

Pseudo-dehydrocholsäure¹, ein „Bis-steroid“

Von

H. Egger², A. Nikiforov, F. Wessely†
und H. Nesvadba

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien
und dem Forschungslaboratorium der Sanabo G. m. b. H., Wien

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 5. April 1968)

Unter bestimmten Bedingungen entsteht aus Dehydrocholsäure (**1**) mit Alkali das Natriumsalz der sogenannten „Pseudo-dehydrocholsäure“ (**3**). Diese Reaktion konnte als Aldoladdition (unter Addition an die 3-Ketogruppe) zu einem „Bis-steroid“ aufgeklärt werden. Dafür sprechen Molekulargewichtsbestimmungen in Lösung und die Massenspektren einer Anzahl von Derivaten von **3**. Die Schlüsse, welche aus den weiteren spektroskopischen Daten (UV, IR, NMR, ORD) gezogen werden können, werden gemeinsam mit den chemischen Befunden eingehend diskutiert. Die Strukturen der Dehydratisierungs- und einiger Reduktionsprodukte von **3** werden ebenfalls abgeleitet.

Bei der Reduktion von Keto-gallensäurederivaten mit $\text{LiAlH}[\text{OC}(\text{CH}_3)_3]_3$ bleibt die 12-Ketogruppe erhalten.

From dehydrocholic acid (**1**) under certain conditions the sodium salt of the so-called “pseudo-dehydrocholic acid” (**3**) is formed. This conversion was characterized as an aldol addition (involving addition to the keto function in position 3) yielding a “bis-steroid”. This interpretation is supported by determination of the molecular weight in solution and mass spectra of several derivatives of **3**. Further spectroscopic (UV, IR, NMR, ORD) and chemical evidence is discussed in detail. The structures of products, formed by dehydration (reduction) of **3** are also derived.

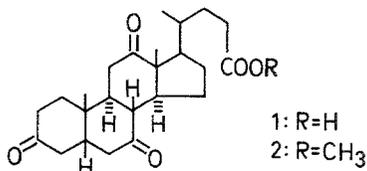
¹ A. Lindner, W. Schneider, G. Friedrich, E. Kerschbaum und F. Wessely, Mh. Chem. **83**, 1094 (1952).

² Auszugsweise vorgetragen bei der Vortragsstagung des Vereines Österreichischer Chemiker, Wien, 6. Okt. 1967.

Reduction of several derivatives of bile acids containing 3-, 7-, and 12-keto groups by $\text{LiAlH}[\text{OC}(\text{CH}_3)_2]_3$ does not affect the 12-keto group.

Einleitung

Dehydrocholsäure (1) wird seit langem in Form ihres Natriumsalzes als Standardcholereticum verwendet. 1951 wurde bei pharmakologischen Versuchen festgestellt, daß einzelne als reine Na-Salze der Dehydrocholsäure (1) bezeichnete Präparate choleretisch völlig unwirksam waren, jedoch bei etwa 15minütigem Erhitzen der wäßrigen Lösung auf 100° (Sterilisation) die volle pharmakologische Aktivität erlangten¹. Bei der darauffolgenden Untersuchung isolierte man aus dem choleretisch inaktiven Na-Salz eine als „Pseudo-dehydrocholsäure“ (3) bezeichnete Säure, die sich im Schmelzpunkt, der opt. Drehung und der Löslichkeit stark von 1 unterscheidet (vgl. Tab. 2), aber gleiche Analysenwerte und gleiches Äquivalentgewicht liefert¹. 3 gibt mit Diazomethan einen mit Dehydrocholsäure-methylester (2) nicht identischen Methylester 4. Das Na-Salz von 3 fällt bei 0° aus einer Lösung von 1 in wäßrig-alkohol. NaOH bei Einhaltung eines bestimmten Mengenverhältnisses (Äthanol/Wasser 4,5 : 1) in hoher Ausbeute aus. Ansäuern mit kalter verd. Säure liefert 3.



Es wurde die Vermutung geäußert¹, daß es sich um ein Stereoisomeres der Dehydrocholsäure handelt, bei dem im Gegensatz zu natürlichen Gallensäuren eine *cis*-Verknüpfung der Ringe B und C vorliegt (8α , 9α -H), die über ein Δ^7 , 8 -Enol entstehen soll.

