

*Zusammenfassung*

3 $\beta$ -Benzoyloxy-cholesten-(1) (IV) ergab bei der Behandlung mit «neutralem» aktiviertem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> drei neue Reaktionsprodukte: Cholestadien-(1,3) (IX) (Elimination), 3 $\alpha$ -Hydroxycholesten-(1) (VII) (Substitution) und einen mit VII isomeren ungesättigten Alkohol, der nicht aufgeklärt wurde. IX wurde auch durch Pyrolyse von IV erhalten. Analog lieferte 3 $\alpha$ -Benzoyloxy-cholesten-(1) (VI) mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 3 $\beta$ -Hydroxycholesten-(1) (II) als Hauptprodukt.

Cholesten-(2)-on-(1) (XI) ging bei der Reduktion mit LiAlH<sub>4</sub> ausschliesslich in 1 $\beta$ -Hydroxycholesten-(2) (XIV) über. Durch Benzoylierung und Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Behandlung von XIV wurde 1 $\alpha$ -Hydroxycholesten-(2) (XVI) erhalten. Nach Acetylierung und Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Chromatographie ergab XIV neben dem Acetylderivat XV ebenfalls den epimeren Alkohol XVI.

Bei den Reaktionen mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> wurden keine Allylumlagerungen beobachtet.

Im Gegensatz zu den  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Benzoyloxy-Verbindungen waren die entsprechenden gesättigten Benzoylderivate an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> weitgehend beständig. 3 $\alpha$ - und 3 $\beta$ -Benzoyloxy-cholestan lieferten beide etwas Cholesten-(2) (Elimination) und durch Verseifung etwas freien, nicht epimerisierten Alkohol.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel und  
Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel

**235. Über eine Substitutionsreaktion  
bei 3-Benzoyloxy-cholesten-(1) durch Aluminiumoxyd:  
Untersuchung mit Hilfe von isotopem Sauerstoff**

von H. Dahn, R. Menassé und Ch. Tamm

(27. VIII. 59)

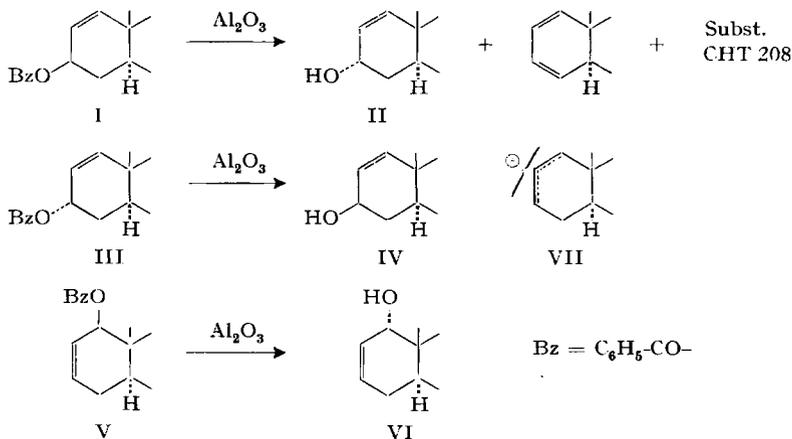
In der vorhergehenden Mitteilung<sup>1)</sup> wurde berichtet, dass gewisse Allylbenzoate der Steroidreihe, nämlich 3 $\beta$ -Benzoyloxy-cholesten-(1) (I), 3 $\alpha$ -Benzoyloxy-cholesten-(1) (III) und 1 $\beta$ -Benzoyloxy-cholesten-(2) (V) bei Behandlung mit Aluminiumoxyd die epimeren Alkohole II bzw. IV bzw. VI liefern.

Für diese Reaktion lassen sich verschiedene Mechanismen formulieren: es ist denkbar, dass das Benzoat in 2 Stufen hydrolysiert und epimerisiert wird, wobei die Reihenfolge dieser beiden Schritte nicht *a priori* feststeht; es ist aber auch denkbar, dass die Benzoyloxygruppe als Ganzes durch OH ersetzt wird. Der erstgenannte Weg einer *O-Acyl*spaltung kommt dem normalen Hydrolysemechanismus von Estern gleich<sup>2)</sup>; Hydrolyse durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> wurde bei gesättigten Steroidbenzoaten nachgewiesen: z. B. wird Cholestanol-(3 $\beta$ )-benzoat durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> zu ca. 10% zu Cholestanol verseift, wobei keine Inversion eintritt<sup>1)</sup>. Zugunsten der Annahme des zweiten Weges, der einer *O-Alkyl*spaltung entspricht und bei Allylestern nicht ungewöhnlich ist<sup>2)</sup>, kann man die beobachtete Inversion anführen. Eine eindeutige Entscheidung

<sup>1)</sup> CH. TAMM & R. ALBRECHT, Helv. **42**, 2177 (1959).

<sup>2)</sup> C. K. INGOLD, Structure and Mechanism in Organic Chemistry, London 1953.

zwischen O-Alkyl- und O-Acylspaltung von Estern ist seit POLANYI's<sup>3)</sup> und UREY's<sup>4)</sup> klassischen Untersuchungen mit Hilfe von Markierung mit isotopem Sauerstoff möglich. Wir berichten im folgenden über die Ergebnisse der Umsetzung zwischen <sup>18</sup>O-signiertem Ester I und unsigniertem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



