

Fraktion 1 (397 mg) schmolz nach einmaliger Kristallisation aus Methylchlorid-Petroläther bei 140–141°. Nach Mischprobe, Dünnschichtchromatogramm [Fließmittel: Benzol-Methanol (19:1)] und IR.-Spektrum (CHCl_3) handelt es sich um unverändertes *Ausgangsmaterial V*. In Fraktion 3 (70 mg) vom Smp. 163–164° nach einmaliger Kristallisation aus Äther-Hexan lag nach Mischprobe, Dünnschichtchromatogramm und IR.-Spektrum (CHCl_3) *3 β -Acetoxy-17-oxo- Δ^5 -androsten (IV)* vor. Auf Grund der Dünnschichtchromatogramme bestanden die Fraktion 2 (81 mg) aus einem Gemisch von *IV* und *V*, und Fraktion 4 (55 mg) aus *IV* sowie weiteren nicht identifizierten Anteilen.

Fraktion	Lösungsmittel	ml	Eluat mg	Smp.*) °C	Bemerkungen
1	Petroläther-Benzol 2:1	50	397	140–141	Kristalle
	Petroläther-Benzol 1:1	200			
2	Petroläther-Benzol 1:1	50	81		Öl + Kristalle
	Benzol	150			
3	Benzol-Äther 9:1	50	70	163–164	Kristalle
4	Benzol-Äther 9:1	50	55		Öl + Kristalle
5	Methanol	150	285		Öl
*) Nach einmaliger Kristallisation					

Im IR.-Spektrum (CHCl_3) der öligen Fraktion 5 (285 mg) traten Banden bei 3600, 1730 und 1255 cm^{-1} auf. Das Präparat wurde in wenig Pyridin gelöst und unter Kühlung zu einer Aufschlammung von 200 mg Chrom(VI)-oxid in 2 ml Pyridin getropft. Nach 24 Std. Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Gemisch in Äther aufgenommen und die organische Phase mit verd. Salzsäure und Wasser gewaschen. Nach dem Eindampfen der über wasserfreiem Natriumsulfat getrockneten Ätherlösung im Vakuum resultierten 185 mg Öl, dessen IR.-Absorptionsspektrum (CHCl_3) keine Hydroxylbanden aufwies.

Fräulein J. GASCHÉ und Herr W. GRAF waren für die Wiederholung mehrerer Versuche besorgt.

SUMMARY

The reversibility of the photochemical transformation of 17-oxo-13 β -steroids to their 17-oxo-13 α -isomers is demonstrated.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

45. Bemerkungen zur Charakterisierung einfach ungesättigter Steroide durch ihr Absorptionsspektrum im kurzwelligen Ultraviolett

von R. BÜHRER und T. REICHSTEIN

(23. XII. 61)

Es ist lange bekannt¹⁾, dass isolierte C=C-Doppelbindungen das kurzwellige UV. selektiv absorbieren; die Lage des Maximums ist in erster Linie von der Zahl der Substituenten abhängig und liegt bei ca. 160–206 $m\mu$. BLADON *et al.*²⁾ haben ein Verfahren angegeben, um dies praktisch zur Bestimmung des Substitutionsgrades isolierter

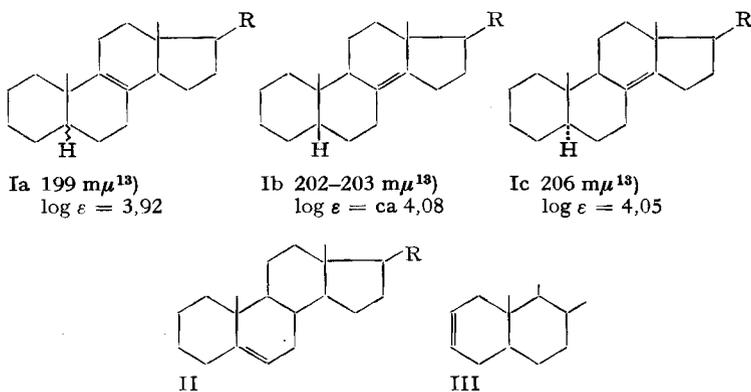
¹⁾ Vgl. Literaturangaben bei STICH *et al.*²⁾

²⁾ K. STICH, G. ROTZLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 42, 1480 (1959).

³⁾ P. BLADON, H. B. HENBEST & G. W. WOOD, *Chemistry & Ind.* 1957, 866.

