

Ein effektives Verfahren zur Herstellung von 1 α ,25-Dihydroxy-cholecalciferol (Calcitriol) aus 1 α ,3 β ,25-Trihydroxy-cholesta-5,7-dien (Procalcitriol)

M. Reichenbächer, S. Gliesing, C. Lange und M. Gonschior

Jena, Friedrich-Schiller-Universität, Institut für Anorganische und Analytische Chemie

B. Schönecker

Jena, Friedrich-Schiller-Universität, Institut für Organische und Makromolekulare Chemie

Eingegangen am 11. Juli 1995 bzw. 4. März 1996

An Effective Procedure for the Synthesis of 1 α ,25-Dihydroxy-cholecalciferol (Calcitriol) Starting with 1 α ,3 β , 25-Trihydroxy-cholesta-5,7-diene (Pro-Calcitriol)

Abstract. In order to develop an effective synthesis of the important vitamin D metabolite 1 α ,25-(OH)₂-cholecalciferol (calcitriol) **5a** starting with pro-calcitriol **1a** the influence of reaction temperature and degree of turnover of **1a** to the compositions of the photoproducts at irradiation in a 500 ml photoreactor were investigated. The combination of the highly photostable filter solution consisting of 2,7-dimethyl-3,6-diaza-cyclohepta-1,6-diene-tetrafluoroborate and biphenyl in ethanol realizes the double wavelength irradiation in the range of 290 to 300 nm and >330 nm resulting in a highly amount of the desired pre-calcitriol **2a**. The reversible photoisomers

of pre-calcitriol **2a** 1 α ,25-(OH)₂-lumisterol₃ **4a** and 1 α ,25-(OH)₂-tachysterol₃ **3a** were isolated from an irradiation mixture in pure form by means of an appropriate combination of flash-chromatography, MPLC and preparative HPLC, respectively. The isomers **2a**, **3a** and **4a** were characterized chromatographically and spectroscopically. Photoisomerization of **1a** at -45 °C using the filter solution mentioned above and recycling all reversible photoisomers resulted in highly pure **5a** after thermally induced isomerization of **2a** isolated from the irradiation mixture by means of flash-chromatography on Ag⁺-impregnated silica with a yield of 68%.

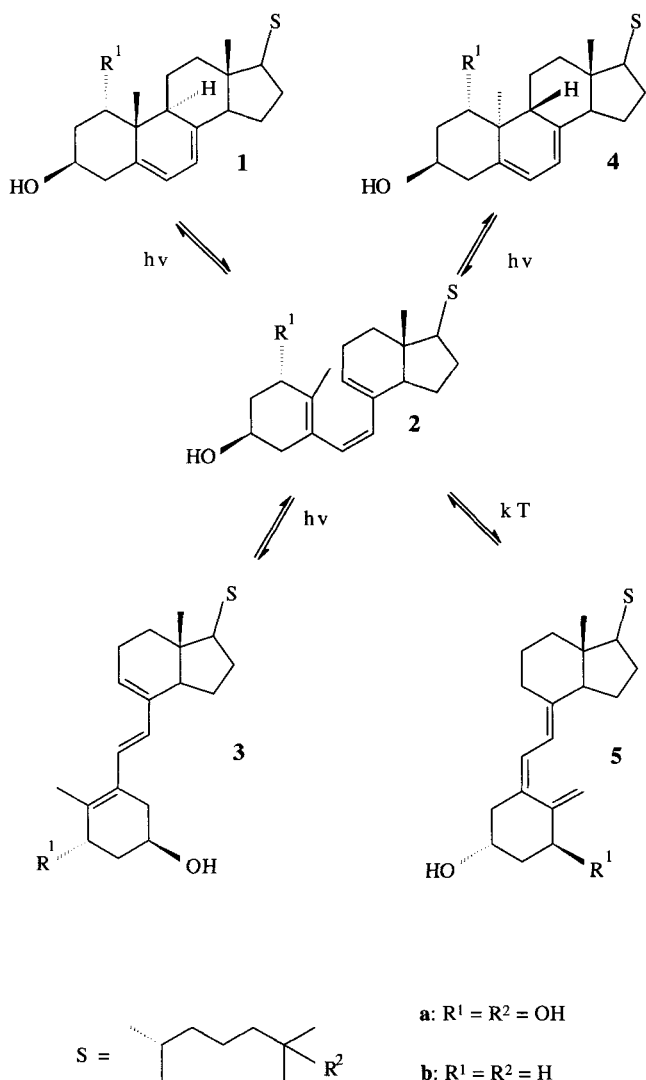
Der durch Hydroxylierung von Vitamin D₃ **5b** in Leber und Niere gebildete Vitamin D₃-Metabolit 1 α ,25-Dihydroxy-cholecalciferol (Calcitriol) **5a** ist die hormonell aktive Form von Vitamin D₃ [1]. Ihm kommt eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Calcium- und Phosphatstoffwechsels zu. Darüber hinaus hemmt dieser Vitamin-D-Metabolit die Zellproliferation, induziert Zelldifferenzierung und verfügt über immunoregulatorische Wirkungen [2]. Aufgrund der großen biologischen und medizinischen Bedeutung interessieren daher effektive Synthesen für **5a** und weitere Vitamin-D-Metaboliten (siehe Beispiele in [3]).

Erste Synthesestrategien [4] für **5a** führten in Analogie zur klassischen Vitamin-D-Synthese über dessen Precursor, 1 α ,25-Dihydroxy-prävitamin D₃ **2a**, der photochemisch aus 1 α ,3 β ,25-Trihydroxy-cholesta-5,7-dien (1 α ,25-Dihydroxy-provitamin D₃) **1a** gebildet und thermisch zu **5a** isomerisiert wird (siehe Schema 1 [5]). Da letztere Reaktion mit entsprechendem Recycling praktisch quantitativ geführt werden kann, bestimmt ausschließlich der Bestrahlungsschritt im Syntheseweg über

1a die Effizienz der Calcitriol-Gesamtsynthese. Die wichtigsten Verfahren zur Optimierung des photochemischen Schrittes für die klassische Vitamin-D-Synthese sind in [6] zusammengestellt.

Im Rahmen früherer photokinetischer Untersuchungen über den Einfluß der Bestrahlungswellenlängen auf die Produktzusammensetzung bei der Photoisomerisierung von Provitamin D₃ **1b** konnten wir zeigen, daß der maximale Anteil am gewünschten Prävitamin D₃ **2b** bei synchroner Doppelwellenlängenbestrahlung mit den Wellenlängen 296 und 330 nm im Intensitätsverhältnis 1:10 erzielt werden kann [7]. Durch geeignete Filterlösungen konnte der theoretisch ermittelte hohe Anteil von 84% **2b** im 500 ml Photoreaktor bei 0 °C mit Ausbeuten von 75 bis 80% an Vitamin D₃ nach thermischer Isomerisierung erreicht werden [8].