Die isotope Markierung mit <sup>18</sup>O geschieht am einfachsten über Carbonylverbindungen: diese tauschen in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O ihren Sauerstoff *via* Hydratbildung gegen <sup>18</sup>O aus<sup>5)</sup>. Cholesten-(1)-on-(3) (VIII) stellt daher ein passendes Ausgangsmaterial dar; wegen geringer Löslichkeit in Wasser musste der Sauerstoff-Austausch zwischen VIII und H<sub>2</sub><sup>18</sup>O in 85-proz. Dioxan-Wasser durchgeführt werden. Nach COHN & UREY<sup>6)</sup> ist der Sauerstoff-Austausch zwischen Aceton und Wasser bei 100° nicht sehr rasch;  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketone sind weniger elektrophil als gesättigte Ketone, sollten also noch langsamer reagieren. In der Tat fanden wir, dass VIII\*<sup>5)</sup> nach 24 Std. Kochen unter Rückfluss mit Dioxan-Wasser weniger als 20% der Wassermarkierung aufgenommen hatte<sup>7)</sup>. Wie bei Aceton<sup>6)</sup> ist auch bei VIII die Austauschreaktion einer starken Säurekatalyse unterworfen: in Gegenwart von  $2 \cdot 10^{-3}$ -m. HCl war der Austausch nach zwei Stunden bei ca. 100° nahezu quantitativ; das erhaltene VIII\* enthielt 1,40 At.-% <sup>18</sup>O-Tracer<sup>8)</sup>. Reduktion mit LiAlH<sub>4</sub> lieferte Cholesten-(1)-ol-(3 $\beta$ )-[<sup>18</sup>O] (IV\*) von nahezu unverändertem Tracergehalt: 1,36 At.-%. Zur Veresterung von IV\* wurde <sup>18</sup>O-signiertes Benzoylchlorid verwendet (1,49% Tracergehalt); dies geschah, um interne Umlagerungen, die unter Beteiligung der Carbonylgruppe erfolgen können (S<sub>N</sub>i', S<sub>N</sub>i), mit Sicherheit auszuschliessen. Der Tracergehalt des gebildeten 3 $\beta$ -Benzoyloxy-cholesten-(1)-[bis <sup>18</sup>O] (I\*) sollte auf Grund der Synthese dem Mittelwert aus den beiden Ausgangsstoffen gleichkommen; dies wurde in der Tat gefunden: IV\* gef. 1,42; ber. 1,42 At.-% <sup>18</sup>O-Tracer.

<sup>3)</sup> M. POLANYI & A. L. SZABO, Trans. Farad. Soc. **30**, 508 (1934).

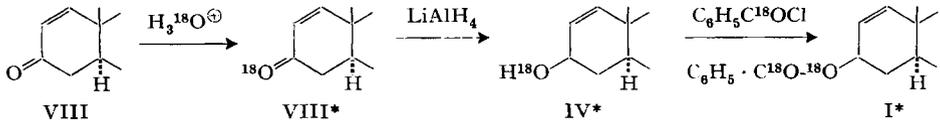
<sup>4)</sup> I. ROBERTS & H. C. UREY, J. Amer. chem. Soc. **60**, 2391 (1938).

<sup>5)</sup> <sup>18</sup>O-signierte Verbindungen sind in den Formelnummern durch einen Stern markiert.

<sup>6)</sup> M. COHN & H. C. UREY, J. Amer. chem. Soc. **60**, 679 (1938).

<sup>7)</sup> <sup>18</sup>O-Analysenmethode: H. DAHN, H. MOLL & R. MENASSÉ, Helv. **42**, 1225 (1959).

<sup>8)</sup> Natürlicher Sauerstoff enthält ca. 0,21 At.-% <sup>18</sup>O; unter «Tracergehalt» oder «Markierung» ist der Überschuss an <sup>18</sup>O über den am gleichen Tag bestimmten <sup>18</sup>O-Gehalt des verwendeten unmarkierten CO<sub>2</sub> zu verstehen.



Die Behandlung von I\* in Benzol-Äther mit unsigniertem Aluminiumoxyd geschah wie beschrieben<sup>1)</sup> und lieferte die gleichen Produkte in ungefähr gleichen Ausbeuten. Die Produkte wurden auf  $^{18}\text{O}$  analysiert<sup>7)</sup>: 3 $\alpha$ -Hydroxy-cholesten-(1) (II) enthielt nur 0,01 At.-%  $^{18}\text{O}$ -Tracer, d. h. es war innerhalb der Fehlergrenze tracerfrei. Das «Kristallgemisch» unbekannter Konstitution besass noch 0,16 At.-% Tracer, hatte also 90% der Markierung verloren. Das chemisch scheinbar unverändert zurückgewonnene Ausgangsmaterial I\* hatte auf der Säule ca. 12% seines Tracers eingebüsst. – Zur Kontrolle wurde auch der signierte Alkohol IV\* mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  behandelt; er blieb in Struktur und räumlichem Bau unverändert und erlitt lediglich geringfügigen Tracerverlust (< 4%).

Tabelle 1.  $^{18}\text{O}$ -Markierung

Verbindung	At.-% $^{18}\text{O}$ -Tracer <sup>8)</sup>
Cholesten-(1)-on-(3) (VIII*) . . . . .	1,40
Cholesten-(1)-ol-(3 $\beta$ ) (IV*) . . . . .	1,36
nach Behandlung mit $\text{Al}_2\text{O}_3$ . . . . .	1,31
Benzoylchlorid . . . . .	1,49
3 $\beta$ -Benzoyloxy-cholesten-(1) (I*): . . . . .	1,42
$\text{Al}_2\text{O}_3$ -Produkte aus I*	
Cholesten-(1)-ol-(3 $\alpha$ ) (II) . . . . .	0,01
«Kristallgemisch» . . . . .	0,16
3 $\beta$ -Benzoyloxy-cholesten-(1) (I*) . . . . .	1,25

Der völlige Verlust von Tracer beim Übergang vom Benzoat I\* in den epimeren Alkohol II schliesst Mechanismen der Acyl-O-Spaltung aus und beweist Alkyl-O-Spaltung. Demgemäss sind direkte Substitutionen der Benzoat-durch die HO-Gruppe, die aus dem Aluminiumoxyd stammt, zu betrachten. Die Reaktion geht zweifellos nicht im unpolaren Lösungsmittel (Benzol-Äther-Gemisch), sondern an der stark polaren Oberfläche des Aluminiumoxyds vor sich, d. h. der Ester wird vermutlich zuerst adsorbiert, bevor die Alkyl-O-Bindung gebrochen wird. Aluminiumoxyd ist amphoter: seine Wirkung als saurer Katalysator geht zum Beispiel aus Eliminationsreaktionen der Alkohole<sup>9)</sup> hervor. Andererseits können Nucleophile in den  $\text{H}_2\text{O}$ - und  $\text{HO}^{\ominus}$ -Partikeln, die die Oberfläche von  $\text{Al}_2\text{O}_3$  bedecken, sowie in  $\text{Al-O}^{\ominus}$ -Gruppen erblickt werden; als Beispiel einer entsprechenden Wirkung sei die Verseifung von Toluolsulfosäureestern (die bekanntlich unter Alkyl-O-Spaltung erfolgt) durch Aluminiumoxyd erwähnt, die bei gesättigten Steroidtosylaten unter Inversion vor sich geht<sup>10)</sup>.