In der Folge erhielt man durch Kochen von 3 mit Eisessig noch eine sogenannte „Pseudo-dehydrocholsäure II“ („P-II“), die sich wiederum völlig von den zuerst genannten Säuren unterscheidet. Meindl führte im Rahmen einer Dissertation³ vor allem Clemmensen-Reduktionsversuche an 3 durch, ohne aber die Strukturen der Produkte eindeutig aufklären zu können. Die Beziehung der P-II zu 1 und 3 blieb unklar; die „Stereoisomeriehypothese“ wurde auch nach diesen Befunden weiter aufrechterhalten.

Im folgenden soll über die Ergebnisse unserer Versuche zu einer Klärung des Problems berichtet werden.

³ P. Meindl, Dissertation, Universität Wien, 1955.

Charakterisierung von Pseudo-dehydrocholsäure als „Bis-steroid“

Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung verhielt sich Pseudo-dehydrocholsäure (**3**) ebenso wie ihr Methylester als einheitliche Substanz. Die R_f -Werte von **3** bzw. **4** sind erheblich kleiner als jene der entsprechenden Verbindungen **1** bzw. **2**. Hingegen erwies sich P-II bei der Dünnschichtchromatographie (DC) ihres Methylesters als Gemisch zweier schwierig trennbarer Substanzen (Methylester **5** und **6**). Wegen der schlechten Löslichkeit macht die DC der freien Säuren Schwierigkeiten (Schwanzbildung), weshalb wir meist den Methyl- (oder Äthyl-)ester verwendeten.

Das Massenspektrum (MS) von **3** ist innerhalb der Reproduzierbarkeit identisch mit dem von **1**; das gleiche gilt für die Methylester **4** und **2**⁴. Bei der Aufnahme der MS durch direkte Verdampfung in der Ionenquelle fiel jedoch auf, daß **3** und **4** merklich höhere Temperaturen als **1** und **2** zur Erreichung vergleichbarer Ionenströme erforderten. Von P-II konnte zunächst überhaupt kein brauchbares MS erhalten werden. Kaum unterscheidbare MS sind bei Stereoisomeren der vermuteten Art möglich⁴.

Um so überraschender waren die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen in $CHCl_3$ mit dem „Dampfdruckosmometer“ an **4** (und **2** als Vergleichssubstanz) und an einer Reihe von Derivaten der Pseudo-dehydrocholsäure: In allen Fällen erhielten wir Werte, die gut mit dem *Doppelten* des erwarteten Molekulargewichts übereinstimmten. Dieser Befund legt die Annahme von „Bis-steroiden“ nahe. Eine recht eindringliche Bestätigung für diese Interpretation liefert das NMR-Spektrum von **4** (Abb. 1).

Man findet bei **4** in dem für die 18-H- und 19-H-Methylresonanzen von Stereoiden erwarteten Gebiet je *zwei* ziemlich knapp nebeneinanderliegende Signale (etwa im Intensitätsverhältnis 1 : 1). Da eine Aufspaltung durch Kopplung nicht in Frage kommt⁵ und das Vorliegen eines Gemisches aus mehreren Gründen unwahrscheinlich ist, wird dadurch die Vorstellung zweier ungleicher Hälften eines „Bis-steroids“ anschaulich bestätigt.

Daß man aus **3** und **4** die MS der Monomeren **1** und **2** erhält, wurde als thermische Spaltung in der Ionenquelle erkannt. Bereits bei Temperaturen über 150° läßt sich **2** im DC nachweisen und beim Schmp. ist **4** quantitativ in **2** übergegangen. Unter Verwendung besserer Probeneinführungssysteme gelang es jedoch, von einer Anzahl von Derivaten der Pseudo-dehydrocholsäure MS mit den Molekulargewichtspeaks der „Dimeren“

⁴ H. Egger, Mh. Chem. **99**, 1163 (1968).

⁵ N. S. Bhacca und D. H. Williams, Applicat. of NMR Spectroscopy in Org. Chem., Illustrations from the Steroid Field, Holden-Day, 1964.

zu erhalten (s. u.) und damit den dimeren Aufbau zweifelsfrei sicherzustellen.