DAUBEN zeigte am Beispiel von 1 α -Hydroxy-provitamin D₃, daß die bei der Photoisomerisierung von **1b** übliche Reaktortemperatur von 0–5 °C zu einem hohen Anteil irreversibler Nebenprodukte, den sog. „Überbestrahlungsprodukten“ [5] führt und deren An-



Schema 1 Photochemische und thermische Isomerisierung von Prävitamin D (2)

teil auch bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ im Bestrahlungsverlauf rasch ansteigt [9]. Verbesserung der Ausbeute durch Abbruch der Photoreaktion nach geringem Umsatz an **1a** (<30%) und Recycling aller Photoisomeren wird durch die bisher schwierigen chromatographischen Trennungen in der Metaboliten-Reihe [10] verhindert. Es wurden daher zusätzliche Derivatisierungsreaktionen zur Verringerung der Bildung irreversibler Nebenprodukte und zur Verbesserung der Selektivität chromatographischer Trennungen durchgeführt (Beispiele siehe in [1a]). Dadurch und durch nachfolgende Abspaltung der Schutzgruppen treten Ausbeuteverluste auf, so daß für die bisher beschriebenen Synthesen von Vitamin-D-Metaboliten über den Weg der photochemischen Isomerisierung nur unbefriedigende Ausbeuten realisiert wurden. Für Calcitriol **5a**, beispielsweise, liegen publizierte Ausbeuten nicht höher als maximal 38%, bezogen auf **1a** [4c].

Eine photochemische Variante [11], bei der im ersten Bestrahlungsschritt mit Licht der Wellenlänge 254 nm Provitamin D **1** hauptsächlich zu Tachysterol **3** isomerisiert, dieses aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt und in einem zweiten Bestrahlungsschritt triplettsensibilisiert zu Prävitamin **2** zurück bestrahlt wird, bringt jedoch wegen der wesentlich schwierigeren Trennungen der Bestrahlungsgemische und der deutlich geringeren Stabilität hydroxylierter Tachysterole [12a,b] keine Vorteile bei der Synthese von Vitamin-D-Metaboliten im präparativen Maßstab (siehe in [1a]).

Effizientere Synthesewege von Vitamin D-Metaboliten sind – sicher auch aufgrund des bisher uneffektiven photochemischen Syntheseschrittes – über Partial- und Totalsynthesen erarbeitet worden (Beispiele siehe in [1] und [3]).

Um den photochemischen Syntheseweg für Vitamin-D-Metaboliten attraktiver zu gestalten, haben wir am Beispiel des Vitamin-D-Metaboliten Calcitriol (**5a**) Reaktionsbedingungen erkundet, die unter Anwendung der von uns entwickelten synchronen Doppelwellenlängenbestrahlung und Recycling aller reversibler Photoisomeren hohe Ausbeuten, wie sie bereits für Vitamin D₂ und D₃ realisiert worden sind [7b, 8], auch für **5a** reproduzierbar ermöglichen.

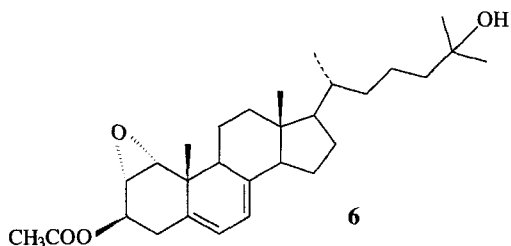
Für den biologisch und medizinisch relevanten Vitamin-D-Metaboliten **5a** ist neben der Ausbeute vor allem die erreichbare Reinheit ein wichtiges Kriterium für einen akzeptablen Syntheseweg. Deshalb war es erforderlich, Gehalt und Reinheit des synthetisierten Produktes umfassend zu dokumentieren und die in der Literatur noch unsicheren Daten, vor allem den molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_{max}) von **5a** statistisch abgesichert zu bestimmen.

Die Rückführung der reversiblen Photoisomeren Tachysterol **3a** und Lumisterol **4a** in den Bestrahlungsprozeß erfordert Kenntnis der Retentionsfaktoren dieser Isomeren für die bei der Trennung des Bestrahlungsgemisches angewendeten chromatographischen Bedingungen. Zur Ermittlung dieser Daten sowie zur quantitativen HPLC-Analyse für die Optimierung der Reaktionsbedingungen mußten **3a** und **4a** in reiner Form isoliert und spektroskopisch sowie chromatographisch charakterisiert werden.

Ergebnisse und Diskussion

1 α ,3 β ,25-Trihydroxy-cholesta-5,7-dien (Procalcitriol) (**1a**)

Das für die photochemische Synthese von Calcitriol **5a** erforderliche Provitamin **1a** wurde aus 3 β -Acetoxy-1 α ,2 α -epoxy-25-hydroxy-cholesta-5,7-dien **6** [13] durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid dargestellt. Durch Kristallisation kann **1a** in der für die photochemische Synthese erforderlichen Reinheit von min-



destens 90% (UV-Spektroskopie) erhalten werden. Die Bestimmung spektroskopischer und analytischer Daten von **1a** wurde mit einer flash-chromatographisch gereinigten Substanz (99,8%; HPLC) vorgenommen.

Einfluß von Reaktionstemperatur und Bestrahlungszeit auf die Photoisomerisierung von **1a**

Der Einfluß der Reaktionstemperatur auf den Bestrahlungsverlauf von **1a** wurde durch die Analyse der bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen erhaltenen Bestrahlungsgemische mittels HPLC untersucht.

In Abb. 1 sind die Konzentrations-Zeit-Kurven für die photochemische Bildung der Photoisomeren Provitamin **1a**, Prävitamin **2a**+Lumisterol **4a** sowie Tachy-

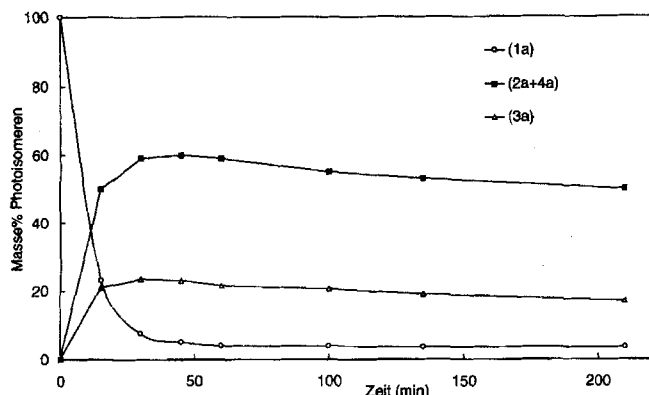


Abb. 1 Konzentrations-Zeit-Verlauf für **1a**, **2a+4a** und **3a** bei der Photoisomerisierung von **1a** bei -45 °C

sterol **3a** bei einer Reaktionstemperatur von -45 °C dargestellt. Unter den HPLC-Bedingungen (Lichrospher DIOL $5\text{ }\mu\text{m}$, $150\times 3\text{ mm}$, *iso*-Propanol/*n*-Hexan (1:9)) werden **4a** und **2a** mit gleicher Retentionszeit eluiert. Der Anteil an **4a** wird jedoch erst bei höherem Umsatzgrad merklich und verfälscht daher die ermittelte Produktzusammensetzung nur unwesentlich. Bei der Photoisomerisierung von **1b** beträgt der Anteil an **4b** unter den gewählten Bestrahlungsbedingungen im quasi-photostationären Zustand nur maximal 5–6% [7b].

