

den Quecksilber-Linien 405/8 nm noch teilweise erfasst, wurde die aktinometrische Messung nach Zwischenschaltung eines Benzolfilters mit steiler Absorptionskante bei 280 nm wiederholt und die so bestimmte Lichtmenge für  $\lambda > 280$  nm von der ohne Benzolfilter gemessenen in Abzug gebracht.

Ohne Filter:  $8,47 \cdot 10^{-5}$  Einstein  $l^{-1}$  Minute $^{-1}$

Mit Filter:  $0,45 \cdot 10^{-5}$  Einstein  $l^{-1}$  Minute $^{-1}$

---

$I_0$ :  $8,02 \cdot 10^{-5}$  Einstein  $l^{-1}$  Minute $^{-1}$

Damit errechneten sich folgende Quantenausbeuten:

$$\varphi_{12} = 0,31(4) \quad \varphi_{23} = 0,18(8) \quad \varphi_{32} = 0,07(8)$$

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. Velluz, G. Amiard & B. Goffinet, Bull. Soc. chim. France 1955, 1341.
- [2] G. M. Sanders & E. Havinga, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 83, 665 (1964).
- [3] M. P. Rappoldt & E. Havinga, *ibid.* 79, 369 (1960); M. P. Rappoldt, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 79, 392, 1012 (1960).
- [4] J. C. Sternberg, H. S. Stillo & R. H. Schwendemann, Anal. Chem. 32, 84 (1960).
- [5] O. Kling, E. Nikolaishi & H. L. Schläfer, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 67, 883 (1963).
- [6] C. G. Hatchard & C. A. Parker, Proc. Roy. Soc. A 235, 518 (1956).
- [7] N. Spendley, G. R. Hext & F. R. Himsworth, Technometrics 4, 441 (1962).
- [8] G. E. P. Box & K. B. Wilson, J. Roy. Stat. Soc. B 13, 1 (1951).
- [9] O. L. Davies, The Design and Analysis of Industrial Experiments, Oliver and Boyd, London 1956.

## 97. Photochemie in der Vitamin D-Reihe

### II. Die Wellenlängenabhängigkeit der Photoisomerisationen des Präcalciferols

von K. Pfoertner

Aus der chemischen Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG

(21. II. 72)

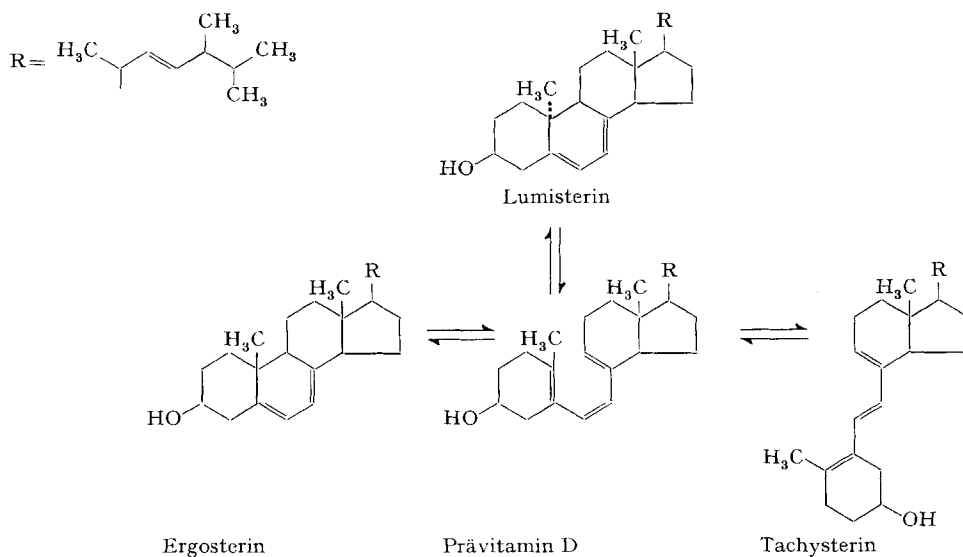
*Summary.* In addition to the known ring opening at shorter wavelengths it was found that ring opening in  $\Delta^{5,7}$ -steroids occurs also at  $\lambda > 300$  nm. Ring closure of the corresponding *secosteroids* in this region was confirmed. The existence of three rotational isomers with respect to the 5,6-bond is assumed to be responsible for the observed wavelength dependency of the photoisomerizations of previtamin D. In this case the 5,6-*s-trans* isomer should absorb uv light at shorter wavelengths yielding tachysterol whereas the two 5,6-rotational isomers with skew conformation should absorb at longer wavelengths yielding lumisterol and ergosterol, respectively.

Mit Hilfe der uns heute zur Verfügung stehenden Analysemethoden konnten wir zeigen [1], dass Licht der Wellenlänge 253,7 nm den Ring B der  $\Delta^{5,7}$ -Steroide Ergosterin und Lumisterin zwar zu öffnen, aber ausgehend vom Provitamin D nicht zu schliessen vermag. Velluz *et al.* [2] hatten dagegen angenommen, dass sämtliche Photoreaktionen des aus den vier Komponenten Ergosterin, Lumisterin, Prävitamin

D und Tachysterin bestehenden Systems unabhängig von der Wellenlänge des photochemisch wirksamen Lichtes reversibel sind.