Struktur der Pseudo-dehydrocholsäure

Die UV-Spektren von **3** und **4** (sowie dem Na-Salz von **3**) unterscheiden sich weder in der Lage des Maximums (um 290 nm) noch in der Extinktion

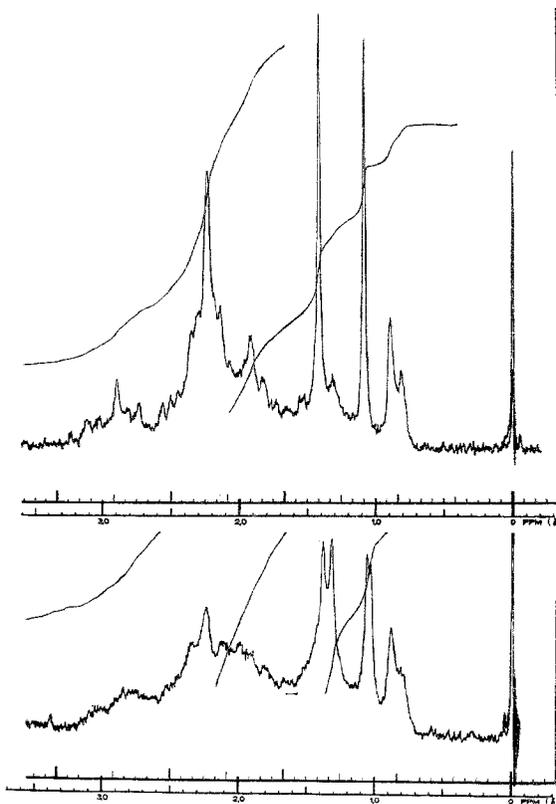


Abb. 1. NMR-Spektren von **2** und **4**

charakteristisch von den entsprechenden monomeren Derivaten **1** und **2**. Die Art der Chromophore kann also nicht wesentlich verändert sein. Empfindlicher spricht die opt. Rotationsdispersion (*ORD*) auf Veränderungen an C=O-Chromophoren opt. aktiver Verbindungen an. Abb. 2 zeigt die *ORD*-Kurven von **2**, **4** und **5**.

Ketogruppen in verschiedenen Positionen des Steroidgerüsts zeigen charakteristische Formen der *ORD*-Kurve, die überdies sehr empfindlich

gegen sterische Änderungen ist⁶. Das Vorzeichen des *Cottoneffektes* läßt sich aus der Oktantenregel ableiten⁶. Beim Vorliegen mehrerer Keto-funktionen ist allerdings wegen möglicher Beeinflussungen der Chromo-

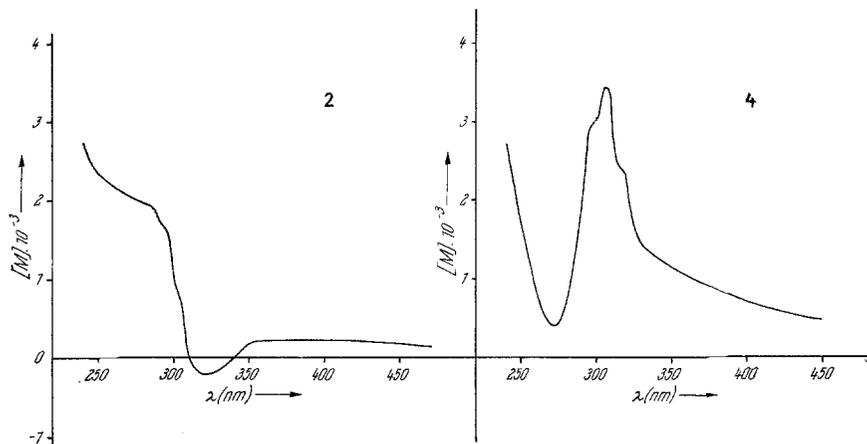


Abb. 2a

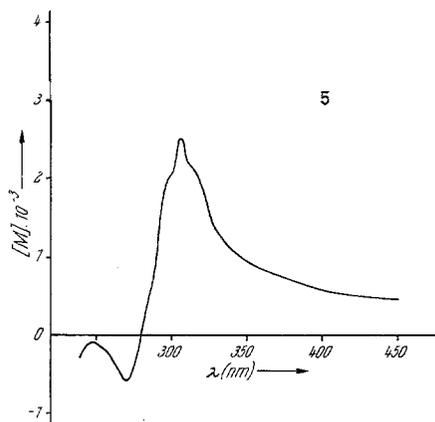


Abb. 2b

Abb. 2. ORD-Kurven von 2, 4 und 5

phore Vorsicht geboten⁷. Der Vergleich der *ORD* von 4* mit denen aller anderen bekannten Kombinationen von Ketogruppen in Gallensäure-

* Die Kurven für die entsprechende freie Säure, das Na-Salz und den Ester sind nur unwesentlich voneinander verschieden.

