigter Derivate vom Bisdehydro-doisylnsäuretyp²⁾.

In Tabelle 2 sind die Färbungen wiedergegeben, die beim Lösen semicyclisch gesättigter und ungesättigter Bisdehydro-doisylnsäuren, der Doisylnsäure selbst (aus Oestron), sowie einiger Nerolinderivate in konz. Schwefelsäure bei Zimmertemperatur entstehen.

Die in der Seitenkette gesättigten Säuren geben wie Nerolin und Acetyl-nerolin wenig charakteristische Färbungen. Immerhin ist von Interesse, dass innerhalb der Gruppe der Bisdehydro-doisylnsäuren beim Übergang von der normal- zur iso-Reihe eine Farbverschiebung von hellgelb nach orange eintritt. Intensive Färbungen geben aber erst die 1-Äthyliden- und übrigens auch die anderen von uns bisher geprüften 1-Alkyliden-Derivate. Die HO- oder CH₃O-Gruppe in ana-Stellung des Naphtalinkerns scheint hypsochrom, dafür aber stabilisierend zu wirken. Auch das durch Reduktion von Acetyl-nerolin entstehende Carbinol gibt, wohl infolge Wasserabspaltung, unter Bildung des Vinyl-nerolins eine vertiefte Färbung.

Während bei den Diphenyl-cholenen selbst 2 Phenylgruppen in α -Stellung zur Doppelbindung unter den Bedingungen der *Liebermann-Burchard*'schen Reaktion zur Bildung eines Chromogens bei unsubstituiertem und gesättigtem Kerngefüge nicht genügen, reicht im vorliegenden Falle die Konjugation der Doppelbindung zu einem Naphtalinkern hiezu aus.

Unsere an Steroiden und verwandten Verbindungen erhobenen Erfahrungen führen zu dem Schluss, dass stets dann ausgesprochene Farbreaktionen zu beobachten sind, wenn extrem elektronegative Substanzen (Mineralsäure, Acetyl-schwefelsäure, Trichloressigsäure, Tetranitromethan) auf stark ungesättigte Kohlenstoff-Doppelbindungssysteme, vorzugsweise in wasserfreiem Medium, einwirken oder wenn sich solche Systeme unter ihrem Einfluss bilden. Damit

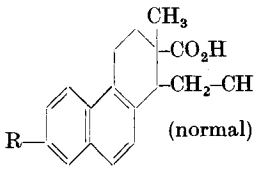
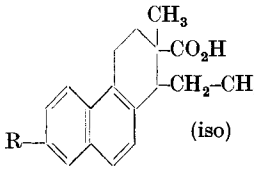
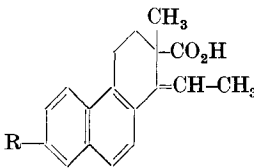
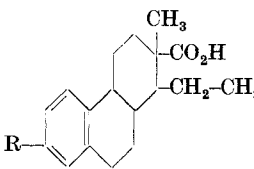
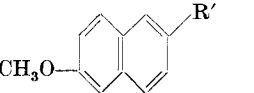
¹⁾ Ob diese Farbreaktion der Äthylen-Verbindung nicht durch geringfügige Verunreinigungen bedingt ist, bleibt noch abzuklären.

²⁾ J. Heer und K. Miescher, Helv. **28**, 156 (1945); J. Heer, J. R. Billeter und K. Miescher, Helv. **28**, 991, 1342 (1945).

stehen z. B. auch Farbreaktionen auf Cafestol und Kahweol in Übereinstimmung, indem bloss das zusätzlich zum Furanring weitere Doppelbindungen aufweisende Kahweol mit Mineralsäuren oder Trichloressigsäure sofortige intensiv grünblaue Färbungen ergibt¹⁾.

Der Zusammenhang mit vielerlei Tatsachen auf dem Gebiete der eigentlichen Farbstoffe tritt ebenfalls klar zu Tage.

Tabelle 2.

Typus	Formel	R = OH	R = OCH ₃	R = H
Bis-dehydrodoisynol-säuren	 (normal)	hellgelb	hellgelb	zuerst hellrosa, dann hellgelb
	 (iso)	orange	gelborange	
Doisynol-säure		intensiv blutrot (beständig)	intensiv blutrot (beständig)	intensiv violettblau (flüchtig)
		allmählich gelb		
Nerolin		R' = H hellgelb	R' = CO·CH ₃ hellgelb	R' = CHOH·CH ₃ tief braunrot

II. Theoretische Vorstellungen.

Neuerdings hat *H. Schaltegger*²⁾ im Zusammenhang mit seinen Versuchen zur Ausarbeitung einer kolorimetrischen Vitamin-D-Bestimmungsmethode mit Perchlorsäure in Benzollösung unter Zusatz aromatischer Aldehyde die Ansicht geäußert, dass die Färbung

¹⁾ *A. Wettstein* und *K. Miescher*, *Helv.* **26**, 631, 799 (1943); *A. Wettstein*, *M. Spillmann* und *K. Miescher*, *Helv.* **28**, 1013 (1945).

²⁾ *H. Schaltegger*, *Exper.* **2**, 27 (1946); *Helv.* **29**, 285 (1946).

Tabelle 3.

Farbreaktion

nach Kägi-Miescher auf 17-cisoiden OH-Gruppen unter Verwendung von Aldehyden.

1—2 mg Substanz; 2 cm³ 1-proz. Lösung von Anisaldehyd in Eisessig;
1 Tropfen konz. Schwefelsäure; 2 Minuten im Wasserbad erhitzt.

