

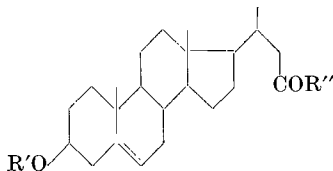
## 107. Cholesterin-[24-<sup>14</sup>C]

von P. Kurath, F. M. Ganis und M. Radakowich.

(25. IV. 57.)

Zur Erweiterung unserer biochemischen Versuche mit Cholesterin<sup>1)</sup> war es nötig, Cholesterin-[24-<sup>14</sup>C] herzustellen. Es gelang uns diese Verbindung auf einem neuen Wege zu bereiten. Kurz nach der Beendigung dieser Synthese erschien eine Arbeit von W. G. Dauben & P. H. Payot<sup>2)</sup>, die eine früher beschriebene Methode<sup>3)</sup> zur Bereitung von Cholesterin-[26-<sup>14</sup>C] modifizierten und zur Herstellung von Cholesterin-[24-<sup>14</sup>C] verwendeten.

Das Ausgangsmaterial für die hier beschriebene Reaktionsfolge, der  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-norcholensäure-methylester (I)<sup>4)5)</sup>, wurde alkalisch verseift und die erhaltene  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxy-norcholensäure (II)<sup>4-6)</sup> ins entsprechende Acetylderivat III<sup>7)</sup> übergeführt. Die Umsetzung von III zum  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-norcholensäurechlorid (IV) erfolgte wie bei der entsprechenden Bisnor-Verbindung<sup>8)</sup>.

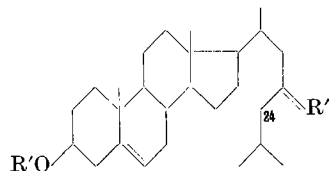


I R' = Ac; R'' = OMe

II R' = H; R'' = OH

III R' = Ac; R'' = OH

IV R' = Ac; R'' = Cl



V R' = Ac; R'' = O

VI R' = H; R'' = O

VII R' = H; R'' = H<sub>2</sub>

VIII R' = Ac; R'' = H<sub>2</sub>

Das  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-norcholensäurechlorid (IV) reagierte mit Diisobutyl-[1-<sup>14</sup>C]-cadmium (hergestellt aus Isobutyl-[1-<sup>14</sup>C]-bromid) zum  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-23-keto-cholesten-[24-<sup>14</sup>C] (V). Das rohe Acetyl-

<sup>1)</sup> F. M. Ganis, P. Kurath & M. Radakowich, *Federation Proc.* **16**, 357 (1957); vgl. P. Kurath & M. Capezzuto, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 3527 (1956).

<sup>2)</sup> *J. org. Chemistry* **21**, 1299 (1956).

<sup>3)</sup> A. I. Ryer, W. H. Gebert & N. M. Murrill, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 4247 (1950); W. G. Dauben & H. L. Bradlow, *ibid.* **72**, 4248 (1950).

<sup>4)</sup> L. Strassberger & H. Jacobi, *USP.* 2180095 (1939).

<sup>5)</sup> Pl. A. Plattner & J. Pataki, *Helv.* **26**, 1241 (1943).

<sup>6)</sup> Vgl. auch Fussnote 1, S. 1243 in Pl. A. Plattner & J. Pataki<sup>5)</sup>.

<sup>7)</sup> Vgl. O. Dalmer, F. v. Werder, H. Homigmann & K. Heyns, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **68**, 1814 (1935), ferner L. Strassberger & H. Jacobi<sup>4)</sup>.

<sup>8)</sup> W. Cole & P. L. Julian, *J. Amer. chem. Soc.* **67**, 1369 (1945).

derivat V war schwer zu reinigen und wurde direkt zum  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxy-23-keto-cholesten-[24- $^{14}\text{C}$ ] (VI) verseift. Eine modifizierte *Wolff-Kishner*-Reduktion<sup>9)</sup> von VI ergab Cholesterin-[24- $^{14}\text{C}$ ] (VII) in guter Ausbeute. Das Endprodukt der Synthese (VII) zeigte eine Radioaktivität von 30,9  $\mu\text{e}/\text{mMol}$ . Die physikalischen Konstanten dieser Verbindung stimmten mit denen des natürlichen Cholesterins überein. Eine Probe von VII, die ohne spezielle Markierung gewonnen wurde, lieferte das Acetylderivat VIII, das in jeder Hinsicht identisch war mit der Verbindung natürlichen Ursprungs.