Bei Verwendung der Quecksilber-Resonanzlinie ist jedoch nach unseren Beobachtungen [1] die Reversibilität auf die 5,6-*cis/trans*-Isomerisation, d. h. auf den Übergang Prävitamin D/Tachysterin beschränkt. Es stellte sich daher die Frage, ob überhaupt ein Wellenlängenbereich existiert, in welchem alle im Schema 1 zusammengefassten Photoreaktionen gleichzeitig ablaufen.

Schema 1: *Reversible Photoreaktionen nach Velluz et al. [2]*



Nach *Rappolt* [3] isomerisiert Licht mit Wellenlängen  $\lambda > 300$  nm das Prävitamin D nicht nur zum Tachysterin, sondern überführt es durch photochemischen Ringschluss auch in Lumisterin und Ergosterin. Die Ringöffnung der beiden  $\Delta^{5,7}$ -Steroide zum Prävitamin D, welche die vollständige Reversibilität der Photoreaktion wenigstens in diesem Spektralgebiet bestätigt hätte, war aber nicht untersucht worden. Das veranlasste uns, entsprechende Experimente durchzuführen.

Da Ergosterin und Lumisterin im Bereich  $\lambda > 300$  nm nur sehr kleine molare Extinktionskoeffizienten besitzen, muss man mit hohen Konzentrationen und langen Belichtungszeiten arbeiten. Unter diesen Umständen beobachteten wir eine photochemische Ringöffnung des Ergosterins zum Prävitamin D, das im weiteren Verlauf der Reaktion teilweise in Lumisterin und Tachysterin umgewandelt wurde. Ausgehend von Lumisterin erhielten wir ebenfalls Prävitamin D. Nur war hier der Nachweis der Folgeprodukte Ergosterin und Tachysterin wegen ihrer geringen Mengen unsicher.

Die von uns oberhalb 300 nm gefundene Ringöffnung hätte in Ergänzung der Ringschlussreaktionen als Beweis für die vollständige Reversibilität der im Schema 1 angegebenen Photoreaktionen innerhalb eines begrenzten Spektralbereiches dienen können, wenn der Nachweis der früher beschriebenen Ringschlussreaktionen [3] nicht

mit erheblichen Unsicherheiten behaftet gewesen wäre. Z. B. waren damals die analytischen Möglichkeiten zur Identifikation des Lumisterins in Reaktionsgemischen sehr beschränkt, weshalb man indirekt, d. h. aus der im weiteren Verlauf der Photoreaktion beobachteten Abnahme der Gesamtausbeute an Ergosterin und Tachysterin auf die Entstehung von Lumisterin zurückschliessen musste.

Wir wollten uns auch hier Klarheit verschaffen und wiederholten deshalb die Ringschlussreaktionen. Um eine Überlagerung der NMR.-Signale der Protonen an C(18) und C(19) durch diejenigen der Ergosterin-Seitenkette zu verhindern und so in Ergänzung der Dünnschicht- und Gas-Chromatographie einen sicheren analytischen Nachweis aller Komponenten zu gewährleisten, benutzten wir wie in der vorangegangenen Arbeit [1]  $\Delta^{5,7}$ -Steroide mit abgeänderter Seitenkette. Die photochemischen Umsetzungen wurden dadurch nicht beeinflusst.

In Benzol gelöstes 3,3;20,20-Bis-äthylendioxy-pregna-5,7-dien (Verb. E in Tab. 1) wurde zunächst in einem Quarzgefäss mit dem vollen Licht einer Quecksilber-Hochdrucklampe bestrahlt und das nicht umgesetzte Ausgangsmaterial zusammen mit der bereits in geringer Menge gebildeten Verbindung vom Lumisterin-Typ ( $9\beta,10\alpha$ ) durch Kristallisation aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Das verbleibende, zu 90% aus den *seco*-Steroiden von der Art des Präcalciferols und des Tachysterins bestehende Gemisch wurde erneut in Benzol gelöst und mit der gleichen Lampe unter Einschaltung eines Filters zur Eliminierung aller Wellenlängen unterhalb 300 nm weiterbelichtet. Jetzt traten Verbindungen vom Ergosterin- und Lumisterin-Typ auf, was die Ergebnisse von *Rappoldt* bestätigte.

Im gleichen Versuch wurde auch die von *Rappoldt* [3] bei der Bestrahlung mit UV. über 300 nm beobachtete *trans/cis*-Isomerisation des Tachysterins zum Prävitamin D mit den analogen Verbindungen (T und P in Tab. 1) reproduziert. Wir registrierten nämlich im Verlauf der Belichtung gas-chromatographisch, dass sich die Konzentration der Verbindung mit Tachysterin-Struktur deutlich verringerte. Letztere besitzt oberhalb 300 nm noch verhältnismässig hohe molare Extinktionskoeffizienten und absorbiert daher, wie Tab. 1 zu entnehmen ist, von allen Komponenten des Reaktionsgemisches am meisten Licht. Aus diesem Grund vollzieht sich eine *trans/cis*-Isomerisation (Tachysterin/Prävitamin D), obwohl deren Quantenausbeute kleiner ist als diejenige der *cis/trans*-Isomerisation [1].

