

Trinitrobenzolat: Smp. 184—185° (dreimal aus Äthanol umkristallisiert).

$C_{20}H_{13}O_6N_3$ Ber. C 61,38 H 3,36% Gef. C 61,45 H 3,31%

Zu Vergleichszwecken wurden nach den in der Literatur beschriebenen Verfahren 1,2-Benz-azulen¹³⁾¹⁵⁾ (II) und 5,6-Benz-azulen¹¹⁾¹⁵⁾ (IV) hergestellt:

1,2-Benz-azulen (II) (im Hochvakuum sublimiert): Smp. 187,5—188,5°.

$C_{14}H_{10}$ Ber. C 94,34 H 5,66% Gef. C 94,27 H 5,68%

5,6-Benz-azulen (IV) (im Hochvakuum sublimiert): Smp. 161—163°.

$C_{14}H_{10}$ Ber. C 94,34 H 5,66% Gef. C 94,09 H 5,81%

Den folgenden Institutionen sind wir für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit zu grossem Dank verpflichtet: *Else Kloster-Jensen* dem *Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Forskningsråd* in Oslo für die Gewährung eines Auslandsstipendiums, *E. Kováts* der Firma *Hoffmann-La Roche & Cie. AG.* in Basel, *A. Eschenmoser* dem *Batelle Memorial Institute, International Division* in Genf für die Gewährung eines *Batelle*-Stipendiums, und *E. Heilbronner* der *Rockefeller Foundation* in New York.

Herrn Dr. *W. Keller* sei für zahlreiche, wertvolle Ratschläge unser herzlichster Dank ausgesprochen.

SUMMARY.

The preparation of pure 4,5-benzo-azulene is described and some of its spectroscopic properties are compared with those of its isomers 1,2-benzo-azulene and 5,6-benzo-azulene as well as with those of the parent compound azulene.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

127. Synthese von β -Carotin-[6,6'-¹⁴C]

von J. Würsch und U. Schwieter.

(24. IV. 56.)

Von *V. Prelog* und Mitarbeitern wurde vor einigen Jahren die Vermutung ausgesprochen, dass die im Harn von trächtigen Stuten in ansehnlicher Menge aufgefundenen Derivate und Umwandlungsprodukte der Jonone¹⁾ durch biologischen Abbau von mit der Nahrung aufgenommenen Carotinoiden im Tierkörper entstanden seien. Ein verhältnismässig einfacher Weg, diesen Sachverhalt nachzuweisen, besteht darin, dass im Tierversuch ein zweckdienlich markiertes Carotin verfüttert und anschliessend der vom Versuchstier ausgeschiedene Harn auf einen Gehalt an radioaktiven Abbauprodukten vom Jonon-Typus geprüft wird. An das zu markierende Carotinoid müssen dabei folgende Anforderungen gestellt werden:

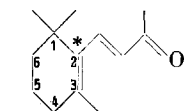
¹⁾ *V. Prelog, J. Führer, R. Hagenbach & R. Schneider*, *Helv.* **31**, 1799 (1948); *V. Prelog & J. Führer*, *Helv.* **28**, 583 (1945); *V. Prelog, J. Führer, R. Hagenbach & H. Frick*, *Helv.* **30**, 113 (1947); *V. Prelog & B. Vaterlaus*, *Helv.* **32**, 2082 (1949); **33**, 1725 (1950); *V. Prelog & M. Osgan*, *Helv.* **35**, 981 (1952).

1. Die Markierung hat an einem der ersten 13 C-Atome zu erfolgen²⁾.

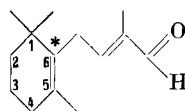
2. Da die Extraktion von C₁₃-Körpern aus kleineren Mengen Harn mit Schwierigkeiten verbunden ist und die Isolierung eines bestimmten erwarteten Abbauproduktes vermutlich nach dem Verdünnungs-Isolierungsprinzip vorgenommen werden muss, sollte das verfütterte Carotinoid eine möglichst hohe spezifische Aktivität aufweisen.

Ein geeignet markiertes β -Carotin liess sich auf folgendem Wege herstellen. Es wurde zuerst nach der Vorschrift von *B. G. Engel, J. Würsch & M. Zimmermann*³⁾ aus Methylheptenon und markiertem Bromessigester ein β -Jonon-[2-¹⁴C] (I) bereitet, aus dem nach der von *O. Isler* und Mitarbeitern⁴⁾ modifizierten Synthese von *H. H. Inhoffen* und Mitarbeitern⁵⁾ das β -Carotin in 6 Stufen erhalten werden konnte.