Doppelbindungen zu verwenden. Da mit den damals verfügbaren Apparaten das wahre Maximum nicht mehr erfasst werden konnte, haben sie nur den langwelligen Ast der Kurve gemessen und schon dabei gut brauchbare Resultate erhalten. Spektroskopische Methoden nach Komplexierung mit Tetranitromethan⁴⁾ oder Jod⁵⁾ sind mit Erfolg für denselben Zweck benützt worden. SIGG & REICHSTEIN⁶⁾ sowie LARDON & REICHSTEIN⁷⁾ fanden, dass es mit einem Paar von STICH verfertigten Quarzzellen von 0,01 cm Schichtdicke gelang, auch mit einfachen käuflichen Apparaten das messbare Gebiet noch etwas zu erweitern und das Maximum der Absorption bei $\Delta^{8:14}$ -Steroiden – soweit sie in Cyclohexan löslich waren – gerade noch zu erfassen und eindeutig von zwei- oder dreifach substituierten Doppelbindungen zu differenzieren.

Eine grössere Serie von Messungen hat TURNER⁸⁾ mit einem kleinen Vakuum-Spektrographen ausgeführt. Wir glauben, dass seine Resultate die Brauchbarkeit des Verfahrens nur bestätigen⁹⁾. Wenig später haben STICH *et al.*²⁾ ebenfalls die Resultate einer grösseren Serie publiziert. – Es wurde ein käufliches Gerät mit Quarzoptik verwendet, das für die damalige Zeit eine sehr gute Durchlässigkeit und sehr wenig Streulicht bis 190 $m\mu$ zeigte. Sauerstoff wurde durch Spülung mit N_2 entfernt. Leider mussten 0,1 cm Zellen benützt werden¹⁰⁾. Die genannten Autoren²⁾ zeigten, dass es unter den genannten Vorsichtsmassnahmen gelingt, mit käuflichen Geräten¹¹⁾ auch



⁴⁾ E. HEILBRONNER, *Helv.* **36**, 1121 (1953).

⁵⁾ D. R. LONG & R. W. NEUZIL, *Analyt. Chemistry* **27**, 1110 (1955); vgl. W. HÜCKEL & O. FECHTIG, *Chem. Ber.* **92**, 693 (1959).

⁶⁾ H. P. SIGG & T. REICHSTEIN, *Helv.* **39**, 1507 (1956).

⁷⁾ A. LARDON & T. REICHSTEIN, *Helv.* **41**, 904 (1958).

⁸⁾ D. W. TURNER, *J. chem. Soc.* **1959**, 30.

⁹⁾ Grobe Diskrepanzen ergaben sich, soweit wir es beurteilen können, besonders für Δ^7 -Steroide. Die Absorption dieser Stoffgruppe sollte mit wirklich reinem Material noch kontrolliert werden. Δ^7 -Steroide sind häufig mit relativ grossen Mengen von Δ^8 - und $\Delta^{8:14}$ -Steroiden verunreinigt. – TURNER verwendete eine Apparatur, bei der die ganze Energie der Lichtquelle zuerst die Substanz passierte; die Möglichkeit zur Bildung von Photolyseprodukten ist daher recht gross.

¹⁰⁾ Die selbst verfertigten 0,01 cm Zellen waren zerbrochen und es war nicht mehr möglich, brauchbaren Ersatz mit gleichmässiger Durchlässigkeit und genauer Schichtdicke zu erhalten.

¹¹⁾ Es wurde aber deutlich hervorgehoben, dass dies nur eine Notlösung sein kann, und dass es viel besser wäre, ein Spezialgerät zu verwenden, das besonders für Messungen im Gebiet von 170–210 $m\mu$ konstruiert ist.

ohne Verwendung von Vakuumtechnik praktisch brauchbare Ergebnisse¹²⁾ zu erhalten. Insbesondere die Unterscheidung der voll substituierten Doppelbindung (Ia, Ib und Ic) von den Typen II und III war leicht möglich, und sogar die 5 β H-Verbindungen (Ib) liessen sich von den isomeren 5 α H-Verbindungen (Ic) noch differenzieren. Für Stoffe vom Typus II (Cholesterol etc.) fanden die genannten Autoren²⁾ damals das Maximum bei ca. 193 m μ (in Cyclohexan)¹⁴⁾ und ähnliche Werte wurden bei anderen Steroiden mit dreifach substituierter Doppelbindung beobachtet. Typ III absorbierte wie erwartet noch kurzwelliger, und die wirkliche Lage der Bande konnte nicht mehr erfasst werden. Vinyl-Derivate wurden nicht untersucht. Die Methode wurde in unserem Laboratorium bei der Untersuchung von Naturstoffen in den letzten Jahren vielfach benützt und hat, trotz bisheriger offensichtlicher apparativer Mängel, stets Informationen gegeben, die sich, soweit später durch Abbau oder andere Methoden kontrollierbar, als richtig und sehr zeit- und materialsparend erwiesen haben.