Diese Arbeit wurde durch den *John J. Morton Cancer Fund* ermöglicht. Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. J. J. Morton für das stete Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte. Wir danken den Herren Dr. W. H. Strain und Dr. A. Zürcher für wertvolle Ratschläge bei der Verfassung des Manuskripts. Unser spezieller Dank sei auch hier Herrn Priv.-Doz. Dr. A. F. Schenmoser von der ETH in Zürich für die Durchsicht des Manuskripts ausgesprochen.

### Experimenteller Teil<sup>10)</sup>.

$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-norcholensäure (III). 5,076 g des Methylesters I<sup>11)</sup> vom Smp. 131—133° ergaben bei der Verseifung<sup>5)</sup> 4,8 g der Säure II. Die rohe  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxy-norcholensäure (II) wurde dann mit 80 cm<sup>3</sup> Pyridin und 40 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid für 72 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach dem Zusatz von 40 cm<sup>3</sup> Wasser wurde das Acetyl-rückstandsgemisch noch für 2 Std. auf dem Wasserbad erwärmt<sup>12)</sup>. Die kalte Mischung wurde dann mit 400 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt, der gebildete Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach der Umkristallisation aus Methanol-Wasser wurden 4,374 g des gewünschten Acetats III (Smp. 197—198°) gewonnen. Zur Analyse gelangte eine Probe vom Smp. 197—198°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{31} = -48^\circ$  ( $c = 1,48$ ).

$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_4$  Ber. C 74,59 H 9,52% Gef. C 74,57 H 9,69%

$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-norcholensäurechlorid (IV). Eine Lösung von 2,404 g der Säure III in 64 cm<sup>3</sup> absolutem Äther, 1,25 cm<sup>3</sup> reinstem Thionylchlorid und einem Tropfen Pyridin wurde unter zeitweiligem Umschwenken für 3 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach der Entfernung der leichtflüchtigen Anteile unter vermindertem Druck bei 30° wurde der kristalline Rückstand zweimal aus Äther-Petroläther umgelöst, wobei 1,562 g des Säurechlorids IV vom Smp. 153—154° erhalten wurden. Aus den Mutterlaugen konnten weitere 0,585 g eines weniger reinen Produktes (Smp. 149—150°) isoliert werden. Eine zur Analyse umkristallisierte Probe schmolz bei 155—156°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -47^\circ$  ( $c = 1,78$ ).

$\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{O}_3\text{Cl}$  Ber. C 71,32 H 8,86 Cl 8,42%  
Gef. „ 71,11 „ 8,75 „ 8,64%

<sup>9)</sup> Huang-Minton, J. Amer. chem. Soc. **68**, 2487 (1946); *ibid.* **71**, 3301 (1949).

<sup>10)</sup> Die Smp. wurden im evakuierten Röhrchen bestimmt und sind, wie auch die Sdp., nicht korrigiert. Die optischen Drehungen wurden in Chloroform in einem Rohr von 1 dm Länge gemessen.

<sup>11)</sup> Diese Verbindung wurde aus 9,84 g  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxybisnorcholensäure [*E. Fernholz*, Liebigs Ann. Chem. **507**, 128 (1933)] in Anlehnung an die Vorschriften von *W. Cole & P. L. Julian*<sup>8)</sup>, ferner *A. Wettstein*, Helv. **24**, 311 (1941), und *A. I. Ryer & W. H. Gebert*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 41 (1952), bereitet.

<sup>12)</sup> *R. B. Woodward, F. Sondheimer, D. Taub, K. Heusler & W. M. McLamore*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 4223 (1952), verwendeten diese Aufarbeitungsmethode in einem ähnlichen Falle.

Das Säurechlorid IV wurde durch kurzes Erwärmen mit absolutem Methanol und anschliessendes Nachacetylieren in guter Ausbeute in den Methylester I vom Smp. 130–132° übergeführt.

Isobutanol-[1-<sup>14</sup>C]<sup>13</sup>). 10 g Natriumsalz der Isobuttersäure, versetzt mit 3 ml<sup>15</sup>) der entsprechenden [1-<sup>14</sup>C]-Verbindung (33  $\mu$ c/mMol), wurden unter Eiskühlung mit 70 cm<sup>3</sup> 2-n. Schwefelsäure behandelt. Die freigesetzte Isobuttersäure-[1-<sup>14</sup>C] wurde mit 30 cm<sup>3</sup> Äther ausgezogen. Die anorganische Phase wurde abgetrennt und noch zweimal mit je 20 cm<sup>3</sup> Äther extrahiert. Die mit wenig gesättigter Kochsalzlösung gewaschenen Ätherauszüge wurden zusammengegossen, über wenig wasserfreiem Calciumchlorid getrocknet, filtriert und dann in üblicher Weise<sup>14</sup>) mit 5,537 g Lithiumaluminiumhydrid in 200 cm<sup>3</sup> Äther reduziert. Nach sorgfältigem Aufarbeiten wurden 3,627 g Isobutanol-[1-<sup>14</sup>C] vom Sdp. 103–107° (Ausbeute 54%) gewonnen. Die Verbindung liess man für 40 Std. mit 59 mg Kaliumhydroxyd<sup>16</sup>) stehen. Fraktionierte Destillation ergab 2,803 g Isobutanol-[1-<sup>14</sup>C] vom Sdp. 105–108°.