Abb. 1 und Abb. 2 zeigen, daß die Photoisomerisierung von **1a** bei einer Reaktionstemperatur von -45 °C über einen quasi-photostationären Zustand führt und irreversible Nebenprodukte erst nach längerer Bestrah-

lungszeit im Reaktionsgemisch verstärkt gebildet werden. Bei -45 °C zeigt **1a** somit einen ähnlichen Bestrahlungsverlauf wie **1b** bei 0 bis -5 °C [5, 7b]. Das repräsentative HPLC-Chromatogramm einer Bestrahlungslösung im Bereich des quasi-photostationären Zustandes (Abb. 3) dokumentiert den hohen Anteil an **2a** bei weitgehendem Umsatz an **1a** und den relativ geringen Anteil unbekannter Nebenprodukte. Zur Bewertung dieser Nebenprodukte ist das bei 220 nm registrierte Chromatogramm (Abb. 3a) aussagekräftiger, da diese Produkte vorwiegend kurzzeitig absorbieren. Außerdem geben die bei dieser Detektionswellenlänge erhaltenen Flächenprozentage das Produktverhältnis **2a/3a** wegen annähernd gleicher Extinktionskoeffizienten beider Isomeren bei 220 nm [12] realistisch wieder.

Bei einer Reaktionstemperatur von -5 °C führt die Photoisomerisierung von **1a** schon frühzeitig zur Bildung eines erheblichen Anteils mehrerer unbekannter, kurzzeitig absorbierender Nebenprodukte (siehe Abb.

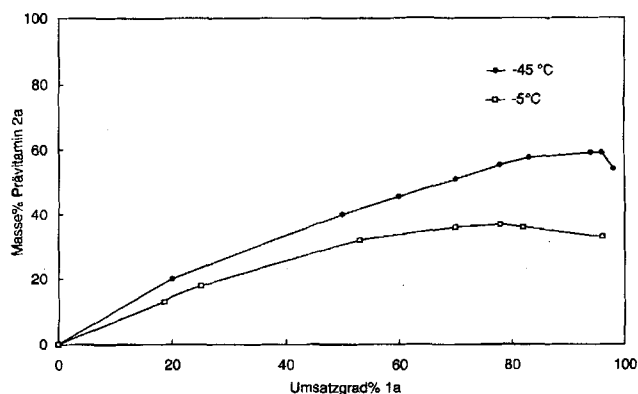


Abb. 2 Prozentualer Anteil **2a** in Abhängigkeit vom Umsatzgrad **1a** bei der Reaktionstemperatur -5 °C und -45 °C

2 und 4), deren summarischer Anteil beispielsweise bei ca. 75-proz. Umsatz an **1a** bereits mehr als doppelt so groß ist wie bei -45 °C und schnell auf über 35% ansteigt. Längere Bestrahlungszeit bei -5 °C bewirkt schließlich eine völlige Photolyse der Isomeren **1a–4a** [12a,b]. Bezüglich der Reaktionstemperatur zeigt somit **1a** ein ähnliches Verhalten bei der Photoisomerisierung wie 1α -Hydroxy-provitamin D_3 [9]. Zur Minimierung von Ausbeuteverlusten sollte daher der Bestrahlungsschritt bei Reaktionstemperaturen $\leq -45\text{ °C}$ durchgeführt werden.

Durch die Kombination der Tauchlampe TQ 150 Z1 mit einer Filterlösung aus 1,6 g/l Biphenyl und 0,08 g/l 2,7-Dimethyl-3,6-diaza-cycloheptadien-tetrafluorborat [8a] in Ethanol kann im Photoreaktor die für die synchrone Doppelwellenlängenbestrahlung günstige Emissionscharakteristik (Abb. 5) erzeugt werden. Analog zur Photoisomerisierung von **1b** bei $0\text{–}5\text{ °C}$ werden bei einer Reaktionstemperatur von $\leq -45\text{ °C}$ zeitliche Kon-

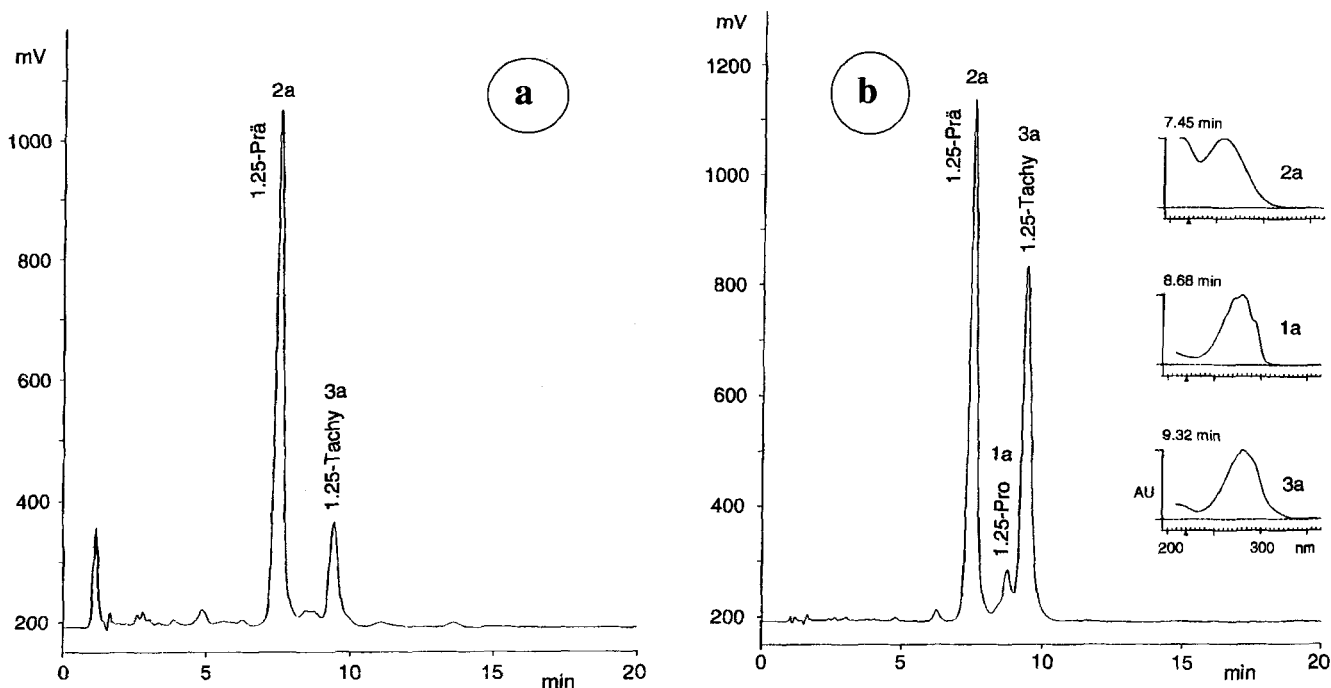


Abb. 3 HPLC eines bei $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhaltenen Bestrahlungsgemisches von **1a** im Bereich des *quasi*-photostationären Zustandes; (a) $\lambda_{\text{Det}} = 220\text{ nm}$ (b) $\lambda_{\text{Det}} = 265\text{ nm}$, sowie die im Maximum registrierten DAD Spektren der drei Hauptpeaks von **2a**, **1a** und **3a**, angeordnet in der Reihenfolge ihrer Elution

zentrationsverläufe mit einem Anteil von ca. 60% an gewünschtem **2a** im *quasi*-photostationären Zustand erhalten. Um den Anteil unerwünschter Nebenprodukte zu minimieren, sollte der Bestrahlungsprozeß jedoch nach ca. 60% Umsatz an **1a** abgebrochen werden (siehe Abb. 2).