Seit der genannten Publikation²⁾ sind erhebliche Fortschritte im Bau von UV.-Spektrophotometern erzielt worden. Wesentlich verbessert ist die Qualität von geschmolzenem Quarz sowie die Leistungsfähigkeit der Lichtquellen und der Sekundärelektronen-Vervielfacher (= Photomultiplier) im kurzwelligen Gebiet. Auch brauchbare Zellen für kleine Schichtdicken (0,01–0,02 cm) sind heute käuflich. Apparate, welche die Aufnahme von Lösungsspektren im kurzwelligen Gebiet mit einer Genauigkeit gestatten, welche diejenige des von STICH *et al.*²⁾ verwendeten Instrumentes bei weitem übertrifft, sind heute im Handel erhältlich. – Wir besitzen zwar noch keine solche Apparatur, aber durch Mitteilung¹⁵⁾ von anderen Forschern oder Bekannten wurden wir vor einiger Zeit darauf aufmerksam gemacht, dass die früheren Messungen²⁾ für II und III mit grösseren Fehlern behaftet sind als ursprünglich angenommen wurde¹⁶⁾. Es war unsere Absicht, eine Berichtigung zu publizieren; dies sollte aber erst geschehen, wenn wir selbst in der Lage wären, eine genaue Kontrolle durchzuführen und genauer begründete Werte anzugeben. Die Möglichkeit dazu hat sich leider verzögert. Da wir inzwischen von verschiedenen Seiten Anfragen erhielten und

¹²⁾ Es wurde nirgends angedeutet, dass die Autoren die von ihnen gefundenen Näherungswerte als brauchbare Unterlage für quantentheoretische oder wellenmechanische Rechnungen betrachten.

¹³⁾ Werte von STICH *et al.*²⁾ gefunden in Cyclohexan.

¹⁴⁾ Es wurde dort²⁾ gesagt, dass die Übereinstimmung mit den Werten, die mit Vakuumtechnik gefunden wurden, befriedigend ist. Dies ist offenbar missverständlich und ist auch teilweise missverstanden worden. Es war damit aber lediglich gemeint, dass die Übereinstimmung für den gewünschten praktischen Zweck ausreichend ist. Die Autoren²⁾ haben es auch klar gemacht, dass sie nicht beabsichtigt haben, die Absorption des Cholesterols mit einer dazu ungeeigneten Apparatur genau zu bestimmen, sondern sie haben die ungefähr bekannte Absorption des Cholesterols dazu benützt, um die Brauchbarkeit der verwendeten Apparatur an der Grenze ihrer Leistungsfähigkeit annähernd abzuschätzen.

¹⁵⁾ Wir danken besonders Herrn Dr. E. A. JOHNSON vom Medical Research Council, London, sowie Herrn Dr. C. v. PLANTA, F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co., Basel, auch hier bestens für wertvolle Informationen und die Ausführung von Messungen. Ferner danken wir Herrn Dr. W. KAYES von der BECKMAN INSTRUMENTS INC., Fullerton, Calif., für sehr nützliche praktische Ratschläge.

¹⁶⁾ Auch die zur Berechnung der Streulichtfehler benützte Formel (auf p. 1483 oben, der früheren Publikation²⁾ halten wir für falsch, sie gibt für das Streulicht viel zu kleine Werte. Ein Vorschlag für eine bessere Berechnungsart mit exper. Kontrolle soll später folgen.

auch Publikationen¹⁷⁻²⁰) erschienen sind, sehen wir uns veranlasst, schon jetzt kurz Stellung zu nehmen. Unsere vorläufige Meinung über die früheren Resultate und die Brauchbarkeit der Methodik glauben wir wie folgt zusammenfassen zu können:

1) Die früher²⁾ mitgeteilten Werte für Ib und Ic (in Cyclohexan) sind vermutlich auf $\pm 1 m\mu$ richtig. Das Maximum bei Typ Ia kann vermutlich (je nach Stereochemie und weiteren Substituenten) etwa von 195–200 $m\mu$ schwanken, doch bedarf dies noch der Kontrolle.