Nachdem unsere Versuche die Ergebnisse von *Rappoldt* bestätigt und ergänzt hatten, stand fest, dass im Wellenlängenbereich  $\lambda > 300$  nm alle Photoreaktionen des Systems Ergosterin, Lumisterin, Prävitamin D und Tachysterin gemäss Schema 1 gleichzeitig ablaufen. Andererseits hatte unsere vorangegangene Untersuchung gezeigt, dass Licht der Wellenlänge 253,7 nm nur die Ringöffnung des Ergosterins oder Lumisterins zum Prävitamin D und dessen *cis/trans*-Isomerisation zum Tachysterin bewirkt.

Das unterschiedliche Verhalten des Vierkomponenten-Systems bei verschiedenen Wellenlängen beruht auf der Wellenlängenabhängigkeit der Photoreaktionen des Präcalciferols. Um diese interpretieren zu können, muss man sich vergegenwärtigen, dass sich die genannten Photoreaktionen in Lösungen abspielen und dass in Lösungen der Ring A des Präcalciferols um die 5,6-Bindung rotieren kann.

Über das Problem, welche Struktur man dem Prävitamin D in Lösungen zuordnen soll, ist schon mehrfach diskutiert worden [4]. Schliesslich wurde angenommen, dass

Tabelle 1

	Ergosterin-Typ (E)	Prävitamin D-Typ (P)	Tachysterin-Typ (T)
Zusammensetzung des Gemisches in Gewichtsprozent (vor der Belichtung mit $\lambda > 300$ nm)	9,8	63,2	27,0
Lichtabsorption <sup>1)</sup> der einzelnen Komponenten in Prozent des vom Gemisch absorbierten Lichtes bei $\lambda = 313$ nm	0,2	19,8	80,0

<sup>1)</sup> Berechnet nach einer in [1] angegebenen Formel.

die durch die Substituenten der 5,10-Doppelbindung gebildete Ebene sich entsprechend Fig. 1 rechtwinklig zur Ebene des 6,7/8,9-Diensystems einstellt [5].

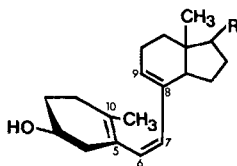


Fig. 1

Diese Vorstellung ist jedoch im Widerspruch zu der an anderen Verbindungen gesicherten Tatsache [6], dass mindestens die *s-trans*-Konformation als solche vorliegt, wenn schon die elektronische Stabilisierung des Systems nicht ausreicht, um die ungünstigen sterischen Faktoren bei der Ausbildung der *s-cis*-Form zu kompensieren.

Beim Prävitamin D ist die Rotation um die 5,6-Bindung durch die Methylgruppe 19 sterisch gehindert. Ein zweizähliger Potentialverlauf der Rotation ist daher nicht zu erwarten. Die bekannten elektrozyklischen Reaktionen des Prävitamins D, die sowohl im elektronisch angeregten Zustand als auch im Grundzustand zu je zwei Stereoisomeren führen (Ergosterin und Lumisterin bzw. Isopyrocalciferol und Pyro-

calciferol), lassen vielmehr auf einen dreizähligen Potentialverlauf der Rotation um die 5,6-Bindung schliessen. Hierbei bildet dann die *s-trans*-Form das Potentialminimum, während als energiereiche Konformationen zwei *gauche*-Formen auftreten. Die eine *gauche*-Form hätte dabei einen Winkel zwischen  $60^\circ$  und  $90^\circ$ , die andere einen Winkel zwischen  $270^\circ$  und  $300^\circ$  (Schema 2 und Tab. 2). Aus einer *gauche*-Form würde sich Ergosterin bzw. Isopyrocalciferol bilden und aus der anderen Lumisterin bzw. Pyrocalciferol. Dagegen wäre die sigmatrope Umlagerung in Vitamin D aus beiden *gauche*-Formen möglich.

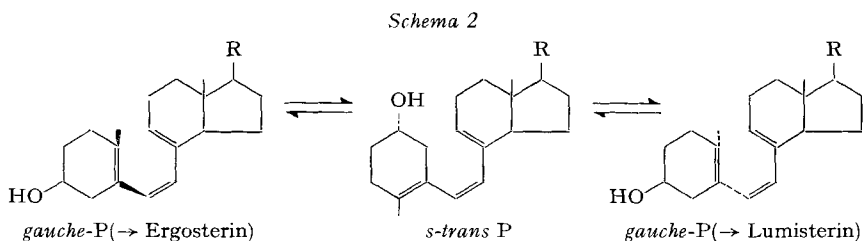
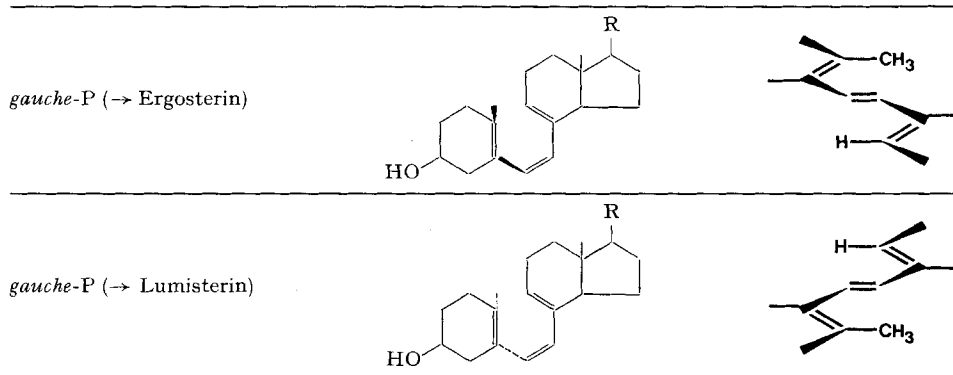