<sup>9)</sup> Beispiele aus der Steroid-Reihe: L. H. SARETT, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1454 (1948); Cyanhydrin; K. FLOREY & M. EHRENSTEIN, J. org. Chemistry **19**, 1331 (1954); E. J. BECKER & M. EHRENSTEIN, Liebigs Ann. Chem. **608**, 54 (1957); R. P. MARTIN & CH. TAMM, Helv. **42**, 696 (1959):  $\beta$ -Keto-alkohole.

<sup>10)</sup> R. J. W. CREMLYN & C. W. SHOPPEE, J. chem. Soc. **1957**, 3515; F. C. CHANG & R. T. BLICKENSTAFF, Chemistry & Ind. **1958**, 590; J. Amer. chem. Soc. **80**, 2726 (1958); G. H. DOUGLAS, P. S. ELLINGTON, G. D. MEAKINS & R. SWINDELLS, J. chem. Soc. **1959**, 1720.

Wenn Aluminiumoxyd in unserem Fall als saurer Katalysator wirken würde, so wäre zu erwarten, dass Alkohole ebenso reagieren wie die zugehörigen Ester<sup>2)</sup>11); dagegen lassen basenkatalysierte Substitutionsmechanismen einen grossen Unterschied zwischen Alkohol und Ester erwarten, weil OH<sup>⊖</sup> eine sehr viel ungünstigere Abgangsgruppe darstellt als ein resonanzstabilisiertes Säureanion wie Benzoat. In der Tat wurde gefunden, dass die Alkohole II und IV im Gegensatz zu ihren Benzoaten von Aluminiumoxyd nicht verändert werden: unsere Reaktion ist also mit den basischen Hydrolysemechanismen (mit Alkyl-O-Spaltung) zu vergleichen.

Substitutionen am Allylsystem<sup>11)2)</sup> unter Alkyl-O-Spaltung können prinzipiell nach zwei Mechanismen vor sich gehen, nämlich entweder einstufig oder in zwei Stufen über ein Carboniumion als Zwischenprodukt. Der einstufige Mechanismus, der in homogener Lösung bimolekulare Kinetik zeigen kann, erfolgt mit oder ohne Allylumlagerung (S<sub>N</sub>2' bzw. S<sub>N</sub>2); beide Fälle sind bekannt, die Substitution ohne Umlagerung ist jedoch weitaus häufiger. Das Carboniumion-Zwischenprodukt dagegen, das in homogenem System durch S<sub>N</sub>1-Prozesse gebildet wird, führt zu einem Gleichgewichtsgemisch von umgelagertem und unumgelagertem Produkt (S<sub>N</sub>1' bzw. S<sub>N</sub>1), vorausgesetzt dass das freie Carboniumion genügende Lebensdauer besitzt, um seine stabilste Konfiguration zu erreichen. Bei Allylalkoholen und Allylestern in homogenem System tritt die S<sub>N</sub>1- und S<sub>N</sub>1'-Reaktion vor allem bei Säurekatalyse ein; die S<sub>N</sub>2- und S<sub>N</sub>2'-Reaktion wird in homogenem System z. B. bei Allylhalogeniden durch Nucleophile bewirkt. In heterogenem System, wie z. B. an Aluminiumoxydoberflächen, verlieren die Ausdrücke S<sub>N</sub>1, S<sub>N</sub>2 usw. ihre aus homogenem System stammende kinetische Bedeutung; sie bleiben jedoch nützlich, um zwischen verschiedenen Reaktionstypen zu differenzieren; daher benutzen wir die Ausdrücke in Anführungszeichen («S<sub>N</sub>1» usw.).

Unser stereochemischer Befund der Inversion ist mit der Annahme eines einstufigen Reaktionsverlaufes («S<sub>N</sub>2»<sup>12)</sup> im Einklang, ebenso die Abwesenheit von Säurekatalyse. Ferner sollten nach «S<sub>N</sub>2» axiale Gruppen leichter ersetzt werden als äquatoriale<sup>13)</sup>; in der Tat fanden wir bei III mit axialer<sup>14)</sup> Benzoyloxygruppe bessere Ausbeute an epimerem Alkohol (48%) als bei dem äquatorialen I (24–34%)<sup>15)</sup>.

<sup>11)</sup> R. H. DEWOLFE & W. G. YOUNG, Chem. Reviews **56**, 753 (1956).

<sup>12)</sup> In homogenem System wird der Mechanismus der einstufigen basenkatalysierten Esterhydrolyse unter Alkyl-O-Spaltung nach der INGOLD'schen<sup>2)</sup> Nomenklatur als B<sub>AL</sub>2 bezeichnet. Dieser Hydrolysemechanismus wurde bisher nur selten beobachtet: W. A. COWDREY, E. D. HUGHES, C. K. INGOLD, S. MASTERMAN & A. D. SCOTT, J. chem. Soc. **1937**, 1252; F. A. LONG & M. PURCHASE, J. Amer. chem. Soc. **72**, 3267 (1950): β-Lactone.

<sup>13)</sup> S. WINSTEIN, D. DARWISH & N. J. HOLNESS, J. Amer. chem. Soc. **78**, 2915 (1956), fanden bei 4-tert. Butyl-cyclohexyltosylat ein Geschwindigkeitsverhältnis von axial zu äquatorial = ca. 7.

<sup>14)</sup> In der Allylstellung von Cyclohexen besteht kein Unterschied zwischen äquatorial und axial; Modelle zeigen indessen, dass in Δ<sup>1</sup>-Steroiden infolge *trans*-Anellierung Ring A so verzerrt ist, dass sich 3-äquatorial und 3-axial fast wie in gesättigten Ringen unterscheiden lassen.

<sup>15)</sup> Alle drei Benzoate zeigten an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Elimination von Benzoesäure unter Bildung von Cholestadien-(1,3): I lieferte 4%, V 3% Dien. Bei III lässt sich die Ausbeute nicht angeben, da nur 21 mg Ausgangsmaterial eingesetzt werden konnten. Die Eliminationsreaktion muss mit den Benzoaten und nicht mit den daraus gebildeten Alkoholen geschehen, da die letzteren sich gegen Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> als stabil erwiesen<sup>1)</sup>. WINSTEIN, DARWISH & HOLNESS<sup>13)</sup> fanden, dass bei der basenkatalysierten Elimination (E2) eine axiale Tosylatgruppe nur doppelt so rasch reagiert wie eine äquatoriale.