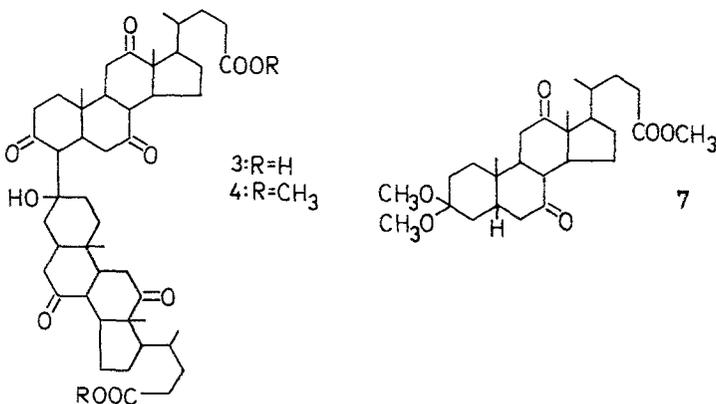
⁶ C. Djerassi, *Optical Rotatory Dispersion: Appl. to Org. Chem.*, McGraw-Hill, 1960; P. Crabbe, *Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Org. Chem.*, Holden-Day, 1965.

derivaten⁷ liefert einen sehr deutlichen Hinweis auf eine Veränderung an der 3-Ketogruppe, da ihr stark negativer *Cottoneffekt* den Habitus der Kurve von **2** prägt, während in **4** die Beiträge positiver *Cottoneffekte* dominieren.

Daraufhin unternahmen wir einerseits Reduktionsversuche zur Verringerung der Zahl der C=O-Gruppen, um übersichtlichere Verhältnisse zu erreichen, und andererseits stellten wir Carbonylderivate her, um festzustellen, wieviele Ketogruppen vorliegen. Bei den verschiedenen Reduktionen erhielt man ausnahmslos komplizierte Gemische (s. S. 1607). Das gut kristallisierende, dünnschichtchromatographisch einheitliche Oxim von **4** wies im IR keine C=O-Bande (außer —COOCH₃) mehr auf und hatte im Gebiet der n—π*-Bande der C=O-Gruppe (um 290 nm) eine Extinktion $\epsilon < 5$, was für eine vollständige Oximierung spricht. Die N-Analyse entspricht unter Zugrundelegung des Molekulargewichtes 833 für **4** (als „Dimeres“ zu **2** mit $MG = 416,5$) einem Pentoxim. Das Trioxim von **2** ist seit langem bekannt und unter den gleichen Reaktionsbedingungen glatt erhältlich⁸.

Durch die genannten Befunde und das Auftreten einer breiten OH-Bande bei 3500 cm⁻¹ im IR-Spektrum von **4** wird der im folgenden wiedergegebene Strukturvorschlag für **3** bzw. **4** nahegelegt.

Die OH-Gruppe muß tertiär sein, da sie weder acetylierbar noch oxydierbar ist, aber leicht als H₂O abgespalten wird (s. S. 1605). Die Bildung von **3** aus **1** läßt sich so zwanglos als Aldoladdition* unter Beteiligung der durch besondere Reaktivität ausgezeichneten 3-Ketogruppe interpretieren.



* Bisher meist als „Kondensation“ bezeichnet.

⁷ C. Djerassi und W. Closson, J. Amer. chem. Soc. **78**, 3761 (1956).

⁸ W. Borsche, Ber. dtsch. chem. Ges. **52**, 1353 (1919).

Diese selektive Additionsfähigkeit der 3-Ketogruppe zeigt sich auch durch die auffallend leichte Bildung des 3,3-Dimethylketals (7) aus Dehydrocholsäure bei der Veresterung mit methanol. HCl. Die genannte Verbindung hatte bereits *Borsche* 1919 erhalten⁸. Die Konstitution von 7 ergibt sich aus *MS* und *ORD*.

Die Verknüpfungsstelle am C-4, die für 3 und 4 angenommen wurde, ist vorläufig nur dadurch wahrscheinlich, daß alle Reaktionen, die an einem zur C=O-Gruppe α -ständigen C-Atom von 5 β -H-3-Ketosteroiden angreifen (z. B. Bromierung, Sulfurierung, Oxydation, Enolisierung), im Gegensatz zur 5 α -H-Reihe die Position 4 (statt 2) bevorzugen⁹. Da auf Grund von Modellbetrachtungen wohl eine äquatorial-äquatoriale Verknüpfung der Ringe A und A' anzunehmen ist, dürfte die OH-Gruppe in axialer Position stehen.