Tabelle 2. *gauche*-Formen des Präcalciferols; Strukturformeln und zugehörige Geometrie

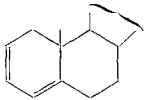
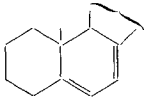
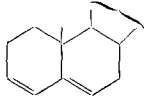
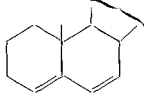


Wegen der geringen Aktivierungsenergie, die für die Rotation um eine zwischen zwei Doppelbindungen gelegene Einfachbindung notwendig ist, lassen sich die einzelnen Rotationskonformeren nicht isolieren, weshalb auch ihre UV.-Spektren nicht gemessen werden können. Bei ihrer Fixierung in Ringsystemen sind die UV.-Spektren solcher Systeme jedoch zugänglich. Aus den in der Tab. 3 angeführten Beispielen ist zu schliessen, dass die *s-trans*-Konformere bei kürzeren Wellen absorbieren als die *s-cis*-Konformere bzw. als die entsprechenden *gauche*-Formen, sich also gerade umgekehrt verhalten wie echte *cis/trans*-Isomere.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen lässt sich die Wellenlängenabhängigkeit der Photoreaktionen des Präcalciferols folgendermassen interpretieren:

1. Die UV.-Bande des Präcalciferols mit  $\lambda_{\text{max}}$  260 nm setzt sich aus einer Absorptionsbande des *s-trans*-Konformeren mit  $\lambda_{\text{max}} < 260$  nm und einer Absorptionsbande der beiden *gauche*-Formen mit  $\lambda_{\text{max}} > 260$  nm zusammen. Ausserdem ist noch eine Absorptionsbande mit  $\lambda_{\text{max}} < 200$  nm beteiligt.

Tabelle 3. UV.-Absorptionsmaxima von *s-cis*- und *s-trans*-Verbindungen [7]

Konformation	Struktur	$\lambda_{\max}$ nm
<i>s-cis</i>		275
<i>s-cis</i>		282
<i>s-trans</i>		235
<i>s-trans</i>		239

2. Im thermischen Gleichgewicht der Rotationskonformere des Präcalciferols überwiegt das sterisch weniger gehinderte *s-trans*-Konformere bei weitem; daher ist die Absorptionsbande des *s-trans*-Konformeren sehr viel grösser als diejenige der beiden *gauche*-Formen.

3. Das *s-trans*-Konformere ist aus sterischen Gründen photochemisch nur zu einer *cis/trans*-Isomerisation befähigt ( $\rightarrow$ Tachysterin), während die Belichtung bei den *gauche*-Formen ausschliesslich die konrotatorisch verlaufenden elektrozyklischen Reaktionen auslöst ( $\rightarrow$ Ergosterin, Lumisterin).

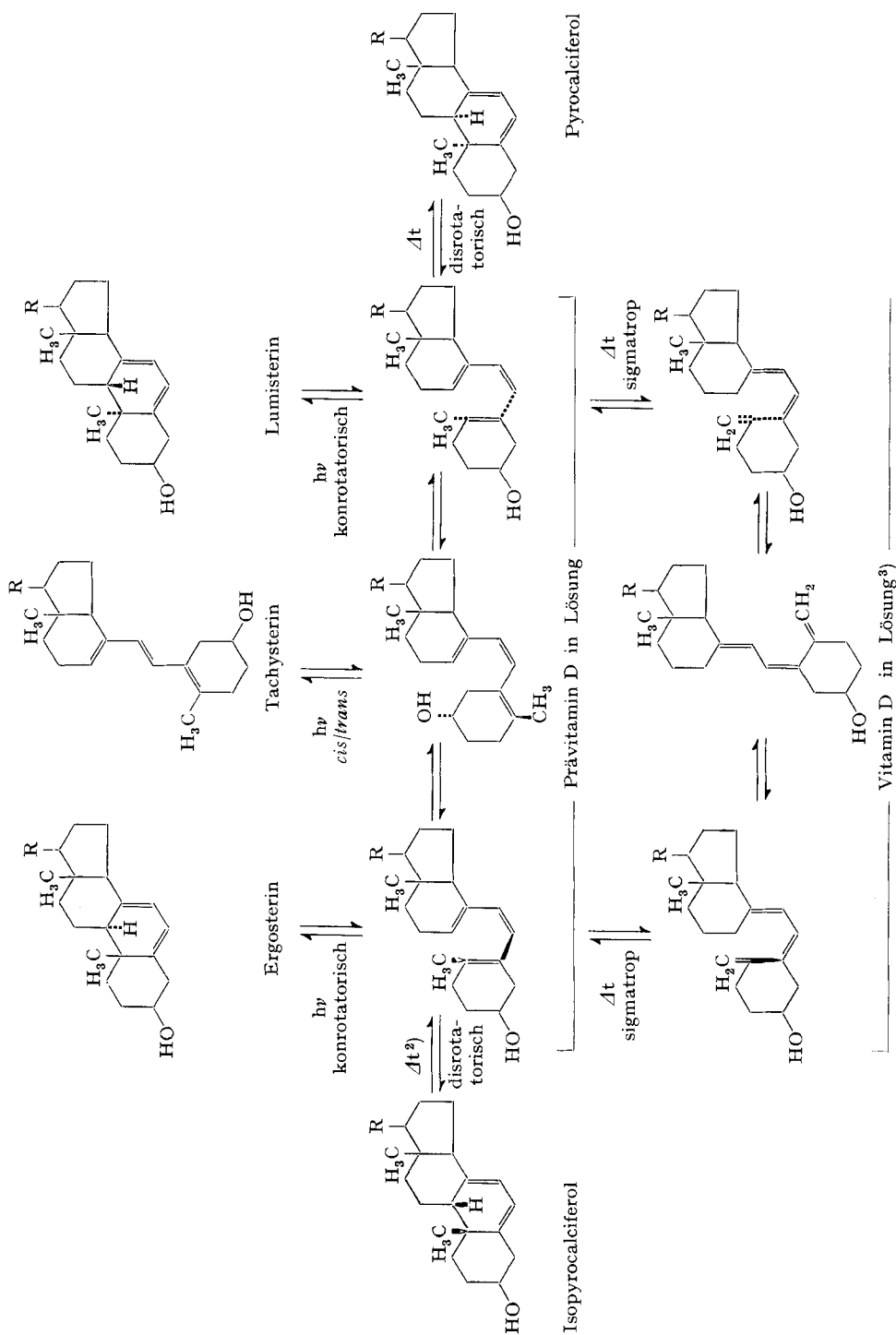
4. Licht der Wellenlänge 253,7 nm trifft praktisch nur auf das *s-trans*-Konformere, weshalb in diesem Fall das Prävitamin D zum Tachysterin isomerisiert. Langwelliges UV. mit  $\lambda > 300$  nm wird dagegen zur Hauptsache von den *gauche*-Formen absorbiert, so dass in diesem Fall die ringgeschlossenen Produkte Lumisterin und Ergosterin stark überwiegen.