2) Das Maximum für reinstes O-Acetylcholesterol (Typ II) liegt wahrscheinlich ungefähr bei ca. 187–189 $m\mu$, in Übereinstimmung mit APPLEWHITE & MICHELI²⁰) sowie KLEVENS & PLATT²¹), die aber eine vermutlich etwas zu hohe Extinktion fanden²²).

3) Die Absorption von Typus III liegt, wie erwartet, noch kurzweiliger. Vermutlich werden sich andere Steroide mit nur zweifach substituierter Doppelbindung prinzipiell gleich verhalten. Das bedarf weiterer Kontrolle. Es ist aber durchaus möglich, dass viele dieser Stoffe, wie von TURNER⁹) angegeben, im genannten Gebiet nur eine Schulter und kein eigentliches Maximum zeigen. Bei seinen Messungen wurde aber, soweit wir orientiert sind, ein Instrument verwendet, bei dem die ganze Energie der Lichtquelle zuerst auf die Substanz fiel und erst nachher den Monochromator passierte. Die Gefahr, dass dabei Produkte der Photolyse mitgemessen worden sind, ist zu berücksichtigen.

4) Die praktischen Ergebnisse der früheren Publikation²⁾ werden durch die genannten Fehler in der Messung nicht wesentlich beeinträchtigt. Die Differenzierung der Typen I von den Typen II und III wird durch genauere Messungen noch besser gesichert, weil die Unterschiede in der Lage der wahren Kurven offenbar noch etwas grösser werden als früher angegeben.

5) Für die Charakterisierung der zwei- und dreifach substituierten Doppelbindung (entspr. Typ. II und III und Isomere) ist das kurzweilige UV. heute weniger notwendig. Dafür sind manchmal auch die IR.-Spektren brauchbar. Die wertvollsten Informationen können heute aber mit Hilfe der Protonen-Resonanz-Spektren erhalten werden. Immerhin ist zu berücksichtigen, dass die für solche Bestimmungen notwendige Apparatur und die zu ihrer Durchführung benötigten Spezialisten nicht allen chemischen Laboratorien zur Verfügung stehen. Die Bestimmungen erfordern zudem mindestens ca. 15 mg Substanz. Die Anwesenheit der isolierten Doppelbin-

¹⁷⁾ P. S. ELLINGTON & G. D. MEAKINS, J. chem. Soc. 1960, 697.

¹⁸⁾ J. H. CHAPMAN & A. C. PARKER, J. chem. Soc. 1961, 2075.

¹⁹⁾ E. A. JOHNSON, Unicam Spectrovision Nr. 8, 1 (1960).

²⁰⁾ T. H. APPLEWHITE & ROBERT A. MICHELI, Tetrahedron Letters Nr. 16, 560 (1961).

²¹⁾ H. B. KLEVENS & J. R. PLATT, Techn. Report 1953–1954, Part one, p. 145 etc., bes. p. 169, Office of Naval Research Project Nr. 019101, vgl. auch die zitierten Werte bei A. LARDON & T. REICHSTEIN, Helv. 41, 904 (1958).

²²⁾ Das im WOOD RIVER RESEARCH LABORATORY der SHELL OIL COMPANY mit einem BAIRD ASSOCIATES VACUUM ULTRAVIOLETT MONOCHROMATOR aufgenommene Spektrum von 3-O-Acetylcholesterol in n-Heptan ist bei A. LARDON & T. REICHSTEIN⁷) abgebildet. Es zeigte ein Maximum bei ca. 191 $m\mu$ ($\log \epsilon = 4,01$). Der Unterschied gegenüber den Werten von KLEVENS & PLATT²¹) (ca. 4 $m\mu$) ist vielleicht teilweise durch den Umstand bedingt, dass das Maximum sehr flach ist. Eine sehr geringe Änderung im Verlauf der gefundenen Kurve ergibt daher bereits eine relativ starke Verschiebung des Maximums.

dung im kurzwelligen UV. kann mit 1 mg in sehr kurzer Zeit sicher festgestellt werden, falls keine störenden Gruppen anwesend sind. Schon dies ist oft sehr nützlich, auch wenn eine Differenzierung der Typen II und III sich als weniger zuverlässig erweisen sollte, als nach den Resultaten von STICH *et al.*²³⁾ vermutet werden kann.