Die Bildung von *freien* Carboniumionen von ausreichender Lebensdauer ist zweifellos auszuschliessen, obwohl man in der polaren Aluminiumoxydoberfläche ein ionisationsförderndes Milieu erblicken kann: die Allylverbindungen I, III und V sollten dabei das gleiche freie Carboniumion VII liefern, und aus diesem sollten die gleichen Produkte entstehen; wir fanden jedoch, dass I, III und V verschiedene Produkte geben. Ferner wäre bei Bildung von *freien* Carboniumionen wenigstens bei einem Teil der Ausgangsmaterialien Allylumlagerung zu erwarten<sup>11)</sup>; dies wird in unserem Fall dadurch bestätigt, dass Cholesten-(1-ol)-(3 $\alpha$ ) (II) durch CrO<sub>3</sub> in Eisessig, also unter S<sub>N</sub>1-ähnlichen Bedingungen, ein Gemisch von Cholesten-(1-on)-(3) (VIII) und Cholesten-(2-on)-(1) liefert<sup>1)</sup>. Nach Behandlung von I, III und V mit Aluminiumoxyd konnten jedoch in keinem Fall Allylumlagerungsprodukte mit Sicherheit nachgewiesen werden<sup>16)</sup>, was wiederum gegen das Vorliegen von freien Carboniumionen VII von ausreichender Lebensdauer und für einen einstufigen Reaktionsablauf spricht.

Diese Überlegungen schliessen indessen nicht das Vorliegen von Ionenpaaren aus: falls die Ionen PhCOO<sup>⊖</sup> und R<sup>⊕</sup> an der Aluminiumoxydoberfläche nahe beieinander festgehalten werden, dann ist denkbar, dass das Benzoat-Ion das Carbonium-Ion so abschirmt, dass das hinzutretende Nucleophil (OH<sup>⊖</sup> oder H<sub>2</sub>O) nur unter Inversion reagieren kann; ferner ist denkbar, dass unter diesen Bedingungen die Allylumlagerung ausbleibt, weil das Carbonium-Ion nicht flach werden kann; d. h. alle geschilderten Charakteristika der «S<sub>N</sub>2»-Reaktion lassen sich auch mit der Annahme einer «S<sub>N</sub>1»-Reaktion mit fixierten Ionenpaaren deuten. Eine Entscheidung ist zur Zeit nicht möglich; es ist überhaupt fraglich, ob die klassische Unterscheidung der Reaktionstypen auf die betrachteten Reaktionen an Aluminiumoxydoberflächen noch anwendbar sei<sup>17)</sup>.

Der hier untersuchte Fall einer basischen Alkyl-O-Spaltung eines Esters unterscheidet sich fundamental von der normalen basenkatalysierten Esterhydrolyse, die unter Acyl-O-Spaltung erfolgt und auch bei Allylestern in homogenem System die Hauptrolle spielt<sup>18)</sup>. Acyl-O-Spaltung bedeutet Angriff des Nucleophils am Carbonylkohlenstoff, Alkyl-O-Spaltung Angriff am viel weniger elektrophilen Alkylkohlenstoff. Man kann daher fragen, welche Umstände hier zu einer Begünstigung der Alkyl-O-Spaltung an Aluminiumoxyd führen.

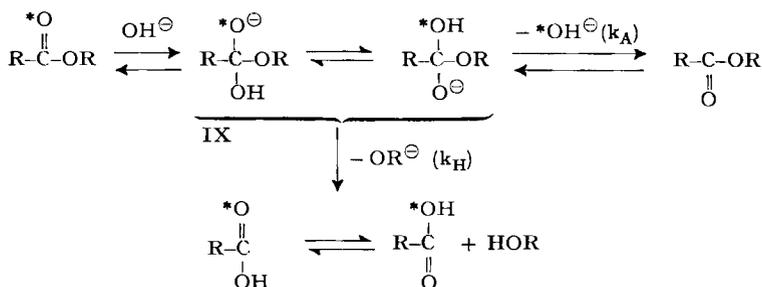
In diesem Zusammenhang ist die oben erwähnte Beobachtung von Bedeutung, dass das Benzoat I\*, nachdem es scheinbar unverändert vom Aluminiumoxyd zurückgewonnen war, 12% Tracer verloren hatte. Der Verlust von <sup>18</sup>O war noch ausgeprägter in einem Vorversuch mit I\*, das vor allem in der Carbonylgruppe markiert war (0,26% Tracer in der Alkoxy- und 0,76% in der Carbonylgruppe; mittlerer Gehalt gef. 0,48%): durch Behandlung mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sank der mittlere Tracergehalt auf ca. ein Drittel (0,18%). Der stärkere Verlust deutet darauf hin, dass es in beiden Fällen Sauerstoff vor allem aus der Carbonylgruppe ist, der ausgetauscht wird. Hierfür spricht ferner, dass wir fanden, dass auch Benzanilid an Aluminiumoxyd Tracer aus der Carbonylgruppe verliert.

<sup>16)</sup> Wenn auch die angewendete Technik der Chromatographie nur lückenhafte Erfassung der Produkte gestattet, so glauben wir doch, dass keine Hauptprodukte unerkannt geblieben sind. Möglicherweise enthält das aus I in 13% Ausbeute erhaltene «Kristallgemisch» unbekannter Zusammensetzung geringe Mengen an Produkten der Allylumlagerung.

<sup>17)</sup> Wir danken Herrn Dr. C. A. BUNTON, London, für diesen und andere wertvolle Hinweise.

<sup>18)</sup> J. KENYON, S. M. PARTRIDGE & H. PHILLIPS, J. chem. Soc. **1936**, 85; **1937**, 207; H. W. J. HILLS, J. KENYON & H. PHILLIPS, *ibid.* **1936**, 576.