Für die Abtrennung von **2a** sowie der reversiblen Photoisomeren **1a**, **3a** und **4a** zwecks Rückführung in den Bestrahlungsprozeß ist die einfache Flash-Chromatographie [14] mit der in [15] beschriebenen verbesserten Apparatur unter Verwendung von Trennsäulen mit silberimprägniertem Kieselgel geeignet.

Die unter den erkundeten Bestrahlungsbedingungen (Filterlösung; $\leq -45\text{ }^{\circ}\text{C}$; 60 prozentiger Umsatz an **1a**) erzielbare hohe Konzentration an **2a**, der geringe Anteil unbekannter Nebenprodukte von nur ca. 5–7% und die Rückführung der reversiblen Photoisomeren **1a**, **3a** und **4a** nach flash-chromatographischer Abtrennung in den Bestrahlungsprozeß ermöglicht eine Ausbeute von 76% für **2a**, bezogen auf **1a**.

*1a,25-Dihydroxy-tachysterol*₃ (**3a**)

*1a,25-Dihydroxy-lumisterol*₃ (**4a**)

Die Isolierung von **3a** und **4a**, ausgehend von **1a**, nach Bestrahlung mit jeweils einer spezifisch angepaßten Filterlösung und ihre spektroskopische Charakterisierung ist von uns erstmals in [12a] mitgeteilt. Im folgen-

den wird eine vereinfachte Prozedur für die Isolierung dieser Isomeren aus dem gleichen Bestrahlungsgemisch beschrieben, wie es auch bei der photochemischen Synthese von **2a** erhalten wird.

1a wird bei $\leq -45\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einem Umsatz von mindestens 80% bestrahlt. Das erhaltene Produktgemisch wird an silberimprägniertem Kieselgel flash-chromatographisch in zwei Fraktionen getrennt: Fraktion 1 mit **2a** und **3a** sowie Fraktion 2 mit **1a** und **4a**. Aus Fraktion 1 kann **3a** mittels MPLC an Lichroprep Si 60 isoliert werden. Für die Abtrennung von **4a** aus dem Gemisch der Fraktion 2 ist die präparative HPLC unter Verwendung einer Diolsäule erforderlich. **4a** wird vor **1a** eluiert, und alle weiteren Nebenprodukte sind ebenfalls quantitativ abtrennbar. Die hohe Reinheit des so erhaltenen **4a** wird durch HPLC sowie den großen Wert für das Extinktionsverhältnis E_{274}/E_{230} dokumentiert, da kurzweilig absorbierende "Überbestrahlungsprodukte" rasch den Extinktionswert am Minimum der Absorptionsbande von **4a** bei 230 nm erhöhen und daher den Wert des Extinktionsverhältnisses vermindern. Andererseits bewirken wegen des wesentlich größeren Exkursionskoeffizienten von **3a** bei $\lambda_{\text{max}} = 282\text{ nm}$ schon geringe Anteile an **3a** bei **4a** eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 274 zu 282 nm. Die Charakterisierung von **3a** sowie **4a** erfolgte durch UV, $^1\text{H-NMR}$ und MS. Kürzlich ist von OKAMURA und Mitarb. **4a**,

jedoch ausgehend von **5a**, beschrieben worden [16]. Die spektroskopischen Daten stimmen mit dem von uns dargestellten Produkt im wesentlichen überein.

1 α ,25-Dihydroxy-prävitamin D₃ (**2a**)

Die Bestrahlung von **1a** erfolgt bei ≤ -45 °C bis zu einem Umsatz von 50–60%. Ein weiterer Umsatz an **1a** erhöht den Anteil unbekannter Nebenprodukte auf Kosten von **2a**. Das Produktgemisch wird wiederum flash-chromatographisch an silberimprägniertem Lichroprep Si 60 in die drei Fraktionen **2a**, **3a** sowie **1a+4a** getrennt. Die bei der Photoisomerisierung gebildeten unbekannt Nebenprodukte verteilen sich aufgrund ihres unterschiedlichen chromatographischen Verhaltens an silberimprägniertem Kieselgel auf alle Fraktionen.

Die Fraktion mit **1a/4a** wird nach Kristallisation dem Bestrahlungsrecycling zugeführt, was im Prinzip auch für **3a** möglich ist. Da jedoch bei Anregung von **3a** in den S₁-Zustand ein erheblicher Anteil unbekannter Steroide entsteht, ist der Triplettweg [5] unter Verwendung eines geeigneten Sensibilisators [17] für die Rückisomerisierung von **3a** nach **2a** in einem gesonderten Bestrahlungsprozeß der direkten Photoisomerisierung vorzuziehen. **2a** kann vom Sensibilisator und geringen Nebenprodukten flash-chromatographisch leicht wieder quantitativ abgetrennt werden. Die auf diesem Wege erreichte Ausbeute an **2a** beträgt nach Recycling ca. 70%. Nach flash-chromatographischer Reinigung an Lichroprep Si 60 konnte **2a** erstmals in kristalliner Form erhalten werden. Die spektroskopische Charakterisierung erfolgte durch UV, MS und ¹H-NMR.

1 α ,25-Dihydroxy-cholecalciferol (Calcitriol (**5a**))

Die Abtrennung von **5a** aus dem Gemisch der thermischen Isomerisierung erfolgt flash-chromatographisch an Lichroprep Si 60, 25–40 μ m, und **2a** wird erneut thermisch isomerisiert. Nach zweimaligem Recycling

kann die thermische Isomerisierung von **2a** zu **5a** praktisch quantitativ realisiert und somit eine Ausbeute von 68% für **5a**, bezogen auf **1a**, erreicht werden.

Nach Kristallisation aus Methylformiat und Trocknung im Hochvakuum wurde **5a** reproduzierbar mit einer Reinheit von 99,5% (HPLC) im 200 mg Maßstab erhalten.

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen photochemischen Synthese von Präcalcitriol **2a** unter Anwendung der synchronen Doppelwellenlängenbestrahlung, Reaktionstemperaturen ≤ -45 °C und Recycling aller flash-chromatographisch abtrennbarer reversibler Photoisomeren **1a**, **3a** und **4a** wurden reproduzierbare Ausbeuten an **5a** erzielt, die mit 65–70% (bezogen auf **1a**) etwa doppelt so hoch wie publizierte Werte sind. Die Anwendung der Flash-Chromatographie zur Realisierung aller erforderlichen Trennungen ermöglicht außerdem eine weitere Maßstabsvergrößerung, ohne Kosten und apparativen Aufwand wesentlich zu erhöhen. Die mit dieser Synthese erzielbare hohe Reinheit von **5a** wird mit einem Ausgangsprodukt **1a** erreicht, dessen UV-spektroskopisch bestimmter Gehalt mindestens 90% beträgt. Diese Eduktqualität kann durch Kristallisation leicht erzielt werden.

Das für **5a** beschriebene Verfahren läßt sich mit gleicher Effizienz auch auf die photochemische Synthese anderer Vitamin-D-Metaboliten aus den jeweiligen Provitamin D-Startverbindungen bei jeweils individuell optimierten chromatographischen Trennbedingungen übertragen [18].