6) Für die Charakterisierung der voll substituierten Doppelbindung (Typ I) sind die Protonen-Resonanz-Spektren sowie die IR.-Spektren höchstens sehr beschränkt brauchbar. Besser geeignet sind die RAMAN-Spektren, deren Bestimmung aber grosse Materialmengen benötigt und andere Nachteile hat. Gerade für diese Stoffgruppe liefert die Bestimmung des kurzwelligen UV.-Spektrums nicht nur eine relativ zuverlässige Information, sondern ist technisch am leichtesten ausführbar. Mit 1 mg oder weniger und mit geringem Zeitaufwand ergibt sich bei Anwesenheit der voll substituierten Doppelbindung ein positiver Befund, was bei Untersuchung von Naturstoffen sehr wertvoll ist.

7) Es wäre daher, nach unserem Erachten, immer noch sehr erwünscht, einen möglichst einfachen käuflichen Apparat zu haben, der es erlaubt, die UV.-Spektren von Lösungen im Gebiet von 170–210 $m\mu$ zu messen. – Es sind zwar heute, wie erwähnt, bereits verschiedene UV.-Spektrophotometer im Handel, die (teilweise mit Zusatzgeräten) sehr genaue Messungen im kurzwelligen Gebiet (teilweise sogar bis 170 $m\mu$ herunter) auszuführen gestatten. Sie sind aber im Grund für andere Zwecke gebaut und teilweise auch sehr teuer. Dazu kommt, dass ihre Leistungsfähigkeit relativ rasch nachlassen soll, wobei die Alterung der Spiegel²³⁾ sich besonders unangenehm auswirkt. Starke N_2 -Spülung scheint das Altern der Spiegel sehr zu beschleunigen²⁵⁾. Auch die Energieausbeute der Lichtquelle sinkt rasch ab. Vermutlich wären für den von uns benötigten Zweck Einstrahlgeräte ohne Registrierung und mit möglichst wenig Spiegeln am besten geeignet²⁶⁾. Das Gehäuse sollte ferner so gut abgedichtet sein, dass ein relativ schwacher N_2 -Strom ausreicht, um den O_2 völlig fernzuhalten. Auf eine interessante Möglichkeit, die Messungen im kurzwelligen UV. zu erleichtern, haben HANSEN & BUELL²⁷⁾ aufmerksam gemacht. Sie empfehlen die Verwendung von speziellen Photomultipliern, deren maximale Empfindlichkeit im kurzwelligen Gebiet liegt.

Wir danken Herrn Dr. Ek. WEISS für seine Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Organisch-chemisches Institut
der Universität Basel

²³⁾ Nach KAYE²⁴⁾ geht die an 8 Spiegeln reflektierte Energie nach 6 Monaten auf ca. 25% des ursprünglichen Wertes zurück. Vielleicht wird sich auch dies einmal beheben lassen.

²⁴⁾ W. KAYE, Symposium on Spectroscopy, Special Technical Publication Nr. 269, published by the Amer. Soc. for Testing Materials 1959. Dasselbe auch als BECKMAN Reprint R-6157 der BECKMAN INSTRUMENT INC., Fullerton, California.

²⁵⁾ Die von STICH *et al.*²³⁾ benützte Apparatur hatte im Jahre 1958 bis zu 190 $m\mu$ sehr wenig Streulicht gezeigt. Der Anteil war nach einem Jahr stark angestiegen, konnte aber durch Waschen der Spiegel mehrmals wieder auf erträgliche Werte reduziert werden. Im Febr. 1961 betrug das Streulicht (bestimmt mit Vicorglas) aber bei 190 $m\mu$ bereits 7,5%, so dass die Apparatur für Messungen unter 200 $m\mu$ nicht mehr verwendbar war. Ausser der Verschlechterung der Spiegel waren dabei aber auch Dejustierungen schuld.

²⁶⁾ Wir hoffen, ein solches Gerät für Experimentierzwecke unter Verwendung käuflicher Einzelteile selbst zusammenstellen und gelegentlich darüber berichten zu können.

²⁷⁾ R. E. HANSEN & M. V. BUELL, *Analyt. Chemistry* 31, 878 (1959).