Eine ausgezeichnete Bestätigung dieses Strukturvorschlages für 3 und 4 liefert die Berechnung der im *NMR*-Spektrum zu erwartenden Lagen der Signale der angulären Methylgruppen aus den Inkrementen nach der Methode von *Zürcher*^{10, 5}:

Tabelle 1. Chem. Verschiebung der 19-H und 18-H-Signale
ber./gef.

Verbindung	ber.		gef.	
	19-H	18-H	19-H	18-H
2	1,41	1,07	1,42	1,09
4	1,41/1,34	1,07/1,03	1,42/1,35	1,09/1,04
5	1,41/1,29	1,07/1,03	1,39/1,35	1,07/1,04
6	1,41/1,29	1,07/1,03	1,39/1,29	1,06/1,03
8	1,29	1,03	1,29	1,04
11	1,01	1,03	1,00	1,02

Alle *NMR*-Spektren wurden in CDCl₃ mit Tetramethylsilan als innerem Standard registriert.

Aus dem deutlich geringeren Unterschied zwischen 18 und 18' gegenüber 19 und 19' folgt, daß die „Unsymmetrie“ des „Bis-steroids“ — wie postuliert — durch Unterschiede im Ring A hervorgerufen sein sollte.

Pseudo-dehydrocholsäure II

Auch die Struktur der P-II kann nach diesen Vorstellungen leicht erklärt werden. Es handelt sich — wie erwähnt — um ein Gemisch zweier schlecht trennbarer Verbindungen, das aus 3 allgemein bei Säurebehandlung entsteht. Die *MS* der Methyl ester 5 und 6 der getrennten Komponenten

⁹ H. H. Inhoffen, W. Becker und G. Kölling, Ann. Chem. **568**, 181 (1950).

¹⁰ R. F. Zürcher, Helv. Chim. Acta **44**, 1380 (1961); **46**, 2054 (1963).

ten sind im wesentlichen gleich; der Peak mit der höchsten Massenzahl liegt bei 814*, was der Abspaltung von 1 Mol H_2O 4 entspricht. Mit dieser Annahme lassen sich alle anderen Befunde interpretieren. Das Schlüsselbruchstück der Masse 399 im *MS* entsteht durch Bruch an der Bindung, die die beiden Steroidskelette verbindet. Die Bestimmung des Äquivalentgewichtes der Säure (ursprüngliches Gemisch) gibt befriedigende Übereinstimmung.

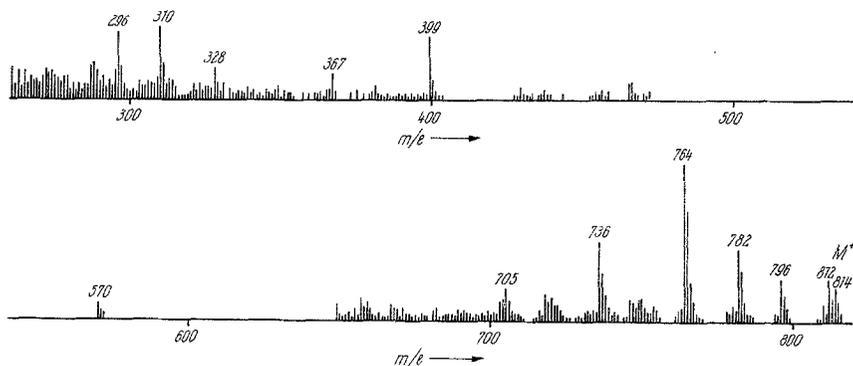


Abb. 3. *MS* von 5 und 6

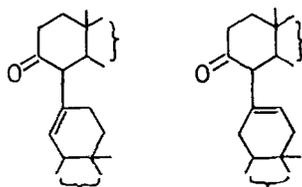
Dasselbe Produktgemisch entsteht aus 4 außer durch saure Dehydratisierung auch mit $POCl_3$ /Pyridin (bei Raumtemp.), einem für tert. OH-Gruppen bei Steroiden und Triterpenen häufig verwendeten Dehydratisierungsreagens¹¹; allerdings ist hier das Mengenverhältnis der beiden Komponenten etwas verschoben. Nun ist auch der schon von Meindl³ vermerkte Befund verständlich, daß 3 und P-II bei der Veresterung mit äthanol. HCl identische Äthylester ergeben. Während 3 oder 4 mit Alkali glatt (in Umkehrung der Aldoladdition) zu 1 bzw. 2 gespalten wird, ist dies bei den Dehydratisierungsprodukten 5 und 6 nicht mehr möglich.