Durch schematische Zerlegung des UV.-Spektrums von Präcalciferol in die Absorptionsbanden seiner 5,6-Rotationskonformere soll Fig. 2 die geschilderten Verhältnisse deutlich machen. Eine Computer-Analyse<sup>7)</sup> des gemessenen Absorptionsspektrums von Präcalciferol führte nicht zum Ziel, da die Absorptionsbande mit  $\lambda_{\max} < 200$  nm aus apparativen Gründen nicht hinreichend durch Messpunkte charakterisiert werden konnte.

Voraussetzung für die hier gegebene Interpretation der Wellenlängenabhängigkeit der Photoreaktionen des Präcalciferols ist die Existenz definierter 5,6-Rotations-

<sup>7)</sup> Entsprechend der Fig. 2 versuchten wir das UV.-Spektrum des Präcalciferols in der Form  $E = i(1/\lambda)$  mit Hilfe des Computers IBM 360 in die Absorptionsbanden der einzelnen 5,6-Rotationskonformere zu zerlegen. Dazu bedienten wir uns eines Programms von D. W. Marquardt von der Firma Esso (non linear least squares fit).

Schema 3



2)  $\Delta t$  (disrotatorisch)  $>$   $\Delta t$  (sigmatrop). Die sigmatrope Umlagerung erfolgt bereits oberhalb 30° mit hinreichender Geschwindigkeit, die disrotatorisch verlaufende Cyclisation dagegen erst oberhalb 140°.

3) Die Geometrie der 6,7-*gauche*-Formen vom Vitamin D ist ähnlich derjenigen, die in Tab. 2 für die 5,6-*gauche*-Formen des Präcalciferols angegeben ist.

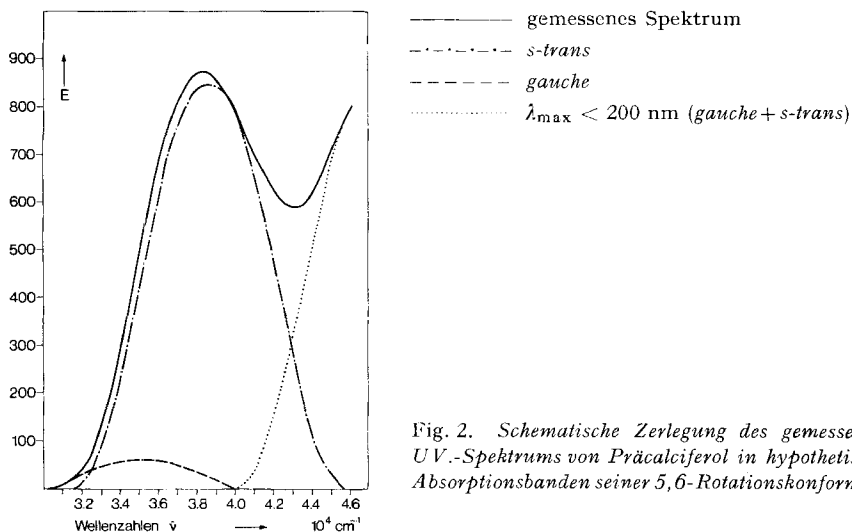


Fig. 2. Schematische Zerlegung des gemessenen UV.-Spektrums von Præcalciferol in hypothetische Absorptionsbanden seiner 5,6-Rotationskonformere