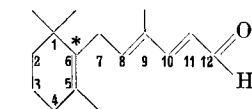
Formelübersicht



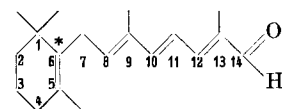
β -Jonon-[2-¹⁴C] (I)



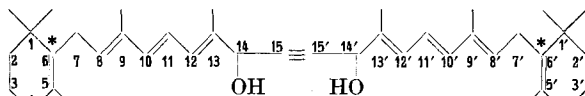
β -C₁₄-Aldehyd-[6-¹⁴C] (II)



β -C₁₆-Aldehyd-[6-¹⁴C] (III)



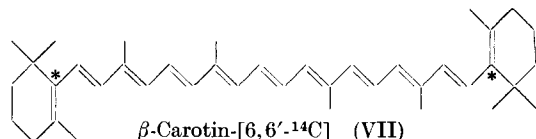
β -C₁₉-Aldehyd-[6-¹⁴C] (IV)



β -C₄₀-in-diol-[6,6'-¹⁴C] (V)



15,15'-Dehydro- β -carotin-[6,6'-¹⁴C] (VI)



β -Carotin-[6,6'-¹⁴C] (VII)

* Mit ¹⁴C markiertes C-Atom.

²⁾ Ein für unsere Zwecke nicht geeignetes β -Carotin-[15,15'-¹⁴C] wurde inzwischen von *H. H. Inhoffen, U. Schwieter, C. O. Chichester & G. Mackinney* hergestellt; *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1053 (1955).

³⁾ *B. G. Engel, J. Würsch & M. Zimmermann*, *Helv.* **36**, 1771 (1953).

⁴⁾ *O. Isler, H. Lindlar, M. Montavon, R. Rüegg & P. Zeller*, *Helv.* **39**, 249 (1956).

⁵⁾ *H. H. Inhoffen, F. Bohlmann, K. Bartram, G. Rummert, H. Pommer, F. Westphal & G. Linhoff*, *Liebigs Ann. Chem.* **570**, 54 (1950).

Die Formeln der Zwischenprodukte II bis VII der Synthese mit den zugehörigen Numerierungen sind in der Formelübersicht angegeben⁶⁾.

Ausgehend von 823 mg Bromessigsäure-[2-¹⁴C], entsprechend 10 mc⁷⁾, wurden nach diesem Verfahren 1,198 g β -Carotin-[6,6'-¹⁴C] mit einer Gesamtaktivität von 17 μ c hergestellt.

Über die biologischen Versuche mit dem β -Carotin-[6,6'-¹⁴C] wird später berichtet.

Der *Rockefeller Foundation* in New York und der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.* in Basel danken wir für die materielle Unterstützung. Herrn Dr. *O. Isler* danken wir für die vielen wertvollen Ratschläge und die Mitteilung technischer Einzelheiten der β -Carotin-Synthese vor der Publikation.

Experimenteller Teil⁸⁾.

Im allgemeinen hielten wir uns an die von *O. Isler* und Mitarbeitern⁴⁾ ausgearbeiteten Vorschriften. Bei Destillationen von flüssigen Zwischenprodukten erwies es sich als vorteilhaft, die Destillationsrückstände jeweils mit dem entsprechenden inaktiven Material erneut zu destillieren, um möglichst viel vom radioaktiven Produkt zu fassen.

β -Jonon-[2-¹⁴C] (I). 823 mg Bromessigsäure-[2-¹⁴C] (10 mc) wurden nach *Engel, Würsch & Zimmermann*⁴⁾ in β -Jonon-[2-¹⁴C] übergeführt. Das mit inaktivem β -Jonon verdünnte Produkt wog 12,67 g und siedete bei 79–82°/0,1 mm.