Beschreibung der Versuche

Alle Arbeitsgänge zur Photoisomerisierung und Isolierung der Photoisomeren wurden unter Argon durchgeführt. Isolierte Zwischen- und Endstoffe wurden unter Argon und Ausschluß von UV-Licht bei -18 °C aufbewahrt.

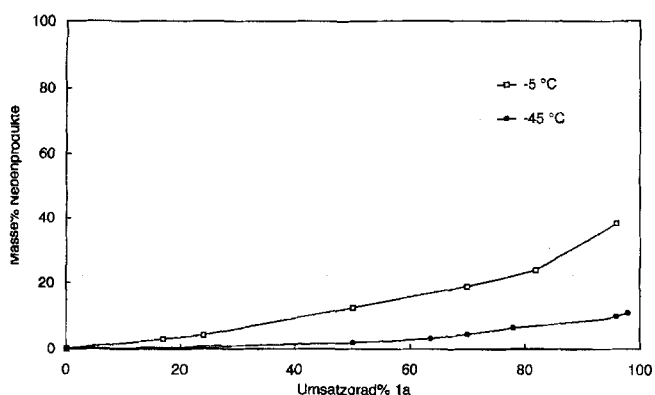


Abb. 4 Summarischer Anteil irreversibler Nebenprodukte bei der Photoisomerisierung von **1a** in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit bei -5 °C und -45 °C

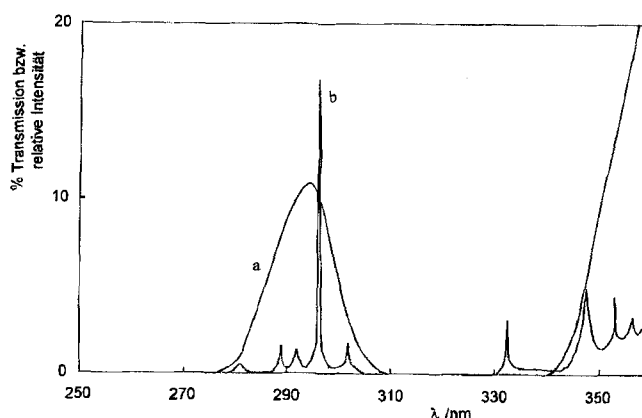


Abb. 5 Transmissionscharakteristik der Filterlösung (a) und Emissionsspektrum der Kombination TQ 150 Z1/Filterlösung (b)

Handelsübliche Lösungsmittel für photochemische und spektroskopische Arbeiten (UV-Spektroskopie-Grade) und für chromatographische Trennungen (HPLC-Grade) wurden ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt. – NMR-Angaben: δ (ppm).

Für die DC wurden HPTLC-Platten (Merck; 5629) verwendet, und silberimprägnierte DC-Platten wurden aus HPTLC-Fertigplatten durch Behandlung mit einer 2 proz. Silbernitratlösung unmittelbar vor dem Gebrauch selbst hergestellt.

Analytische HPLC – Untersuchungen erfolgten mit einer Apparatur der Fa. Perkin-Elmer (Binary LC-Pump 250, Diode Array Detector 235 C, Zweikanal-Integrator 1020 - PE Nelson, Rheodyne-Ventil Typ 7125, 20 μ l Probenschleife) unter Verwendung der Säule Lichrospher DIOL, 5 μ m, 3 \times 150 mm (Merck Nr. 15670) mit Vorsäule (Lichrospher DIOL, 5 μ m, 3 \times 30 mm; Merck Nr. 15650) und dem Eluenten *iso*-Propanol/*n*-Hexan (1:9).

Die verwendete Apparatur zur Flash-Chromatographie ist in [15] beschrieben. Als Trennsäulen wurden MPGC-Säulen (180 \times 37 sowie 180 \times 26 mm; Fa. Labomatic) eingesetzt, und als stationäre Phasen wurden Lichroprep Si 60, 40–63 μ m (Merck Nr. 13 905), silberimprägniertes Lichroprep Si 60, 40–63 μ m (hergestellt durch Behandlung mit einer 2 proz. Silbernitratlösung) sowie Lichroprep Si 60, 25–40 μ m (Merck Nr. 9390) verwendet. Die Detektion der Fraktionen erfolgte mittels DC.

Chromatographische Trennungen im Mitteldruckbereich erfolgten mit einer MPLC-Anlage der Fa. Labomatic (MD-80 Pumpeneinheit, UV-Spektralphotometer, 5 ml Probenschleife, Line Recorder) unter Verwendung einer 180 \times 18,5 mm MPGC-Trennsäule, trocken gefüllt mit Lichroprep Si 60, 15–25 μ m (Merck Nr. 9336).

Die präparative HPLC wurde mit einer Apparatur der Fa. Shimadzu (2 LC-8A Pumpen, Entgaser ERC 3520, UV/VIS-Spektrophotometer SPD-10, Rheodyne Injektor Typ 7125 mit 500 μ l Probenschleife) unter Verwendung einer Diol-Säule (7 μ m, 250 \times 10 mm; Merck Nr. 50 972) durchgeführt.

Zur Photoisomerisierung von **1a** wurde ein handelsüblicher 500 ml Photoreaktor mit magnetischer Umwälzung der Reaktionslösung und Quarzkühlrohreinsetzung verwendet (Fa. G. H. Peschl, Bodenheim). Als Strahler wurde die Tauchlampe TQ 150 Z1 (Fa. G. H. Peschl, Bodenheim) eingesetzt. Die Filterlösung aus Biphenyl (1,6 g/l) und 2,7-Dimethyl-3,6-diazacycloheptadien-tetrafluorborat [8a] (0,08 g/l) in Ethanol wurde in einem 4 l Umwälzkryostat auf ≤ -45 °C gekühlt und durch das Quarzkühlrohr gepumpt. Auf diese Weise wird im Unterschied zur herkömmlichen Außenkühlung eine niedrigere Reaktionstemperatur am Ort der Bestrahlung realisiert.

1 α ,3 β ,25-Trihydroxy-cholesta-5,7-dien (**1a**)

Zu 913 mg (2 mmol) **6** in 10 ml abs. THF wurde unter Rühren eine Lösung von 274 mg (7,2 mmol) LiAlH₄ in 40 ml THF bei –20 °C zugetropft (20 min) und bei 40 °C bis zum vollständigen Umsatz weiter gerührt. DC-Kontrolle (DC-Fertigplatte, Merck Nr. 5629, Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1)): R_f (**6**) = 0,60; R_f (**1a**) = 0,19. Danach wurde das Gemisch vorsichtig in einen 1l Scheidetrichter auf 500 g Eis und 100 ml Ether gegossen. Nach Filtration wurde die wäßrige Phase 5 mal mit je 50 ml Ether extrahiert, und die vereinigten Extrakte wurden 3 mal mit je 20 ml Wasser neutral gewaschen. Der Filtrierstand wurde 3 mal mit 100 ml Methanol unter Rückfluß extra-

hiert, der Extrakt zur Trockne eingeengt und mit dem etherischen Extrakt vereinigt. Nach Trocknung über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Erhalten wurden 813 mg Rohprodukt (97,6%, bezogen auf **6**).