konformere in seinen Lösungen. Wie schon erwähnt, spricht z. B. für die Existenz von zwei *gauche*-Formen auch die Tatsache, dass die bei Belichtung konrotatorisch verlaufenden Ringschlüsse zum Lumisterin und Ergosterin ebenso wie die disrotatorisch verlaufenden thermischen Ringschlüsse zum Pyrocalciferol und Isopyrocalciferol aus sterischen Gründen nur aus solchen Konformationen (Tab. 2 und Schema 4) heraus möglich sind. Ähnliches gilt für die antarafaziale sigmatrope Umlagerung des Præcalciferols in das Vitamin D. Wie Schema 3 zeigt, ergeben sich zwanglos sämtliche photochemischen und thermischen Isomerisationen des Præcalciferols, wenn man davon ausgeht, dass in seinen Lösungen drei 5,6-Rotamere, nämlich zwei *gauche*-Formen und ein *s-trans*-Konformerer vorhanden sind.

Für die NMR.-Spektren danke ich Herrn Dr. *W. Arnold*, für die Gas-chromatogramme Herrn Dr. *M. Vecchi*; ferner Herrn Dr. *A. Boller* für die Herstellung und Reinigung des 3,3;20,20-Bisäthylendioxypregna-5,7-diens und Herrn *K. Schaffner* für die Durchführung der Versuche. Schliesslich möchte ich auch an dieser Stelle Herrn Dr. *G. Ernst* von unserer Datenverarbeitungsabteilung für seine Bemühungen um ihre Computeranalyse des UV.-Absorptionsspektrums von Præcalciferol danken.

### Experimenteller Teil

Herkunft und Reinheit der in den Versuchen eingesetzten chemischen Verbindungen, die Analysenmethode sowie die Bestrahlungsapparatur und ihre Wirkungsweise sind bereits früher [1] ausführlich beschrieben worden.

#### Versuche

1. 17,5 g Ergosterin wurden in 350 ml Dioxan p.a. *Merck* bei 18° 200 Std. mit einer Quecksilber-Hochdruck-*Hanauer*-Lampe TQ 150 unter Argon belichtet. Zwischen Bestrahlungsgut und Lampe befand sich eine 5 mm dicke Wasserschicht sowie eine Schicht von 6 mm Pyrexglas zur Eliminierung aller Strahlung mit Wellenlängen < 300 nm.

Neben dem nicht umgesetzten Ergosterin wurden im Reaktionsgemisch gas-chromatographisch Prävitamin D und Tachysterin erkannt. Dünnschichtchromatographisch liess sich ausserdem Lumisterin nachweisen. Für die NMR.-Spektroskopie wurde das Lösungsmittel bei 30° im Wasserstrahlvakuum abgezogen und der grösste Teil des Ergosterins und ein Teil des Lumisterins durch Kristallisation aus Methanol vom übrigen Reaktionsgemisch abgetrennt. Nach Abdestillation



des Methanols im Vakuum wurde der Rückstand in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommen. Das NMR.-Spektrum bestätigte die Anwesenheit von Prävitamin D, Tachysterin, Lumisterin und wenig Vitamin D und somit die Ringöffnung des Ergosterins mit langwelligem UV.

2. 0,15 g Lumisterin<sub>2</sub> wurden in 3 ml Dioxan p.a. bei 18° 2 Std. mit einer Quecksilber-Hochdruck-Hanauer-Lampe Q 600 unter Argon belichtet. Die Lösung befand sich in einer verschliessbaren Quarzküvette, wie sie üblicherweise bei spektralphotometrischen Messungen verwendet wird. Ihr war ein Filter aus 6 mm Pyrexglas vorgeschaltet und der Abstand zwischen Küvette und Lampe betrug 70 mm. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches entsprach ebenso wie die Analytik der im Versuch Nr. 1 beschriebenen. Wieder wurde Prävitamin D identifiziert und damit die Ringöffnung des Lumisterins durch Licht von  $\lambda > 300$  nm bewiesen. Der Nachweis der Folgeprodukte Ergosterin und Tachysterin war wegen ihrer geringen Mengen in diesem Fall unsicher.

3. 3 g 3,3,20,20-Bis-äthylendioxy-pregna-5,7-dien (Verb. E in Tab. 1) wurden in 1500 ml Benzol p.a. Merck bei 20° mit dem vollen Licht einer Quecksilber-Hochdruck-Hanauer-Lampe Q 700 unter Argon bestrahlt. Aus der kombinierten quantitativen Auswertung des Gas-Chromatogramms (mit Progesteron als internem Standard) und des NMR.-Spektrums (Protonen der Methylgruppen 18 und 19) ergab sich nach 20 Min. Belichtung folgende Zusammensetzung des Reaktionsgemisches:

Ausgangsmaterial (9 $\alpha$ ,10 $\beta$ ; E in Tab. 1)	41,2%
Verb. vom Prävitamin D-Typ (P in Tab. 1)	38,7%
Verb. vom Tachysterin-Typ (T in Tab. 1)	16,7%
Verb. vom Lumisterin-Typ (9 $\beta$ ,10 $\alpha$ )	3,4%

Nach Abdampfen des Benzols im Vakuum wurde der Rückstand in warmem Acetonitril aufgenommen, aus welchem beim Abkühlen die Hauptmenge des Ausgangsmaterials zusammen mit der schon entstandenen Retroverbindung (9 $\beta$ ,10 $\alpha$ ) auskristallisierte (1,25 g). Der Rest wurde nach Abdestillieren des Acetonitrils im Vakuum wieder in Benzol gelöst und mit der gleichen Lampe unter Einschaltung von 4 mm Pyrexglas weiterbestrahlt.