Sauerstoffaustausch zwischen Ester und Wasser wurde von BENDER<sup>19)</sup> bei der Einwirkung von Säure oder Lauge in homogener wässriger Lösung gefunden, neben überwiegender Hydrolyse. Zur Deutung nahm BENDER ein Zwischenprodukt an, das in Formel IX für den Fall der Basenkatalyse formuliert ist. IX kann in drei Richtungen zerfallen: wenn das Nucleophil direkt abgespalten wird, erhält man unveränderten Ester zurück; wenn das Proton auf  $-*O^\ominus$  übergeht und dann das Nucleophil  $*OH^\ominus$  abgespalten wird, erhält man Ester unter Sauerstoffaustausch; wenn die Alkoxygruppe austritt, erhält man die Hydrolysenprodukte. Der letztere Weg überwog in BENDER's Versuchen um das 3- bis 10-fache, d. h.  $k_H > k_A$ ; daher wurde Sauerstoffaustausch nur als Nebenreaktion neben Esterhydrolyse (O-Acyl-Spaltung) beobachtet.



Überträgt man diesen Mechanismus des Tracerverlustes auf unseren Fall des Aluminiumoxyds als Reagens, so ist auch hier Angriff auf das Carbonylkohlenstoffatom wahrscheinlich; man kann annehmen, dass ein Nucleophil aus der Oberfläche des Aluminiumoxyds ( $OH^\ominus$  oder  $H_2O$ ) auch hier ein Zwischenprodukt vom Typus IX entstehen lässt, das Protonenwanderung und Wiederabspaltung des Nucleophils erleiden kann. Aus dem Ausbleiben der O-Acyl-Hydrolyse ist jedoch zu schliessen, dass IX im vorliegenden Fall die Alkoxygruppe nicht oder nur langsam abspalten kann, d. h.  $k_H < k_A$ . Wir erklären dies damit, dass sowohl der Steroid- als auch der Benzoylteil des Esters an  $Al_2O_3$  adsorbiert sind; wenn die Bindung zwischen beiden durch O-Acylspaltung im Zwischenprodukt IX gelöst wird, so bleiben die beiden in der Nähe voneinander fixiert, so dass durch blosse Umgruppierung der Elektronen das Additionsprodukt IX zurückgebildet wird. Dies kommt einer Hemmung der Hydrolyse unter O-Acylspaltung<sup>20)</sup> gleich (Fig. 1, oberer Teil).

Man kann sich fragen, ob diese Betrachtungsweise der Fixierung der Reaktionsprodukte nicht auch die (beobachtete) Hydrolyse unter Alkyl-O-Spaltung an  $Al_2O_3$  verbietet; eine genauere Betrachtung zeigt, dass dies nicht zutrifft. In diesem Fall tritt nämlich Inversion ein; dadurch gelangt das Wasserstoffatom zwischen abge-

<sup>19)</sup> M. BENDER, J. Amer. chem. Soc. **73**, 1626 (1951); M. BENDER, R. D. GINGER & J. P. UNIK, *ibid.* **80**, 1044 (1958).

<sup>20)</sup> Für den  $^{18}O$ -Verlust an  $Al_2O_3$  war noch eine andere Erklärung denkbar: Wenn  $I^*$  in das oben erwähnte, an  $Al_2O_3$  fixierte Ionenpaar zerfällt, so wäre möglich, dass das Benzoat-Ion oder Benzoesäure  $^{18}O$ -Austausch erleidet und die Ionen sich anschliessend rekombinieren. Wir fanden jedoch, dass Benzoesäure- $[^{18}O]$  an Aluminiumoxyd nur unbedeutend  $^{18}O$  verliert (ca. 1%), womit diese Erklärung ausscheidet.

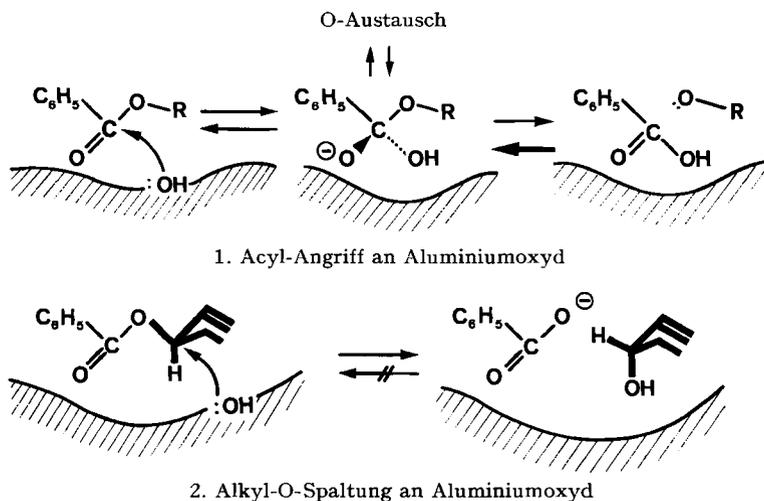


Fig. 1. Vergleich von Acyl-O- und Alkyl-O-Spaltung von Estern an Aluminiumoxyd: Inversion hindert die Rekombination der adsorbierten Hydrolyseprodukte (R = Steroidrest)

spaltenes Benzoat-Ion und Alkylkohlenstoff und schirmt sie gegeneinander ab (Fig. 1, unterer Teil). Um diese Reaktion rückgängig zu machen, ist die beträchtliche Anregungsenergie der bimolekularen Reaktion erforderlich, und solange die Partner an Aluminiumoxyd adsorbiert sind, fehlt ihnen die nötige kinetische Energie zur Überwindung der Energiebarriere.

Wir danken der *Kommission für Atomwissenschaft des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Dr. C. A. BUNTON, London, und Herrn Dr. M. THÜRKAUF, Basel, für die Überlassung von  $H_2^{18}O$ .

### Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden auf dem KOFLEER-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze bis  $200^\circ$  etwa  $\pm 2^\circ$ , darüber etwa  $\pm 3^\circ$ . Substanzproben zur  $^{18}O$ -Analyse wurden 1 Std. bei 0,02 Torr und  $50\text{--}70^\circ$  getrocknet. Die Chromatographien zur Stofftrennung wurden, soweit nicht anderes angegeben, nach dem Durchlaufverfahren<sup>21)</sup> an neutralem  $Al_2O_3$  der Aktivitätsstufe I der Fa. M. WOELM, Eschwege, Deutschland, durchgeführt. Andere Aluminiumoxydsorten gaben teilweise abweichende Resultate.