Isobutyl-[1-<sup>14</sup>C]-bromid. Diese Verbindung wurde nach der in der Literatur gegebenen Vorschrift<sup>17</sup>) in 54% Ausbeute aus Isobutanol-[1-<sup>14</sup>C] erhalten; 2,836 g vom Sdp. 89–91°.

$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxy-23-keto-cholesten-[24-<sup>14</sup>C] (VI). Die *Grignard*-Lösung wurde aus 2,836 g frisch destilliertem Isobutyl-[1-<sup>14</sup>C]-bromid und 0,472 g Magnesium in 35 cm<sup>3</sup> absolutem Äther in einer Stickstoffatmosphäre hergestellt. Nach 1 Std. wurde das Reaktionsgefäss in Eis-Kochsalzmischung abgekühlt, die Lösung mit 2,01 g Cadmiumchlorid versetzt und die so bereitete Suspension in der Kälte unter Stickstoff energisch gerührt. Nach 7 Min. konnte keine *Grignard*-Verbindung mehr nachgewiesen werden<sup>18</sup>). Den vom Stickstoffstrom weggetragenen Äther ersetzte man durch absolutes Benzol. Nach 15 Min. wurde die Lösung von 1,05 g des Säurechlorids IV in 15 cm<sup>3</sup> Benzol auf einmal zugeben, worauf das Reaktionsgemisch zuerst in der Kälte und dann über Nacht bei Zimmertemperatur energisch gerührt wurde. Nach erneutem Kühlen zersetzte man den gebildeten Komplex mit 2-n. Schwefelsäure. Den im Scheidetrichter abgetrennten wässrigen Anteil extrahierte man mit Äther und wusch die organischen Auszüge mit 0,2-n. Natronlauge und Wasser. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde die Lösung eingedampft und lieferte 1,278 g rohes  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-23-keto-cholesten-[24-<sup>14</sup>C] (V).

Die so gewonnene Verbindung V wurde in 120 cm<sup>3</sup> Methanol gelöst und mit 1,967 g Kaliumhydroxyd für 2 Std. am Rückfluss gekocht, die abgekühlte Lösung mit 300 cm<sup>3</sup> Eiswasser versetzt und mit Äther ausgezogen. Die mit 0,2-n. Natronlauge und Wasser gewaschene Ätherlösung ergab nach der üblichen Aufarbeitung 1,082 g rohes  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxy-23-keto-cholesten-[24-<sup>14</sup>C] (VI). Bei der chromatographischen Reinigung an Aluminiumoxyd lieferten die Petroläther-Benzol-(1:1)- und Benzol-Eluate 879 mg Kristalle, die nach dem Umlösen aus Methanol-Wasser 706 mg  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxy-23-keto-cholesten-[24-<sup>14</sup>C] (VI) vom Smp. 141–143° ergaben. Dies entspricht einer Ausbeute von 71% in Bezug auf das eingesetzte Isobutyl-[1-<sup>14</sup>C]-bromid.

<sup>13</sup>) Die Reduktion von Isobuttersäure mit Lithiumaluminiumhydrid<sup>14</sup>) wurde der katalytischen Hydrierung der entsprechenden Ester bei erhöhter Temperatur unter Druck vorgezogen [*T. I. Andrianova & E. A. Andreev*, Doklady Akad. Nauk SSSR. **86**, 1105 (1952); *W. Reeve, D. H. Chambers & C. S. Prickett*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5369 (1952)].

<sup>14</sup>) Vgl. z. B. *R. F. Nystrom & W. G. Brown*, J. Amer. chem. Soc. **69**, 2548 (1947).

<sup>15</sup>) Nach den Angaben der Lieferanten, *Nuclear-Chicago*, Chicago 10, Illinois, USA.

<sup>16</sup>) *L. W. Winkler*, Z. anal. Chem. **52**, 628 (1913).