Die quantitative Auswertung der Gas-Chromatogramme und NMR.-Spektren (letztere von aliquoten Anteilen in  $\text{CDCl}_3$ ) lieferte nach verschiedenen Belichtungszeiten Reaktionsgemische der in Tab. 4 angegebenen Zusammensetzungen.

Tabelle 4

Bestrahlungszeit in Std.	E %	P %	T %	L %	D %
0 <sup>4)</sup>	9,8	63,2	27,0	–	–
1,5	10,8	58,4	20,0	10,8	–
3	11,9	51,0	16,1	15,9	4,9 <sup>6)</sup>
6	15,5	42,1	17,2	19,8	5,3 <sup>6)</sup>

Tab. 4 zeigt nicht nur die Zunahme von E und L, also die Entstehung von ringgeschlossenen Produkten aus P bei der Bestrahlung mit  $\lambda > 300$  nm, sondern auch die Abnahme von T, also die *trans/cis*-Isomerisation unter diesen Bedingungen.

*Messung des UV.-Spektrums von Prävitamin D<sub>2</sub>*. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben über die Lage des Absorptionsmaximums von Prävitamin D<sub>2</sub>: 265 nm [8]; 262 nm [9] und 260 nm [10]. Wegen der Luftempfindlichkeit des Präcalciferols war in [10] sein Spektrum durch Messung der UV.-Absorption des bestän-

<sup>4)</sup> Nach der Kristallisation zu Beginn der Belichtung mit Pyrex-Filter.

<sup>6)</sup> D = *seco*-Steroid vom Vitamin D-Typ, welches aus P entstand, da während der Dauer der Belichtung die Temperatur von 20° auf 26° anstieg.

digeren 3,5-Dinitrobenzoates (unter Abzug des Spektrums der 3,5-Dinitrobenzoylgruppe) ermittelt worden. Wir führten dagegen die UV.-Absorptionsmessungen nicht an seinen Derivaten, sondern am Prävitamin D<sub>2</sub> selbst durch, da diese Daten für eine Computer-Analyse des Spektrums benötigt wurden, mit der die Absorptionsbanden der einzelnen 5,6-Rotationskonformere identifiziert werden sollten.

Zunächst musste das Prävitamin D<sub>2</sub> hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde 1 g Ergosterin in 1000 ml Isopropylalkohol p.a. *Merck* mit einer Quecksilber-Niederdruck-*Hanauer*-Lampe NK 6/20 120 Min. unter Argon belichtet. Die Überführung der bestrahlten Lösung in die Destillationsapparatur erfolgte unter Argon. Ein schwacher Argonstrom schützte das Reaktionsgemisch auch beim Eindampfen zur Trockne im Vakuum bei 20°. Der durch nicht umgesetztes Ergosterin noch feste, weisse Rückstand wurde in 40 ml Cyclohexan gelöst und auf Kieselgelplatten<sup>6)</sup> (Dicke der Kieselgelschicht: 0,25 mm) dünn-schichtchromatographisch mit Cyclohexan/Äther 1:1 aufgetrennt. Um das Trocknen der Kieselgelschicht nach der Chromatographie zu verhindern, wurden die Platten unmittelbar danach mit 96proz. Äthanol besprüht. Zur Kennzeichnung der getrennten Zonen diente ihre Fluoreszenz im kurzwelligen UV. Nun wurde die von den anderen Komponenten deutlich abgesetzte Prävitamin D-Zone noch feucht herausgekratzt, in die Messküvette des Spektralphotometers eingefüllt und mit 3 ml Äthanol p.a. *Merck* überschichtet.

In die Vergleichsküvette kam die gleiche Menge Kieselgel einer ohne Reaktionsgemisch analog behandelten Kieselgelplatte und wurde ebenfalls mit 3 ml Äthanol überschichtet. 3 Min. in einer Zentrifuge mit 3500 U/Min. genügten jeweils, um das aufgeschlämmte Kieselgel auf dem Küvettenboden abzusetzen, so dass die UV.-Absorptionsmessungen ohne Filtration durchgeführt werden konnten. Dazu wurde ein *Beckman*-Spektralphotometer DBG mit *W. & W.*-Schreiber benutzt. Die Messung bestätigte die in [10] angegebene Lage des Absorptionsmaximums bei 260 nm. Tab. 5 enthält die gemessenen Extinktionen.

