

# Zur chromatographischen Trennung von Sterinderivaten

Von

H. BRETSCHNEIDER

Aus dem Forschungslaboratorium der Firma CHINOIN, Ujpest (Ungarn)

(Eingegangen am 20. 6. 1941. Vorgelegt in der Sitzung am 6. 11. 1941)

## A. Zur Isolierung von Androstendion und Progesteron aus Sterinoxidationsprodukten.

Vor mehreren Jahren gelang es bekanntlich Ruzicka<sup>1</sup>, den oxydativen Abbau von geeigneten Sterinen so zu leiten, daß aus den neutralen Oxydationsprodukten vom Androstan (bzw. Isomeren desselben) sich ableitende Ketone gewonnen werden können. Dieser für die Entwicklung der Hormonchemie fundamentalen Entdeckung folgte in einiger Zeit der von demselben Forscher und anderen<sup>2</sup> gemachte Befund, daß sich auch vom Pregnantyp ableitende Ketone, meist jedoch in noch geringerer Menge als die niedrigeren Homologen unter den Oxydationsprodukten auffinden lassen. Dieser zunächst beim Abbau des Cholesterinacetat-dibromides gemachte Befund (Abbau zu Dehydroandrosteron und Pregnenolon) wurde auch bei der Oxydation von Cholesterin-dibromid<sup>3</sup> und Cholestenon<sup>4</sup> gemacht, wobei Androstendion und Progesteron gebildet werden. Obleich nun die chromatographische Analyse in den letzten Jahren vielfach in der Sterinchemie angewendet wurde<sup>5</sup>, scheinen Erfahrungen mit ihr bei der Aufarbeitung von Konzentraten von Androstan und Pregnanderivaten noch nicht gemacht worden und daher mitteilenswert zu sein.

Die nach der geeigneten Oxydation von Cholesterindibromid<sup>3</sup> bzw. Cholestenon<sup>4</sup> notwendige Anreicherung der im ersten Fall vorher entbromten neutralen Anteile kann nach verschiedenen

<sup>1</sup> Ruzicka, *Helv.* **17** (1934) 1389, 1395.

<sup>2</sup> Ruzicka u. Mitarb., *Helv.* **20** (1937) 1293; Fujii u. Matsukava, *J. Pharmaz. Soc. Japan* **56** (1936) 93. *Chem. Zbl.* **II** (1936) 1354.

<sup>3</sup> Spielmann, *Am. Soc.* **61** (1936) 893.

<sup>4</sup> Dirscherl u. Hanusch, *Z. physiol. Ch.* **49** (1938) 252.

<sup>5</sup> Vgl. besonders Brockmann, 'Provitamin D<sub>3</sub>', Isolierung z. B. *Z. physiol. Ch.*, **244**, 218; **254**, 168, ferner Reichstein z. B., *Helv.* **22** (1939) 1220.

Methoden erfolgen, bei welchen die beiden hormonalen Wirkstoffe infolge ihrer Ähnlichkeit denselben Weg nehmen. Am raschesten führt nach der Abtrennung des immer vorhandenen Cholestenons wohl die Methode von DIRSCHERL<sup>4</sup> weiter, welche die beiden Ketone auf Grund ihrer Löslichkeit in Salzsäure von ähnlichen Verbindungen trennt und anreichert. Zu dem nachstehend beschriebenen Versuch kam jedoch ein aus Cholesterindibromid stammendes Oxydationsprodukt zur Verwendung, welches durch 2 Chromatogramme der Methanol-leichtlöslichen Anteile und ein Verteilungsverfahren angereichert war:

3390 mg Harz wurden in 10 cm<sup>3</sup> Benzol und 30 cm<sup>3</sup> Petroläther Sdp. 50—60°, beide über Na getrocknet gelöst. Das mit einem Hahn versehene Chromatogrammrohr, 28 × 310 mm wurde wie folgt trocken gefüllt: 10 mm hoher Wattepfropf, 20 mm geglähter Sand, 110 mm Aluminiumoxyd (BROCKMANN) = 60 g und neuerlich 25 mm hoch Sand, darauf zwei Filterscheiben. Die Rohrfüllung wurde mit einer Mischung von Benzol-Petroläther 1:3 benetzt und nach dem Einsickern derselben die Lösung der Substanz eingetragen. Sobald eine Schlierung im Filtrat den Übertritt der Substanz in dieses anzeigt, werden jeweils 15 cm<sup>3</sup> Filtrat aufgefangen, getrennt die Trockenrückstände hergestellt und so 9 Fraktionen erhalten. Nun werden durch das Rohr 2 × 200 cm<sup>3</sup> Äther durchgeschickt (Filtrat 10 und 11), wodurch der Ansatz bis auf 10% in das Filtrat gebracht wurde.

*Fraktion 1* (384 mg) enthielt einen gelben Farbstoff und zeigte geringe Kristallisationstendenz.