Reinigung durch Kristallisation: 500 mg Rohprodukt **1a** wurden in 200 ml Ethylacetat/Aceton (7:3) unter Rückfluß gelöst, filtriert, im Vakuum konzentriert und bei –18 °C kristallisiert. Es wurden 395 mg **1a** (weiße Nadeln) erhalten, die bei 10^{–2} Torr getrocknet wurden. – UV(Methanol): λ_{\max} = 282 nm; Gehalt (UV-Spektroskopie): 91,8%; *F*: 188–196 °C; HPLC (254 nm): 93,2 Fl.-% **1a** (RT = 8,5 min), intensivstes Nebenprodukt 4,2 Fl.-% (RT = 8,0 min), Summe weiterer Nebenprodukte < 1 Fl.-%.

Flash-chromatographische Reinigung: 30 mg durch Kristallisation vorgereinigtes **1a** wurden in 20 ml Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1) gelöst und flash-chromatographisch (Lichroprep Si 60, 40–63 μ m; Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1)) getrennt. Die **1a** enthaltenen Fraktionen (DC-Kontrolle) wurden im Vakuum bei < 20 °C eingeengt. **1a** wurde zweimal aus dem Eluentengemisch kristallisiert.

Flüchtige Bestandteile: DTA (25–160 °C, 5 °C/min) < 1 m-%; Reinheit: HPLC (250 nm) = 99,8 Fl.-%, 2 Nebenprodukte mit je 0,1 Fl.-%; DC, Normalphase, Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1): R_f = 0,19; DC, silberimprägniert, Ethylacetat/Aceton (7:3): R_f = 0,16; *F*: 204–206 °C (148–152 °C [4b]; 207–208 °C [19]; 211–13 °C [4c]). – UV (Methanol): Maxima bei 262 (Sch), 272, 282, 294 nm, ϵ_{282} (bezogen auf die Trockensubstanz) = (11 600 \pm 250) l/molcm (f = 10 FG; α = 0,95), (vgl.: 11 100 (Ethanol) [4c]; 11 800 (Ethanol) [19]). – ¹H-NMR (300 MHz; D₆-DMSO/TMS): 0,58 (s, H-18), 0,79 (s, H-19), 0,93 (d, *J* = 6,2 Hz, H-21), 1,06 (s, H-26/27), 3,54 (m, 1 β -H), 3,80 (m, 3 α -H), 4,05 (s, 25-OH), 4,47 (d, *J* = 5,3 Hz, 1-OH), 4,64 (d, *J* = 4,4 Hz, 3-OH), 5,28 (m, H-6/7), 5,50 (dd, *J* = 5,8/2,1 Hz, H-6/7) (entsprechen den in CDCl₃ erhaltenen ¹H-NMR-Daten [4c]). – ¹³C-NMR (75,4 MHz, D₆-DMSO/TMS): 11,6 (C-18), 15,9 (C-19), 18,7 (C-21); 22,6, 20,4, 19,8 (C-11, -15, -23), 27,5 (C-12), 29,1 (C-26/27), 29,3 (C-26/27), 36,9, 36,1 35,4 (C-10, -16, -20), 38,8, 38,6 (C-22, -24), 41,5 (C-4), 42,6 (C-2), 44,0 (C-13?), 44,1 (C-9), 54,2 (C-14), 55,5 (C-17), 63,3 (C-1), 68,7 (C-25), 70,9 (C-3), 114,7 (C-7), 119,5 (C-6), 138,7 (C-8), 140,5 (C-5). – MS (*m/e*; 70 eV): 416,32980 (C₂₇H₄₄O₃, M⁺), 398,31900 (C₂₇H₄₂O₂, M–H₂O), 380,30551 (C₂₇H₄₀O, M–2H₂O), 365,28601 (C₂₆H₃₇O, M–2H₂O–CH₃), 357,27951 (C₂₄H₃₇O₂, M–C(CH₃)₂OH).

1 α ,25-Dihydroxy-tachysterol₃ (**3a**)

1 α ,25-Dihydroxy-lumisterol₃ (**4a**)

100 mg **1a** wurden in 450 ml Methyl-*tert*. Butylether gelöst und – wie für **2a** beschrieben – 55 min bis zu einem Umsatz von mindestens 80% an **1a** (HPLC-Kontrolle) bestrahlt. Das nach Entfernung des Lösungsmittels bei < 10 °C erhaltene nahezu farblose Öl wurde flash-chromatographisch an silberimprägniertem Lichroprep Si 60, 40–63 μ m mit dem Eluenten Ethylacetat/Aceton (7:3) getrennt. Fraktionen: Vorlauf (Nebenprodukte und **2a**), 1. Fraktion (**2a** und **3a**), Mittelfraktion (wenig **3a** und Nebenprodukte), 2. Fraktion (**4a** und **1a**; kein **3a**!). Aus Fraktion 1 wurde **3a** mit MPLC (Lichroprep Si 60, 15–25 μ m, Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1)) isoliert (Vorlauf: Nebenprodukte und **2a**), Hauptfraktion (reines **3a**), Nachlauf

(wenig **3a** und Nebenprodukte). Nach Einengen der Hauptfraktion am Vakuumrotationsverdampfer bei 5–10 °C unter sorgfältigem Sauerstoffausschluß wurden 6 mg **3a** als weiße mikrokristalline Nadeln erhalten.

3a: DC, Normalphase, Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1): $R_f = 0,12$; DC, silberimprägniert, Ethylacetat/Aceton (7:3): $R_f = 0,30$. – UV (Methanol, Spektrum in [12b]): $\lambda_{\max} = 282$ nm, $\lambda_{\min} = 251$ nm. – $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3/TMS , Spektrum in [12d]): 0,70 (s, 3H, H-18), 0,98 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz, H-21), 1,22 (s, 6H, H-26/27), 1,92 (s, 3H, H-19), 4,24/4,13 (m, 2H, H-1 β /3 α), 5,74 (m, 1H, H-9), 6,66/6,16 (AB, $J = 16,1$ Hz, H-6/7). – MS (*m/e*, 70 eV, Spektrum in [12b]): 416,3318 ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$, M^+), 398,3169 ($\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_2$, M– H_2O), 380,3050 ($\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}$, M– $2\text{H}_2\text{O}$), 401 (M– CH_3), 383 (M– H_2O – CH_3), 365 (M– $2\text{H}_2\text{O}$ – CH_3), 362 (M– $3\text{H}_2\text{O}$), 347 (M– $3\text{H}_2\text{O}$ – CH_3), 357 (M– $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$), 287 (M-Seitenkette), 269 (287– H_2O), 251 (287– $2\text{H}_2\text{O}$).

4a wurde aus der 2. Fraktion mittels präparativer HPLC abgetrennt: Lichroprep Diol, 7 μm 250 \times 10 mm, *iso*-Propanol/*n*-Hexan (1:9); $\lambda_{\text{Det}} = 275$ nm; RT(**4a**) = 7,15 min, RT(**1a**) = 8,35 min; Peakreinheitsindex (**4a**) = 1,0. Erhalten wurden 2 mg weiße mikrokristalline Nadeln.