<sup>17</sup>) *C. R. Noller & R. Dinsmore* in Organic Syntheses, John Wiley and Sons, Inc., New York 1933, Vol. **13**, S. 20.

<sup>18</sup>) *A. I. Vogel*, Practical Organic Chemistry, Longmans, Green and Co., Inc., New York 1956, S. 241.

Die Verbindung zeigte eine Aktivität von  $1,646 \times 10^5$  ipm/mg, entsprechend  $29,7 \mu\text{c}/\text{mMol}^{19}$ ). Eine auf gleichem Weg gewonnene Probe ohne spezielle Markierung vom Smp.  $145-146^\circ$  und  $[\alpha]_D^{24} = -44^\circ$  ( $c = 1,55$ ) gelangte zur Analyse.

$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_2$  Ber. C 80,94 H 11,07% Gef. C 80,73 H 11,30%

Cholesterin-[24- $^{14}\text{C}$ ] (VII). Die Lösung von 705 mg VI und  $2,3 \text{ cm}^3$  100-proz. Hydrazinhydrat in  $46 \text{ cm}^3$  Diäthylenglykol erwärmte man 15 Min. auf  $130^\circ$ . Die abgekühlte Lösung wurde mit 4,661 g Natriumhydroxyd versetzt und dann 2 Std. auf  $230-240^\circ$  erwärmt<sup>9)</sup> 20). Die übliche Aufarbeitung<sup>9)</sup> lieferte 682 mg rohe Verbindung, aus welcher nach chromatographischer Reinigung und Kristallisieren aus 95-proz. Äthanol 476 mg Cholesterin-[24- $^{14}\text{C}$ ] (VII) gewonnen wurden (70% Ausbeute). Smp.  $147-148^\circ$ ; Misch-Smp. mit einem Vergleichspräparat natürlichen Ursprungs vom Smp.  $148-149^\circ$  ohne Erniedrigung. Die Aktivität des Cholesterins-[24- $^{14}\text{C}$ ] war  $1,773 \times 10^5$  ipm/mg, entsprechend  $30,9 \mu\text{c}/\text{mMol}$ . Zur Analyse wurde ein entsprechendes unmarkiertes Präparat bis zum konstanten Smp.  $148-149^\circ$  umkristallisiert;  $[\alpha]_D^{31} = -39^\circ$  ( $c = 1,52$ ).

$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$  Ber. C 83,87 H 11,99% Gef. C 83,81 H 12,03%

Acetylderivat VIII. Eine Probe des unmarkierten synthetischen Cholesterins lieferte in 70% Ausbeute das Acetylderivat VIII vom Smp.  $114-115^\circ$  und  $[\alpha]_D^{22} = -45^\circ$  ( $c = 1,56$ ); Misch-Smp. mit Acetyl-cholesterin (aus natürlichem Cholesterin) vom Smp.  $114$  bis  $115^\circ$  ohne Depression.

Die Mikroanalysen wurden im Laboratorium von Herrn *C. W. Beazley* in Skokie, Illinois, USA. ausgeführt. Die Radioaktivitätsbestimmungen erfolgten durch die *New England Nuclear Corporation*, Boston, Massachusetts, USA. (Vgl. auch Fussnote 19.)

### Zusammenfassung.

Die  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-norcholensäure (III) wurde in das  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-norcholensäurechlorid (IV) übergeführt, das mit Diisobutyl-[1- $^{14}\text{C}$ ]-cadmium unter Bildung von  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Acetoxy-23-keto-cholesten-[24- $^{14}\text{C}$ ] (V) reagierte. Diese Verbindung verseifte man zum  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxy-23-keto-cholesten-[24- $^{14}\text{C}$ ] (VI), dass bei der Reduktion ein Cholesterin-[24- $^{14}\text{C}$ ] (VII) mit einer Radioaktivität von  $30,9 \mu\text{c}/\text{mMol}$  ergab.

Division of Cancer Research,  
Department of Surgery,  
University of Rochester Medical Center,  
Rochester 20, New York, USA.

<sup>19)</sup> Herrn *Kurt I. Altman* vom *Atomic Energy Project* der Universität Rochester sind wir für eine vorläufige Radioaktivitätsbestimmung zu Dank verpflichtet.

<sup>20)</sup> Bei tieferen Reaktionstemperaturen wurde nur eine unvollständige Reduktion erzielt; ein Teil der Reaktionsprodukte, offenbar das Hydrazon, konnte bei  $230-240^\circ$  glatt in Cholesterin übergeführt werden.