*Cholesten-(1)-on-(3)-[ $^{18}O$ ] (VIII\*) aus Cholesten-(1)-on-(3) (VIII).* – 1. Versuch (ohne Säurekatalyse): 3,0 g Cholesten-(1)-on-(3) (VIII) vom Smp.  $94\text{--}98^\circ$  wurden zweimal mit Benzol abgedampft und mit 5 ml  $H_2^{18}O$  ( $^{18}O$ -Überschuss 1,17 At.-%) und 30 ml Dioxan (frisch gereinigt) 24 Std. unter Rückfluss erhitzt. Hierauf wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand zweimal mit Benzol abgedampft. 91,6; 45,0 mg Subst. (0,238; 0,117 mMol) wurden mit 0,95; 0,53 mMol o-Phenylendiamin-monohydrochlorid (PM) + 0,141; 0,142 mMol  $CO_2$  (0,215 At.-%  $^{18}O$ ) geheizt.  $r = 0,005823$ ;  $0,005404$ .  $A_{gef.} = 0,291$ ;  $0,269$ .  $^{18}O$ -Tracergehalt: 0,164; 0,185 At.-%.

2. Versuch (mit Säurekatalyse): 3,5 g Cholesten-(1)-on-(3) (VIII) vom Smp.  $94\text{--}98^\circ$  wurden wie oben getrocknet, mit 40 ml Dioxan- $H_2^{18}O$ -Gemisch (Stammlösung: 100 ml bestehend aus 16,65 g  $H_2^{18}O$  ( $^{18}O$ -Überschuss: 1,595 At.-%) und 86,72 g Dioxan (frisch gereinigt)) und 0,04 ml 2-n. HCl 2 Std. unter Rückfluss erhitzt. Hierauf wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft

<sup>21)</sup> T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Disc. Farad. Soc. Nr. 7, 305 (1949).

und mehrmals mit Benzol abgedampft. 34,5 mg Subst. (0,0899 mMol) wurden mit 0,24 mMol PM + 0,0756 mMol CO<sub>2</sub> (0,210 At.-% <sup>18</sup>O) geheizt.  $r = 0,01476$ .  $A_{\text{gef.}} = 0,733$ . <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 1,405 At.-%.

*Cholesten-(1)-ol-( $\beta$ )-[<sup>18</sup>O] (IV\*) aus VIII\**. Eine Lösung von 3,35 g VIII\* (1,40 At.-% <sup>18</sup>O-Tracergehalt) in 60 ml Äther wurde innert 30 Min. zu einer Suspension von 1,2 g LiAlH<sub>4</sub> in 165 ml abs. Äther zugetropft, dann 1 Std. unter Rückfluss erhitzt und wie früher beschrieben<sup>1)</sup> aufgearbeitet. Es resultierten 3,5 g Rohprodukt, das aus Äther-Methanol 1,9 g Kristalle vom Smp. 129–133° lieferte. Die Mutterlaugenrückstände wurden an 14 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> rasch chromatographiert. Die mit Benzol und Benzol-Äther-Gemischen und Äther eluierten Fraktionen ergaben aus Äther-Methanol noch 450 mg Kristalle vom Smp. 128–131°. Die beiden Kristallfraktionen wurden vereinigt und zur Homogenisierung und Trocknung mehrmals mit Benzol abgedampft. 34,2; 47,1 mg Subst. (0,0886; 0,122 mMol) wurden mit 0,28; 0,31 mMol PM + 0,0766; 0,0760 mMol CO<sub>2</sub> (0,212; 0,210 At.-% <sup>18</sup>O) geheizt.  $r = 0,01433$ ; 0,01633.  $A_{\text{gef.}} = 0,712$ ; 0,810. <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 1,364; 1,348; Mittelwert: 1,36 At.-%.

*3 $\beta$ -Benzoyloxy-cholesten-(1)-[bis-<sup>18</sup>O] (I\*) aus IV\**. Benzoesäure-[bis-<sup>18</sup>O] wurde durch 5-tägiges Kochen von Benzoesäure in der 20-fachen Menge ca. 1-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O hergestellt. <sup>18</sup>O-Bestimmung durch Umwandlung ins Ag-Salz und thermische Decarboxylierung:  $r = 0,03461$ ; 0,03469.  $A_{\text{gef.}} = 1,701$ ; 1,705 (CO<sub>2</sub>-Standard: 0,211 At.-% <sup>18</sup>O). <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 1,490; 1,494 At.-%. Hieraus wurde mittels Thionylchlorid Benzoylchlorid-[<sup>18</sup>O] von gleichem Tracergehalt (1,49 At.-%) bereitet.

Eine Lösung von 2,05 g IV\* in 16 ml abs. Pyridin wurde bei 0° mit 2,75 ml Benzoylchlorid-[<sup>18</sup>O] (entspr. 4,5 Mol) versetzt und 17 Std. bei 20–22° stehengelassen. Hierauf wurde bei 0° mit 5 ml Methanol versetzt, im Vakuum eingengt, in Äther aufgenommen, die Ätherlösung mit 2-n. HCl, 2-n. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und Wasser mehrmals gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Aus Äther-Methanol 2,29 g Kristalle vom Doppel-Smp. 122°/132–137°. 40,9; 28,3 mg Subst. (0,0836; 0,0579 mMol) wurden mit 0,30; 0,34 mMol PM und 0,0766; 0,0760 mMol CO<sub>2</sub> (0,212; 0,210 At.-% <sup>18</sup>O) geheizt.  $r = 0,01912$ ; 0,01657.  $A_{\text{gef.}} = 0,947$ ; 0,822. <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 1,428; 1,413; Mittelwert: 1,42 At.-%.

*Behandlung von 3 $\beta$ -Benzoyloxycholesten-(1)-[bis-<sup>18</sup>O] (I\*) mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*. Eine Lösung von 1,95 g I\* vom Doppel-Smp. 122°/132–137° in Petroläther wurde auf eine Säule mit 100 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (neutral, Aktivitätsstufe I) gegeben und 18 Std. stehengelassen. Hierauf wurde wie üblich chromatographiert. Die weitere, genau nach früheren Angaben<sup>1)</sup> durchgeführte Trennung ergab:

A. 63 mg Cholestadien-(1,3) vom Smp. 67–68°.

B. 175 mg Ausgangsmaterial I\* vom Doppel-Smp. 129–134°/143–148°. 33,0; 36,4 mg Subst. (0,0675; 0,0744 mMol) wurden mit 0,21; 0,30 mMol PM und 0,0760; 0,0760 mMol CO<sub>2</sub> (0,215; 0,210 At.-% <sup>18</sup>O) geheizt.  $r = 0,01639$ ; 0,01667.  $A_{\text{gef.}} = 0,813$ ; 0,827. <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 1,260; 1,249; Mittelwert: 1,25 At.-%.