4a: DC, Normalphase, Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1): $R_f = 0,21$; DC, silberimprägniert, Ethylacetat/Aceton (7:3): $R_f = 0,19$. – UV (Methanol, Spektrum in [12c, d]): schwach strukturierte Absorptionsbande, $\lambda_{\max} = 274$ nm (identisch mit λ_{\max} für **4b** [20]). (Der in [16] angegebene λ_{\max} -Wert für **4a** von 282 nm rührt vermutlich von geringen Anteilen an **3a** her.). – $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3/TMS , Spektrum in [12 d]): 0,61 (s, 3H, H-18), 0,78 (s, 3H, H-19), 0,91 (d, $J = 5,8$, 3H, H-21), 1,22 (s, 6H, H-26/27), 4,11 (dd, 1H, $J = 10/4,5$ Hz, H-1), 4,14 (m, 1H, H-3), 5,46 (m, 1H, H-6/7), 5,76 (dd, $J = 5,4/1,8$ Hz, H-7/6); (gute Übereinstimmung mit den $^1\text{H-NMR}$ -Daten (CDCl_3) in [16]). – MS (*m/e*, 70 eV, Spektrum in [12c]): 416,3302 ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$, M^+), 401 (M– CH_3), 398 (M– H_2O), 383 (M– H_2O – CH_3), 380 (M– $2\text{H}_2\text{O}$), 365 (M– $2\text{H}_2\text{O}$ – CH_3), 362 (M– $3\text{H}_2\text{O}$), 357 (M– $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$), 347 (M– $3\text{H}_2\text{O}$ – CH_3), 342 (357– CH_3), 324 (342– H_2O), 309 (324– CH_3), 287 (M-Seitenkette), 269 (287– H_2O), 251 (269– H_2O).

1 α ,25-Dihydroxy-präcalcitriol (**2a**)

318 mg **1a** (91,8% Gehalt) wurden in 900 ml MeO-*t*-Bu gelöst und in zwei Portionen je 45 min bei –45 °C bestrahlt. Das Bestahlungsgemisch wurde im Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt, und die Hauptmenge an nicht umgesetztem **1a** wurde bei –18 °C kristallisiert.

Die aus zwei Bestrahlungen erhaltenen Mutterlaugen wurden vereinigt und flash-chromatographisch an silberimprägniertem Kieselgel mit Ethylacetat/Aceton (7:3) in die drei Fraktionen **2a**, **3a** und **1a**+**4a** getrennt. Zur Detektion wurden silberimprägnierte DC-Platten verwendet. Die R_f -Werte (Fließmittel wie Eluent) betragen: 0,16 (**1a**), 0,39 (**2a**), 0,30 (**3a**) und 0,19 (**4a**). Die quantitative Entfernung eluierter Ag^+ -Spuren erfolgte mit methanolischer NaCl-Lösung. Das aus der letzten Fraktion erhaltene Produktgemisch **1a**+**4a** wurde zusammen mit dem durch Kristallisation zurückgewonnenen **1a** (Gesamtmenge ca. 125 mg) erneut bestrahlt, und das Bestahlungsgemisch wurde, wie beschrieben, aufgearbeitet. Das zurück gewonnene **1a** (24 mg; 8%, bezogen auf die eingesetzte Menge **1a**) kann einem nachfolgenden Bestrahlungsprozess

zugeführt werden. Das vereinigte **3a** (28 mg) wurde in MeO-*t*-Bu bei Gegenwart von 16 mg Fluorenon, p. a. unter Verwendung einer 1 M KNO_2 -Filterlösung bei –5 °C bis zu einem Produktverhältnis **2a**/**3a** = 8/2 (DC-Detektion: HPTLC-Fertigplatte, Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1)) bestrahlt.

2a wurde flash-chromatographisch abgetrennt (Lichroprep Si 60, 25–40 μm ; Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1)) und **3a** nochmals, wie beschrieben, bestrahlt. Auf diese Weise wurden ca. 25 mg **2a** aus 28 mg **3a** gewonnen. Insgesamt wurden 200 mg **2a** (74,5%, bezogen auf die umgesetzte Menge **1a**) als weiße mikrokristalline Nadeln erhalten.

DC, Normalphase, Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1): $R_f = 0,16$; DC, silberimprägniert, Ethylacetat/Aceton (7:3): $R_f = 0,39$; UV (Ethanol): $\lambda_{\max} = 259$ nm; $\lambda_{\min} = 232$ nm. – MS (Spektren in [12d]): 416,3267 ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$, M^+), 401 (M– CH_3), 398 (M– H_2O), 383 (M– CH_3 – H_2O), 380 (M– $2\text{H}_2\text{O}$), 365 (M– $2\text{H}_2\text{O}$ – CH_3), 362 (M– $3\text{H}_2\text{O}$) 357 (M– $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$), 287 (M-Seitenkette), 269 (287– H_2O), 251 (287– $2\text{H}_2\text{O}$). – $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3/TMS ; Spektren in [12b]): 0,805 (s, 3H, H-18), 0,966 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz, H-21), 1,228 (s, 6H, H-26/27), 1,783 (s, 3H, H-19), 4,06 (m, 1H, H-3 α), 4,21 (dd, 1H, 1 β -H), 5,56 (m, 1H, 9-H), 5,81 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, 7/6-H), 5,91 (d, 1H, $J = 12,2$ Hz, 6/7-H).

1 α ,25-Dihydroxy-cholecalciferol (**5a**)

200 mg **2a** wurden in 40 ml Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1) gelöst und 5 h bei 65 °C erwärmt. Das Isomergemisch **5a**/**2a** wurde flash-chromatographisch (Lichroprep Si 60, 25–40 μm ; Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1)) getrennt, und **2a** wurde erneut thermisch isomerisiert. Nach zweimaligem Recycling wurden 182 mg **5a** erhalten (67,9% bezogen auf das umgesetzte **1a**). Aus Methylformiat kristallisiert **5a** in Form weißer Nadeln. *F*. (Boëtius, 4 °C/min) = 120–123 °C; $\epsilon_{\max} = (17\,970 \pm 180)$ l/mol cm ($f = 10$ FG; $\alpha = 0,95$). DC, Normalphase Ethylacetat/*n*-Hexan (3:1): $R_f = 0,20$; DC, silberimprägniert, Ethylacetat/Aceton (7:3): $R_f = 0,31$. – MS: 416,3267 (416,3294 ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$). Reinheit (Bestimmungsmethode): H_2O (DTA) = (0,7 \pm 0,2) m-%; Methylformiat ($^1\text{H-NMR}$) < 0,1 m-%; Anteil **2a** (HPLC, 265 nm) < 0,5 m-%; Summe Nebenprodukte (HPLC, 265 nm) = 0,03 Fl.-%, (HPLC, 220 nm) = 0,13 Fl.-%; Nebenprodukte einzeln (HPLC, 220 nm) < 0,06 Fl.-%. Der summarische Anteil an Nebenprodukten liegt damit weit unterhalb des in [21a] geforderten Grenzwertes von 1%.

Experimentelle Bedingungen für spektroskopische Messungen und Literaturvergleich: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 , CD_3OD sowie D_6 -DMSO) ([21b], [4c], [21c]). – IR (KBr) ([21b]). – MS (EI, 70 eV) ([4c], [21b], [21c]). Die Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.