β -C₁₄-Aldehyd-[6-¹⁴C] (II). Zu einem Gemisch von 12,67 g β -Jonon-[2-¹⁴C] und 10,24 g Chloressigester gab man unter Rühren (Luft- und Feuchtigkeitsschluss) bei –15° bis –20° 5,68 g Natriumäthylat langsam im Verlaufe von 1 Std. zu. Nach 4 Std. Rühren bei gleicher Temperatur fügte man 40 ml 15-proz. methanolischer NaOH zu und rührte 2 Std. weiter bei +5°. Das Reaktionsgemisch wurde auf Wasser gegossen und aufgearbeitet. Durch Destillation erhielt man 9,02 g β -C₁₄-Aldehyd-[6-¹⁴C], Sdp. 70–75°/0,1 mm (66,5% d. Th.). Zum Destillationsrückstand wurde inaktiver β -C₁₄-Aldehyd zugesetzt und erneut destilliert. Gesamtgewicht 10,08 g.

β -C₁₆-Aldehyd-[6-¹⁴C] (III). 10,08 g β -C₁₄-Aldehyd wurden nach der Vorschrift von *O. Isler* und Mitarbeitern⁴⁾ acetalisiert und mit Vinyl-äthyläther zum β -C₁₆-Aldehyd-diäthylacetal kondensiert. Nach Verseifen des Acetals konnte jedoch durch Umlösen aus Methanol kein kristallines Produkt direkt isoliert werden. Chromatographie des Rohproduktes an einer Säule aus 500 g Aluminiumoxyd (Aktivität II–III) lieferte 2,35 g eines Petroläther-Eluats, mit einem für β -C₁₄-Aldehyd charakteristischen UV.-Absorptionsspektrum ($\lambda_{\max} = 230 \text{ m}\mu$). Die Hauptmenge des β -C₁₆-Aldehyds wurde nun mit Petroläther unter Zusatz von Methanol von der Säule gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum unter Stickstoff entfernt. Der Vorlauf von β -C₁₄-Aldehyd wurde mit inaktivem Aldehyd auf 10 g verdünnt, erneut acetalisiert und mit Vinyl-äthyläther umgesetzt. Nach der üblichen Zersetzung des Ätheracetals kristallisierten aus Methanol 4,63 g β -C₁₆-Aldehyd (UV.: $\lambda_{\max} = 284,5 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 24000$; Smp. 77°). Diese Kristalle wurden mit dem Haupteluat aus der chromatographischen Trennung vereinigt und zur nächsten Reaktion verwendet (16,53 g).

β -C₁₈-Aldehyd-[6-¹⁴C] (IV). Aus den β -C₁₆-Aldehyd-haltigen Produkten (16,53 g) erhielt man nach Acetalisieren und Chromatographieren an Aluminiumoxyd (Aktivität I–II) 10,60 g β -C₁₆-Aldehyd-diäthylacetal (UV.: $\lambda_{\max} = 237 \text{ m}\mu$), Ausbeute 40%, bezogen auf 17,73 g eingesetzten β -C₁₄-Aldehyd. Die Umsetzung dieses Acetals mit Propenyläther ergab ein öliges Rohprodukt, aus dem durch Kristallisation aus Petrol-

⁶⁾ Über die Numerierung der Carotinoide und Zwischenprodukte vgl. *H. H. Hoffen* in *L. Zechmeister*, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe IX, Springer-Verlag, Wien 1952, S. 3.

⁷⁾ Nach Angaben des Herstellers, *Radiochemical Centre*, Amersham, Bucks., England.

⁸⁾ Die Absorptionsspektren wurden auf einem *Beckman*-Spektrophotometer DU aufgenommen. Lösungsmittel Methanol, wo nichts anderes angegeben.

äther bei -30° vorerst nur 1,92 g kristalliner β -C₁₉-Aldehyd anfielen (UV.: $\lambda_{\max} = 328 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 46500$) sowie 8,22 g eines Öles, das noch grössere Mengen Aldehyd enthielt, die nicht zur Kristallisation gebracht werden konnten. Es wurde zur weiteren Reinigung an neutralem Aluminiumoxyd (Aktivität II—III, 450 g) chromatographiert. Dabei kristallisierten eine Anzahl von Fraktionen nach Abziehen des Lösungsmittels spontan. Sie wurden mit den schon vorhandenen Kristallen vereinigt und für die weiteren Reaktionen verwendet, total 5,05 g. Die restlichen 3,26 g Öl, die im UV. ein ausgeprägtes Maximum bei $328 \text{ m}\mu$ zeigten, jedoch nicht kristallisierten, gelangten in einem zweiten Ansatz zur Kondensation.