Androstan-17t-ol	wie Kontrolle
„ -17c-ol	intensiv violett
„ -3t-17c-diol	„ blauviolett
„ -3c-17t-diol	wie Kontrolle
Δ ² -Androsten-17t-ol	wie Kontrolle
Δ ⁵ -Androsten-3t-17t-diol	schwach blaugrau
Δ ⁵ -Methyl-androsten-3t-17(?)-diol	schwach graugrün
Androstan-3t-ol-17-on (t-Androsteron)	wie Kontrolle
Androstan-3c-ol-17-on (Androsteron)	wie Kontrolle
Δ ⁵ -Androsten-3t-ol-17-on (Dehydroandrosteron)	wie Kontrolle
Δ ⁴ -Androsten-3-on-17t-ol (Testosteron)	wie Kontrolle
Δ ⁴ -Androsten-3-on-17c-ol (cis-Testosteron)	intensiv blauviolett mit roter Fluoreszenz
Cholesterin	etwas dunkler als Kontrolle
Δ ² -Cholesten	etwas dunkler als Kontrolle
Cholesterylen	schmutzigbraun, nicht intensiv
Ergosterin	rötlich braungrau, nicht intensiv
Kontrolle	ganz schwach rötlichbraun

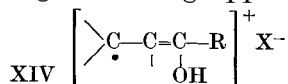
Tabelle 4.

Farbreaktion des Androstan-3t-17c-diols nach Kägi-Miescher unter Verwendung verschiedener Aldehyde.

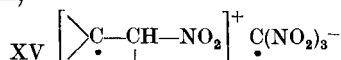
2 mg Diol; 2 cm³ 1-proz. Lösung des Aldehyds in Eisessig;
1 Tropfen konz. Schwefelsäure; 2 Minuten im Wasserbad erhitzt.

	Kalt	Nach Erhitzen	Kontrolle ohne Steroid
Benzaldehyd	farblos	graublau, grüne Fluoreszenz, mässig stark	farblos
Salicylaldehyd	„	rotviolett, mässig stark	„
m-Methoxy-benzaldehyd	„	grau, mässig stark	„
Anisaldehyd	„	intensiv violett	Spur rötlich
2,3-Dimethoxy-benzaldehyd	„	trübes Rotviolett, mässig stark	farblos
Resorcyaldehyd	Spur rosa	intensiv blauviolett	schwach rötlich
Vanillin	farblos	blau, ziemlich stark	farblos
Veratrumaldehyd	„	violett, ziemlich stark	Spur grünlich
Piperonal	„	violett, ziemlich stark	Spur rosa
1,4-Methoxy-naphtaldehyd	hellgelb	blau, mässig stark	hellgelb
p-Dimethyl-aminobenzaldehyd	„	grün, mässig stark	hellgelb

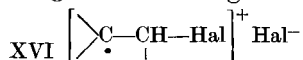
Reagenzien, wie Halogen, Säure-anhydride, Aldehyde oder gar Licht sich gegenseitig ersetzen lassen. Es wäre denkbar, dass auch in diesen Fällen analoge Carbeniumionen, gegebenenfalls nach Autoxydation (Licht), unter Enolisierung von Ketogruppen gebildet werden (XIV).



Tatsächlich hat *Wizinger*¹⁾ gezeigt, dass sich as.-Diaryl-äthylene z. B. mit Säurechloriden kuppeln lassen. Ganz entsprechend würde die Farbreaktion mit Tetranitromethan auf eine Nitrierung (XV) zurückzuführen sein,



und diejenige mit Halogen auf Halogenierung (XVI).



Nach *Wizinger* beruht die schöne rotviolette Farbe, die erstmals *Gattermann* beim Aufblasen von Bromdämpfen auf as.-Dianisyl-äthylen beobachtet hat, auf der Bildung eines halogenierten Carbeniumsalzes der Formel XVI. Wir konnten uns davon überzeugen, dass auch unser „Pseudo-androsten“, ferner Ergosterin und Vitamin D₂, nicht aber Δ^5 - oder Δ^4 -Cholesten in festem Zustand mit Bromdampf ähnliche, teilweise recht stabile, intensiv grüne bis blaue Färbungen geben.

Nath, *Chakravorty* und *Chowdhury*²⁾ berichteten kürzlich, dass bei der *Liebermann-Burchard*'schen Reaktion auf Cholesterin unter Wasserabspaltung und Sulfurierung eine Cholesterylen-sulfosäure entstehe, die demnach Chromogen und Säurerest gleichzeitig enthalten würde. Möglicherweise tritt die Sulfurierung unter dem Einfluss der sich aus Acetanhydrid und Schwefelsäure bildenden Acetyl-schwefelsäure ein. Ob aber die Cholesterylen-sulfosäure tatsächlich für die Entstehung der *Liebermann-Burchard*'schen Reaktion verantwortlich ist, scheint noch nicht gesichert. Wie weit schliesslich solche Sulfurierungen auch bei anderen in Gegenwart von Schwefelsäure entstehenden Farbreaktionen eine Rolle spielen, müsste noch geprüft werden.

Zum Schluss möchten wir betonen, dass unsere Kenntnisse auf dem Gebiete der Farbreaktionen immer noch sehr lückenhaft sind. Diese Reaktionen bergen manche überraschende Momente, deren Aufklärung sich lohnen wird. Naturgemäss ist die „Spezifität“ einer Farbreaktion stets nur eine bedingte; sie wird auch auf andere Substanzklassen ansprechen, wenn analoge ungesättigte Systeme vorliegen.

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Hrn. Dr. *Gysel* durchgeführt.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

¹⁾ *R. Wizinger*, J. pr. [2] **154**, 1 (1939).

²⁾ *M. C. Nath*, *M. K. Chakravorty* und *S. R. Chowdhury*, Nature **157**, 103 (1946).