HPLC-Produktanalyse der Bestahlungsgemische von **1a**

Jeweils 30 mg **1a** in 470 ml MTBE wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen im Photoreaktor bei –5 °C so wie bei –45 °C bestrahlt. Die zu verschiedenen Bestrahlungszeiten entnommenen Proben von je 1,5 ml wurden bei < 5 °C im Vakuum zur Trockne eingeeengt, mit 0,5 ml Eluent gelöst und mittels HPLC analysiert. Die Zuordnung der Photoisomeren **1b**, **2b**, **3b** und **4b** erfolgte durch Vergleich der DAD-Spektren ($\lambda_{\text{Det}} = 265$ nm) (siehe auch Abb. 3b) mit denen in [12a]. Für die quantitative HPLC-Analyse wurden die Responsefaktoren (RF) bestimmt: RF für **1a** wurde über

eine Kalibration mit flash-chromatographisch gereinigtem Produkt als externen Standard bestimmt. Für **2a** wurde der RF für **1a** übernommen, da bei der Detektionswellenlänge 265 nm ein isobestischer Punkt in den Absorptionsspektren beider Isomeren auftritt und damit gleiche Empfindlichkeit für beide Isomeren vorliegt. Da an der Detektionswellenlänge für **3a** UV-spektroskopisch ein 2,2fach höherer Extinktionskoeffizient bestimmt wurde, gilt für **3a**: $RF(3a) = RF(1a)/2,2$. Der summarische prozentuale Flächenprozentanteil unbekannter Nebenprodukte wurde als Differenz zwischen Gesamtmasse und der Summe der mittels HPLC bestimmten Massen an **1a**, **2a** und **3a** ermittelt.

Wir danken der Jenapharm GmbH, Jena für die Bereitstellung der erforderlichen Ausgangssubstanz **6** sowie die gewährte finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur

- [1] a) A. W. Norman: Vitamin D, The Calcium Homeostatic Steroid Hormone, Academic Press, New York 1979;
b) A. W. Norman: Vitamin D, Molecular Biology and Clinical Nutrition, Academic Press, New York 1980
- [2] a) Y. Honma, M. Hozumi, E. Abe, K. Konno, M. Fukushima, S. Hata, Y. Nishii, H. F. DeLuca, T. Suda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** (1983) 20 c;
b) J. A. McLaughlin, W. Gange, D. Taylor, E. Smith, F. M. Holick, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** (1985) 5409;
c) E. Abe, Y. Moriya, M. Saito, Y. Sugawara, T. Suda, Y. Nishii, Cancer Res. **46** (1986) 6316;
d) J. E. Bishop, E. D. Collins, W. H. Okamura, A. W. Norman, J. Bone Miner. Res. **9** (1994) 1277;
e) R. Boillon, W. H. Okamura, A. W. Norman, Endocrine Rev. **16** (1995) 200
- [3] a) Synform (Ed. Quinkert, G.) **2** (1985);
b) Synform (Ed. Quinkert, G.) **3** (1986);
c) G.-D. Zhu, W. H. Okamura, Chem. Rev. **95** (1995) 1877
- [4] a) D. H. R. Barton, R. M. Hesse, M. M. Pechet, E. Rizzardo, J. Chem. Soc., Chem. Comm. **1974**, 203;
b) K. Ochi, I. Matsunaga, H. Nagano, M. Fukushima, M. Shindo, C. Kaneko, M. Ishikawa, H. F. DeLuca, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I **1979** 165;
c) T. Sato, H. Yamauchi, Y. Ogata, M. Tsujii, T. Kunii, K. Kagei, S. Toyoshima, Chem. Pharm. Bull. Jpn. **26** (1978) 2933
- [5] E. Havinga, Experientia **29** (1973) 1181
- [6] a) T. Kobayashi, M. Hirooka, M. Yasumura, Vitamins **50** (1976) 185;
b) W. G. Dauben, R. B. Phillips, J. Am. Chem. Soc. **104** (1982) 355; 5780;
c) V. Malatesta, C. Willis, P. Hackett, J. Am. Chem. Soc. **103** (1981) 6781;
d) M. Braun, W. Fuß, K.-L. Kompa, DE 33 08 592; Chem. Abstr. **102** (1985) 113791 b
- [7] a) S. Gliesing, M. Reichenbächer, H.-D. Ilge, D. Faßler, Z. Chem. **29** (1989) 21;
b) S. Gliesing, H.-D. Ilge, M. Reichenbächer, D. Faßler, Z. Chem. **24** (1984) 150
- [8] a) M. Reichenbächer, G. Hopf, S. Gliesing, B. Schönecker, U. Kempka, DD PS 294 015; Chem. Abstr. **116** (1992) 21 313 h;
b) M. Reichenbächer, S. Gliesing, G. Hopf, DD PS 270 068; Chem. Abstr. **112** (1990) 139 655 s
- [9] W. G. Dauben, R. B. Phillips, P. Jefferies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** (1982) 5115
- [10] M. P. Kautsky (Ed.), Steroid Analysis by HPLC, Chap. 6 in: Chromatographic Sciences **16** (1986) 173
- [11] S. C. Eyley, D. H. Williams, J. Chem. Soc., Chem. Comm. **1975**, 858
- [12] a) S. Gliesing, M. Reichenbächer, M. Gonschior, F. Ude, B. Schönecker: Proceedings of the Ninth Workshop Vitamin D, S. 47, W. de Gruyter, Berlin 1994;
b) M. Gonschior, Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena 1993;
c) F. Ude, Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena 1993;
d) C. Lange, Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena 1994
- [13] B. Schönecker, P. Droscher, G. Adam, V. Marquardt, D. Walther, R. Fischer, R. Prousa, DE 41 055 03; Chem. Abstr. **118** (1993) 124 879 t; siehe auch: H. Kosan, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena 1993
- [14] C. W. Still, M. Kahn, A. Mitra, J. Org. Chem. **43** (1978) 2923
- [15] M. Reichenbächer, S. Gliesing, G. Hopf, J. Prakt. Chem. **333** (1991) 779
- [16] M. C. Dormanen, J. E. Bishop, M. W. Hammond, W. H. Okamura, I. Nemere, A. W. Norman, Biochem. Biophys. Res. Commun. **201** (1994) 394
- [17] M. Denny, S. H. Liu, Nouveau J. Chim. **2** (1978) 637
- [18] a) B. Schönecker, R. Prousa, M. Reichenbächer, S. Gliesing, H. Kosan, P. Droscher, U. Hausschild, R. Thieroff-Ekerdt, Bioorg. & Med. Chem. Lett. **3** (1993) 1848;
b) B. Schönecker, M. Reichenbächer, S. Gliesing, R. Prousa, S. Wittmann, S. Breiter, R. Thieroff-Ekerdt, H. Wiesinger, M. Haberey, H. Mayer, D. Scheddin, Proceedings of the Ninth Workshop Vitamin D, S. 99 W. de Gruyter, Berlin 1994
- [19] Y. Tachibana, S. Yokoyama, M. Tsuji, Bull. Chem. Soc. Jpn. **62** (1989) 2599
- [20] S. Gliesing, M. Reichenbächer, H.-D. Ilge, D. Faßler, J. Prakt. Chem. **329** (1987) 311
- [21] a) Pharmeuropa **4** (1992) 104;
b) E. Debesis, Analytical Profiles of Drug Substances **8** Calcitriol, 88; Academic Press, Inc. 1979;
c) E. G. Baggolini, J. A. Iacobelli, B. M. Hennessey, J. F. Serenmo, M. R. Uskokovic, J. Org. Chem. **51** (1986) 3098

Korrespondenzanschrift:
Dr. M. Reichenbächer
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Lessingstraße 8
D-07743 Jena, Germany