β -C₄₀-in-diol-[6,6'-¹⁴C] (V). Bei der Kondensation wurde zu der in abs. Äther gelösten Substanz mit Hilfe einer Injektionsspritze die 2,25fache Menge der berechneten an Acetylen-dimagnesiumbromid zugesetzt. Nach 2 Std. Erhitzen am Rückfluss zersetzte man mit Ammoniumchlorid und Eis und arbeitete wie üblich auf. Die beiden Ansätze lieferten 5,61 bzw. 3,45 g des Reaktionsproduktes.

15,15'-Dehydro- β -carotin-[6,6'-¹⁴C] (VI). In zwei Ansätzen wurde das β -C₄₀-in-diol in 15,15'-Dehydro- β -carotin-[6,6'-¹⁴C] übergeführt. Die Produkte kristallisierten aus Benzol-Methanol zum Teil. Eine chromatographische Auftrennung der vereinigten Mutterlauge an Aluminiumoxyd (neutral, Aktivität II—III) ergab weitere Mengen kristallisierter Substanz, die nach Vereinigen und Rekristallisation 2,03 g wogen. (Absorptionsmaxima 433; 457 m μ , $\epsilon = 105500$; 88000, in Hexan.)

15,15'-cis- β -Carotin-[6,6'-¹⁴C] und β -Carotin-[6,6'-¹⁴C] (VII). Durch partielle Hydrierung mit Lindlar-Katalysator⁹⁾ wurde das Dehydro- β -carotin in 15,15'-cis- β -Carotin übergeführt, welches man sofort weiter umlagerte. Das Endprodukt, β -Carotin-[6,6'-¹⁴C], konnte durch wiederholte Kristallisation aus Schwefelkohlenstoff-Äthanol und Benzol-Methanol, sowie Reinigung der Mutterlauge an Aluminiumoxyd (alkalisch, Aktivität I—II) in reinem Zustand gefasst werden. Ausbeute: 882 mg (Absorptionsmaxima 453 m μ ; 480 m μ , $\epsilon = 137000$; 117000, in Hexan) und 316 mg (Absorptionsmaximum 453 m μ , $\epsilon = 123000$, in Hexan), entspr. 57% d. Th., bezogen auf 2,03 g Dehydro- β -carotin.

593 γ β -Carotin-[6,6'-¹⁴C] wurden zusammen mit 2,159 mg inaktivem β -Carotin verbrannt und das entstandene ¹⁴CO₂ als Ba¹⁴CO₃ gefällt. Die Auszählung im Tracerlab „Windowless Flow Counter“ ergab eine Aktivität von 2130 ipm, korrigiert auf unendliche Dicke. Gleichzeitig wurde ein ¹⁴C-Standardpräparat (National Bureau of Standards, USA.) ausgezählt, dessen absolute Aktivität zu 1517 ipm/mg BaCO₃ angegeben worden war. Bei unserer Zählordnung erhielten wir bei diesem Präparat rund 7000 ipm, korrigiert auf unendliche Dicke. Aus diesen Werten berechnet sich die absolute Aktivität des zur Verbrennung gelangten unverdünnten β -Carotins zu rund 31500 ipm/mg. Bei einem Einsatz von 10 mc ¹⁴C entsprechen die 1198 mg β -Carotin-[6,6'-¹⁴C] von der spezifischen Aktivität 31500 ipm/mg einer radiochemischen Ausbeute von 0,17%.

SUMMARY.

β -Carotene-[6,6'-¹⁴C] was synthesized following the industrial procedure of *O. Isler* based on *H. H. Inhoffen's* synthesis $C_{19} + C_2 + C_{19} = C_{40}$. The radioactivity was introduced in the first step of the synthesis by preparation of β -C₁₄-aldehyde-[6-¹⁴C] from labelled β -ionone and chloroacetic acid ethyl ester. Starting from 10 mc of bromoacetic acid-[2-¹⁴C] which was used for the synthesis of the radioactive β -ionone-[2-¹⁴C], 1.198 g of β -carotene-[6,6'-¹⁴C] was obtained. It had a specific activity of 31500 cpm/mg corresponding to a radiochemical yield of 0,17%.

Organisch-Chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

⁹⁾ *H. Lindlar*, Helv. **35**, 446 (1952).