C. 358 mg 3 $\alpha$ -Hydroxycholesten-(1) (II) vom Smp. 109–111°. 51,6; 25,8 mg Subst. (0,1337; 0,0667 mMol) wurden mit 0,21; 0,21 mMol PM und 0,0760; 0,0760 mMol CO<sub>2</sub> (0,215; 0,210 At.-% <sup>18</sup>O) geheizt.  $r = 0,00440$ ; 0,00430.  $A_{\text{gef.}} = 0,220$ ; 0,215. <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 0,008; 0,013; Mittelwert: 0,01 At.-%.

D. 38 mg Subst. CHT 208 vom Smp. 163–164°.

E. 207 mg «Kristallgemisch» (Alkohole) vom Smp. 103–148°. 30,5; 21,7 mg Subst. (0,0791; 0,0562 mMol, ber. auf MG = 386) wurden mit 0,19; 0,27 mMol PM und 0,0760; 0,0760 mMol CO<sub>2</sub> (0,215; 0,210 At.-% <sup>18</sup>O) geheizt.  $r = 0,00527$ ; 0,00518.  $A_{\text{gef.}} = 0,262$ ; 0,259. <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 0,137; 0,178; Mittelwert: 0,16 At.-%.

In einem zweiten Versuch wurde I\* mit 0,262 At.-% Tracergehalt in der Alkoxygruppe und 0,757 At.-% Tracergehalt in der Carbonylgruppe (mittlerer <sup>18</sup>O-Tracergehalt: ber. 0,509; gef. 0,480 At.-%) mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> behandelt. Es wurden 8% I\* zurückgewonnen, deren mittlerer Tracergehalt auf 0,181 At.-% gesunken war.

*Behandlung von Cholesten-(1)-ol-( $\beta$ )-[<sup>18</sup>O] (IV\*) mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*. 50,1 mg IV\* (<sup>18</sup>O-Tracergehalt: 1,36 At.-%) wurden in 20 ml Petroläther gelöst auf eine Säule von 4,5 g Aluminiumoxyd gebracht, mit 50 ml Benzol-Petroläther (1:1), 60 ml Benzol und 75 ml Benzol-Äther (10:1) gespült

und 15 Std. auf der Säule stehengelassen. Dann wurde mit 75 ml Benzol-Äther (1:1) eluiert, wobei 32 mg IV\* vom Smp. 125–129° erhalten wurden. 10,21; 8,89 mg Subst. (0,0264; 0,0230 mMol) wurden mit 0,16; 0,25 mMol PM und 0,0763; 0,0763 mMol CO<sub>2</sub> (0,218 At.-% <sup>18</sup>O) geheizt: r = 0,00826; 0,00781. A<sub>gef.</sub> = 0,411; 0,389. <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 1,309; 1,307; Mittelwert: 1,31 At.-%.

In einem Vorversuch, bei dem 200 mg IV\* (von 0,254; 0,270 At.-% Tracergehalt) an 6 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert wurden, wurden 167 mg IV\* vom Smp. 124–128° mit 0,271; 0,273 At.-% <sup>18</sup>O-Tracergehalt erhalten.

*Behandlung von Benzanilid-[<sup>18</sup>O] mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.* 103 mg Benzanilid (<sup>18</sup>O-Tracergehalt: 0,87 At.-%) wurden in 50 ml Petroläther gelöst auf eine Säule von 4,5 g Aluminiumoxyd gebracht, mit 50 ml Benzol-Petroläther (1:1) gespült und 15 Std. auf der Säule stehengelassen. Dann wurde mit 100 ml Benzol eluiert, wobei 73 mg Benzanilid vom Smp. 162–164° erhalten wurden. 25,6; 36,8; 15,8 mg Subst. (0,130; 0,187; 0,0802 mMol) wurden mit 0,23; 0,25; 0,51 mMol PM und 0,0768; 0,0768; 0,0767 mMol CO<sub>2</sub> (0,214; 0,214; 0,221 At.-% <sup>18</sup>O) geheizt. r = 0,01181; 0,01325; 0,01030. A<sub>gef.</sub> = 0,587; 0,658; 0,512. <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 0,814; 0,809; 0,849; Mittelwert: 0,82 At.-%.

*Behandlung von Benzoesäure-[<sup>18</sup>O] mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.<sup>22</sup>* 1,0 g Benzoesäure-[<sup>18</sup>O] (8 mMol) wurde in 50 ml Benzol-Petroläther (1:1) gelöst auf eine Säule von 20 g Aluminiumoxyd (MERCK, «standardisiert nach BROCKMANN») <sup>23</sup> gebracht und 14 Std. stehen gelassen; dann wurde das Aluminiumoxyd ausgestossen, abfiltriert und mit Benzol gewaschen: die vereinigten Lösungsmittel enthielten keine Benzoesäure. Das getrocknete Aluminiumoxyd wurde mit 50 ml ca. 0,4-m. wässrigem Ammoniak digeriert und abfiltriert. Die alkalische Lösung wurde mit HNO<sub>3</sub> auf pH 7–8 neutralisiert und unter kräftigem Rühren mit 1,36 g AgNO<sub>3</sub> (8 mMol) in 20 ml Wasser + 1 Tropfen konz. HNO<sub>3</sub> versetzt. Ag-Benzooat-[<sup>18</sup>O] wurde abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und 48 Std. im Dunkeln über H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 10 Torr getrocknet: 1,4 g = 75% d. Th.

Zum Vergleich diente Ag-Benzooat-[<sup>18</sup>O], das aus der gleichen Benzoesäure-[<sup>18</sup>O] nach dem gleichen Verfahren hergestellt war. <sup>18</sup>O-Bestimmung wie üblich durch thermische Decarboxylierung.

Vor Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Behandlung: r = 0,01815; 0,01812. A<sub>gef.</sub> = 0,899; 0,898 (CO<sub>2</sub>-Standard: 0,208 At.-% <sup>18</sup>O). <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 0,691; 0,690; Mittelwert: 0,691 At.-%.