Tabelle 5. Bei verschiedenen Wellenlängen gemessene Extinktionen von Prävitamin D<sub>2</sub>

λ nm	E	λ nm	E	λ nm	E
216	0,807	248	0,777	282	0,570
218	0,779	250	0,803	284	0,520
220	0,742	252	0,828	286	0,469
222	0,702	254	0,846	288	0,418
224	0,662	256	0,862	290	0,373
226	0,629	258	0,874	292	0,328
228	0,603	260	0,879	294	0,287
230	0,589	262	0,875	296	0,242
231	0,588	264	0,865	298	0,204
232	0,589	266	0,851	300	0,167
234	0,596	268	0,832	302	0,138
236	0,611	270	0,809	304	0,110
238	0,632	272	0,780	306	0,085
240	0,658	274	0,743	308	0,068
242	0,689	276	0,704	310	0,053
244	0,719	278	0,663	312	0,041
246	0,749	280	0,620	314	0,032

<sup>6)</sup> Zuvor waren die Kieselgelplatten zweimal mit 96proz. Äthanol eluiert und 1 Std. bei 100° im Vakuum getrocknet worden. Dann hatte man das Vakuum mit Argon gebrochen und die Platten kamen nicht mehr mit Luft in Berührung. Alle Operationen wie Auftragen des Reaktionsgemisches, die eigentliche Chromatographie, das Markieren der getrennten Zonen unter der Fluoreszenzlampe sowie das Herauskratzen und Einfüllen in die verschliessbaren Messküvetten wurden in einem mit Argon gefüllten Kasten durchgeführt.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *K. Pfoertner & J.-P. Weber*, *Helv.* 55, 921 (1972).  
 [2] *L. Velluz, G. Amiard & B. Goffinet*, *Bull. Soc. chim. France* 1955, 1341.  
 [3] *M. P. Rappoldt*, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 79, 1012 (1960).  
 [4] *H. H. Inhoffen & K. Irmscher*, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 17, 70 (1959); *A. Verloop, A. L. Koevoet & E. Havinga*, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 76, 689 (1957); *J. Pot*, *Diss. Univ. Leiden*, 1964; *L. H. Sharpe*, *Diss. Michigan State Univ., Ann. Arbor* 1957.  
 [5] *G. M. Sanders, J. Pot & E. Havinga*, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 27, 131 (1969).  
 [6] *H. Günther, H. Klose & D. Cremer*, *Chem. Ber.* 104, 3884 (1971); *A. L. Segre, L. Zetta & A. DiCorato*, *Abstracts of the NATO-Summer-School on NMR.-Spectroscopy, Coimbra, Portugal*, Sept. 1968.  
 [7] *L. Dorfman*, *Chem. Rev.* 53, 47 (1953).  
 [8] *L. Velluz, G. Amiard & A. Petit*, *Bull. Soc. chim. France* 16, 501 (1949).  
 [9] *H. H. Inhoffen, K. Bruckner, K. Irmscher & G. Quinkert*, *Chem. Ber.* 88, 1424 (1955).  
 [10] *W. H. C. Shaw, J. P. Jefferies & T. E. Holt*, *Analyst* 82, 2 und 8 (1957).

## 98. A Chiral Cystine Disulfide Group without Inherent Optical Activity in the Long-Wavelength Region (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR., UV., CD., and ORD. Studies with *cyclo*-L-Cystine)

by **B. Donzel, B. Kamber**<sup>1)</sup>, **K. Wüthrich** and **R. Schwyzer**

Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule, 8049 Zürich

(10. 2. 72)

*Zusammenfassung.* Konformation und Konfiguration von *cyclo*-L-Cystin wurden mit spektroskopischen Methoden untersucht. Nach <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR. besitzt die Molekel einen wannenförmigen Diketopiperazin-Ring (C<sub>α</sub>H--NH-Diederwinkel  $\simeq 40^\circ$ ) und eine *chirale* Ausbildung der Disulfidbrücke. In Molekelmodellen mit diesen Spezifikationen beträgt der C-S-S-C-Diederwinkel  $\varphi \simeq 90^\circ$ . Im CD. war aber kein langwelliger *Cotton*-Effekt zu beobachten, welcher auf eine inhärente optische Aktivität des asymmetrischen Disulfid-Chromophors hinwiese. Dieses Verhalten stützt die Theorie von *Linderberg & Michl* [3b], wonach bei Disulfiden mit  $\varphi = \pm 90^\circ$ , infolge der Entartung der beiden Elektronenübergänge niederer Energie und der irreduziblen Darstellung *A* bzw. *B*, die sonst getrennten Absorptionsbanden bei 250 nm zusammenfallen und ihre entgegengesetzten Rotationsstärken sich aufheben.

Den starken, negativen *Cotton*-Effekt bei 228 nm (CD., in Äthanol) ordnen wir dem  $n, \pi^*$ -Übergang der Peptid-Carbonylgruppe zu. Vorzeichen und Rotationsstärke ( $R = -45,4 \times 10^{-40}$  erg · cm<sup>3</sup>) dieser Bande deuten wir als starke Indizien für das Vorliegen des *cyclo*-L-Cystins als *P*-helikales Diastereomeres.

**1. Introduction and Conclusions.** – The disulfide chromophore is known to have two UV. absorption regions: one at about 180–200, and the other at about 220–300 nm. The long-wavelength absorption is dependent on the disulfide dihedral angle  $\varphi$  [2], exhibiting either one band at roughly 245–250 nm ( $\varphi \simeq \pm 90^\circ$ ) or two bands positioned symmetrically at each side of this value. These phenomena can be explained by assuming one or more angle-independent transitions ( $\sigma, \sigma^*$ ?) to be

<sup>1)</sup> Scientist of the Chemische Forschungslaboratorien der Division Pharmazeutika der CIBA-GEIGY AG, 4000 Basel, who first prepared and studied the chemistry of the various samples of *cyclo*-L-cystine [1].