*Fraktion 2* (467 mg) und *Fraktion 3* (229 mg) wurden vereinigt und aus Äther-Petroläther umgelöst. Die durch Animpfen mit Progesteron erhaltene Kristallisation wurde über Nacht in den Eisschrank gestellt, darauf das Lösungsmittel abdekantiert und das Kristallisat mit sehr stark gekühltem Äther rasch abgewaschen. Es wurden so 145 mg roh-Progesteron vom Schmp. 115—120° erhalten. Durch Aufarbeitung der Mutterlaugen erhöhte sich die Menge auf 190 mg, welche aus Äther kristallisiert 130 mg reines Progesteron vom Schmp. 126—127° (und gleich liegender Mischprobe mit einem Präparat anderer Herkunft) und einer Drehung von  $[\alpha]_D^{20} = +195^\circ$  (Chloroform) ergaben.

*Fraktion 4* (131 mg) stellte eine schwer zu reinigende Zwischenfraktion vor.

Die *Fraktionen 5—11* (insgesamt 1754 mg) wurden auf Grund der Kristallisationsproben vereinigt. Nach zweimaliger Kristalli-

sation aus Äther wurden 405 mg Androstendion 3,17 vom Schmp. 168—169° (Mischprobe) und der Drehung  $[\alpha]_D^{20} = +191^\circ$  in Chloroform erhalten.

Auch bei anderer Durchführung der Anreicherung, z. B. nach DIRSCHERL, gelingt es, die beiden Wirkstoffe, trotzdem andere Nebenprodukte ihnen beigemischt sind, in ähnlicher Weise chromatographisch zu trennen.

### B. Die Trennung von Cholestanon und Cholestenon durch Chromatographie an Silikagel.

Die Trennung dieser beiden nahe verwandten Ketone, in welche das Cholestenon-pinakon bei seiner thermischen Zersetzung zerfällt, wurde gelegentlich der Bearbeitung dieser Reaktion<sup>6</sup> auf zwei Wegen erreicht: durch wiederholtes Umlösen der schwerer-löslichen Anteile aus Alkohol-Wasser wurde Cholestanon und durch fraktionierte Kristallisation der Mutterlaugen aus Aceton-Wasser schließlich Cholestenon rein erhalten. Die Ausbeuten an reiner Spitzenfraktion waren aber hier ebenso wenig gut wie bei der durch allmählich stärkeres Ansäuern bewirkten fraktionierten Zerlegung der *P*-Reagensverbindung (nach GIRARD<sup>7</sup>) der beiden Ketone. Eine sehr gute Trennung der beiden Verbindungen ist hingegen an Silikagel möglich:

Aus 10 g Silikagel (Pulversorte B, I. G. Farbenindustrie) wurden in einem Hahn-Chromatogrammrohr (Durchmesser 28 mm) mit Hilfe von gut getrocknetem Petroläther eine feuchte Säule bereitet und auf diese die Lösung eines Gemisches von je 400 mg Cholestenon-Cholestanon in 10 cm<sup>3</sup> des gleichen Lösungsmittels eingetragen. Zur rascheren Entwicklung des Chromatogramms wurde bald ein Petroläther-Benzol, Gemisch 1:1, aufgegossen. 4 fraktionierte aufgefangene Filtrate à 10 cm<sup>3</sup> hinterließen kristalline Trockenrückstände die bei Wasserbadtemp. nicht schmolzen. Sie wurden vereinigt (400 mg) und aus Alkohol-Methanol umgelöst: 320 mg. Nach Schmp. (127—128°) und Drehung liegt reines Cholestanon vor.

308.4 mg Sbst., 10 cm<sup>3</sup> Chloroform, 1 dm Rohr,  $\alpha_D = +1.36^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20} = +44.1^\circ$ .

Während der Trockenrückstand (80 mg) einer weiteren 5. Fraktion von 10 cm<sup>3</sup> seinem Schmp. nach ein Gemisch war

<sup>6</sup> GALINOVSKY-BRETSCHNEIDER, S.-B. Akad. Wiss. Wien (IIb), 147 (1938) 266, bzw. Mh. Ch. 72 (1938) 190. Vgl. auch KREKELER Dissertation, Göttingen 1937.

<sup>7</sup> GIRARD, Helv. 19 (1936) 1095.

(Kristallisationsprobe aus Methanol Schmp. 102—109°), folgte nunmehr reines Cholestenon. Man eluierte mit Äther und löste den Trockenrückstand (350 mg) aus Methanol um: 210 mg. Nach Schmp. (78—80°) und Drehung reines Cholestenon.

189.5 mg Subst. 10 cm<sup>3</sup> Chloroform, 1 dm Rohr,  $\alpha = +1.62^\circ$ ;  $[\alpha]_D^{20} = +85.6^\circ$ .

Auch an Aluminiumoxyd (BROCKMANN) zeigen die beiden Ketone das gleiche Adsorptionsverhalten.

Der Direktion der Firma CHINOIN sei auch an dieser Stelle für die Genehmigung zur Veröffentlichung dieser Arbeit gedankt.