Nach Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Behandlung: r = 0,01793; 0,01793. A<sub>gef.</sub> = 0,888; 0,888 (CO<sub>2</sub>-Standard: wie oben). <sup>18</sup>O-Tracergehalt: 0,680; 0,680 At.-%.

Zur *Isotopenanalyse* wurden die Substanzen nach der kürzlich beschriebenen Methode<sup>7)</sup> mit o-Phenylendiamin-monohydrochlorid (PM) + CO<sub>2</sub> 3 Std. auf ca. 300° geheizt. Sauerstoffhaltige Verbindungen spalten unter diesen Bedingungen Wasser ab, dessen Isotopengehalt sich mit dem zugesetzten CO<sub>2</sub> äquilibriert. Das CO<sub>2</sub> wird im Massenspektrographen analysiert; dieser liefert das Verhältnis r der Massen 46 zu 44 + 45. Berechnung der Analysen:

$$A_{\text{gef.}} = r \cdot 100 / (r + 2).$$

$$^{18}\text{O-Tracergehalt in der Substanz} = \frac{A_{\text{gef.}} \cdot (m_{\text{c}} + m_{\text{s}}) - A_{\text{c}} \cdot m_{\text{c}}}{m_{\text{s}}} - A_{\text{c}}$$

Hierin bedeuten:

A<sub>c</sub> = At.-% <sup>18</sup>O (Gesamtgehalt) im Ausgangs-CO<sub>2</sub>, bestimmt durch direkte Massenanalyse.

m<sub>c</sub> = mAtome Sauerstoff im CO<sub>2</sub>.

m<sub>s</sub> = mAtome Sauerstoff in der Substanzprobe.

Die Massenanalysen wurden von Frau H. MENASSÉ und Herrn cand. phil. W. REGENASS unter der Leitung von Herrn Dr. M. THÜRKAUF mit einem Massenspektrometer CONSOLIDATED-NIER 21-201 der Physikalisch-chemischen Anstalt, Basel, ausgeführt. Bei einem Teil der Versuche war Herr W. ZÜRCHER in geschickter und gewissenhafter Weise behilflich.

<sup>22)</sup> Wir danken Herrn cand. phil. H. MOLL für die Durchführung dieses Versuches.

<sup>23)</sup> Wir fanden, dass dieses Aluminiumoxydpräparat etwas stärker wirkt als das zuerst verwendete von WOELM.

## SUMMARY

By labelling with  $^{18}\text{O}$  it was shown that the reaction of the ester 3 $\beta$ -benzoyloxy-cholestene-(1) (I\*) in an unpolar solvent on alumina to give the alcohol 3 $\alpha$ -hydroxy-cholestene-(1) (II) occurs with alkyl-O-fission. The alcohol 3 $\beta$ -hydroxy-cholestene-(1) (IV\*) corresponding to I\* remained practically unchanged under these conditions.

The ester I\* recovered from alumina had lost  $^{18}\text{O}$  (probably from the carbonyl group), apparently without concurrent hydrolysis by acyl-O-fission.

The mechanisms of these changes are discussed.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel und  
Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel

### 236. Über den Einfluss der Polyphosphate auf die Löslichkeit einiger Plasmaproteine und die Möglichkeit der Plasma-Fraktionierung mit Polyphosphat<sup>1)</sup>

von Hs. Nitschmann, E. Rickli und P. Kistler<sup>2)</sup>

(27. VIII. 59)

#### Einleitung

Eine Reihe polyvalenter Säuren, darunter vor allem die Polyphosphorsäure (früher Metaphosphorsäure genannt), sind seit langem für ihre starke eiweissfällende Wirkung bekannt. Diese Wirkung ist meist nur unspezifisch zur vollständigen Denaturierung biologischer Flüssigkeiten herangezogen worden, im Falle der Polyphosphorsäure auch zu ihrer analytischen Unterscheidung von den niedermolekularen Gliedern der Reihe (Ortho- und Pyrophosphorsäure). Untersuchungen über die Möglichkeiten einer fraktionierten Fällung von Proteingemischen mit Hilfe solcher mehrwertiger Anionen gibt es aber nur wenige.

MORAWETZ & HUGHES<sup>3)</sup> haben die fällende Wirkung von Methacrylsäure-Polymerisaten und Maleinsäureanhydrid-Copolymerisaten auf Rinder-Serumalbumin untersucht. Aus den Niederschlägen isoliertes Serumalbumin liess keine Anzeichen einer Denaturierung erkennen. Ungefähr gleichzeitig haben WIELAND *et al.*<sup>4)</sup> über Versuche zur Fraktionierung von Serum mit Polyacrylsäuren berichtet. ISLIKER & STRAUSS<sup>5)</sup> gelang die Isolierung eines Antikörpers aus dem Komplex mit seinem Antigen (PR 8-Influenza-Virus) mit Hilfe von Polymethacrylat.

Auch mit Polystyrolsulfonsäure lassen sich Proteine im sauren pH-Gebiet ausfällen. Das verschiedenartige Verhalten von Serumalbumin und  $\gamma$ -Globulin bei Gegenwart dieses Fällungs-

<sup>1)</sup> Diese Arbeit wurde durch Mittel aus einem dem Schweizerischen Roten Kreuz von der Firma HOFFMANN-LA ROCHE, Basel, gewährten Forschungskredit unterstützt. – Ein Teil der hier mitgeteilten Resultate wurde am IV. Internationalen Kongress für Biochemie, Wien 1958, vortragen.

<sup>2)</sup> Einige orientierende Versuche zur Frage der Plasmafraktionierung mit Polyphosphat wurden vom erstgenannten Autor schon 1956 mit E. W. BÖTTCHER durchgeführt.

<sup>3)</sup> H. MORAWETZ & W. L. HUGHES jr., J. physic. Chemistry **56**, 64 (1952).

<sup>4)</sup> TH. WIELAND, H. GOLDMANN, W. KERN, H. E. SCHULTZE & H. D. MATHEKA, Makromol. Chem. **10**, 136 (1953).

<sup>5)</sup> a) H. C. ISLIKER & P. H. STRAUSS, Federation Proc. **13**, 236 (1954); b) *idem*, Vox Sanguinis **4**, 196 (1959).