Aus den UV-Spektren von 5 und 6 folgt, daß die Doppelbindung in beiden Verbindungen nicht in Konjugation zur C=O-Gruppe stehen kann, da die Extinktion gegenüber 4 nur unbedeutend erhöht ist. Der Nachweis des olefinischen Protons in den *NMR*-Spektren von 5 und 6 ist wegen des äußerst ungünstigen Protonenverhältnisses (1 : 70) nicht völlig eindeutig, man erkennt jedoch ein Signal bei $\delta = 5,2$ ppm. Die Inkrementenrechnung für die postulierte Struktur^{10, 5} stimmt ausgezeichnet mit den gefundenen Signallagen von 5 und 6 überein (Tab. 1). Es ist anzunehmen, daß sich 5 und 6 nur in der Lage der Doppelbindung unterscheiden; eine Zuordnung ist uns derzeit aber nicht möglich.

* Dies ist die im *MS* auftretende Massenzahl, die nur die Isotope mit der größten Häufigkeit (^{12}C , 1H , ^{16}O) enthält; das chem. *MG* beträgt 815,5.

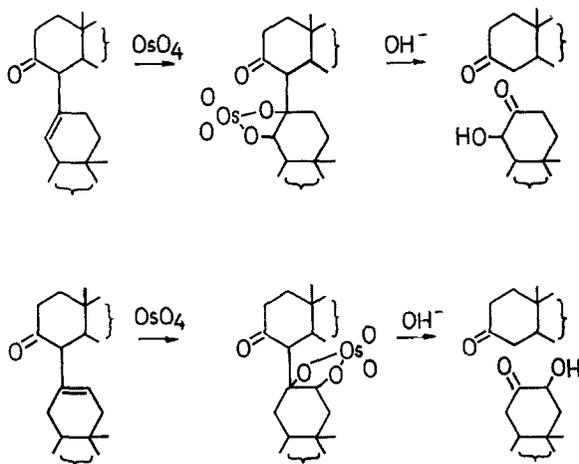
¹¹ C. Djerassi (editor), *Steroid Reactions*, Holden-Day, 1963.

5 und 6 geben keine Farbreaktion mit Tetranitromethan, hingegen lassen sie sich (im Gegensatz zu 4) an der Doppelbindung glatt mit



5 bzw. 6

Osmiumtetroxid spalten. Nach Zerlegung des Osmiumsäureesters mit Lauge ließ sich Dehydrocholsäuremethylester (2) isolieren. Es tritt bei der Alkalieinwirkung auf das freigesetzte hydroxylierte Produkt also Spaltung des Ketols ein (Umkehrung einer Aldoladdition). Die als zweites Spaltstück zu erwartenden α -Hydroxyketone waren wegen ihrer Empfindlichkeit nur im DC charakterisierbar.



Zur Bildung von Pseudo-dehydrocholsäure

Die Bedingungen, unter welchen das Na-Salz von 3 aus 1 entsteht, sind recht eng begrenzt. Während unter den angegebenen Bedingungen die Umsetzung fast quantitativ abläuft, bewirken Veränderungen in der Zusammensetzung des Äthanol/Wasser-Gemisches, daß kein Dimerisierungsprodukt zu isolieren ist. Bereits *Meindl*³ hatte festgestellt, daß in dem verwendeten Äthanol/Wasser-Gemisch (4,5 : 1) das Na-Salz von 3 75mal schwerer löslich ist, als das von 1. Dies dürfte der entscheidende

Faktor für den einseitigen Ablauf der an sich reversiblen Reaktion sein, da **3** als Na-Salz ausfällt und damit dem Gleichgewicht entzogen wird. Die hohe Konzentration (*Ostwaldscher Verdünnungssatz!*)¹² und die tiefe Temperatur (Ketolbildung ist z. B. bei Aceton mit etwa 8 kcal exotherm)¹² wirken sich im gleichen Sinne aus.

Alle Versuche, ein zu **3** analoges Produkt aus anderen Keto-gallen-säuren (3-Keto-, 3,12-¹ bzw. 7,12-Diketocholansäure) zu erhalten, waren erfolglos. *Corey* und *Young*¹³ haben über ein „Bis-steroid“ aus Cholestan-3-on berichtet. Sie erhielten es durch eine sauer katalysierte Aldoladdition mit anschließender Dehydratisierung. Die Konstitution dieses „Bis-steroids“ ist der von uns für P-II formulierten Struktur analog. Eine direkte Überführung von **1** in P-II mit Säure gelang nicht.

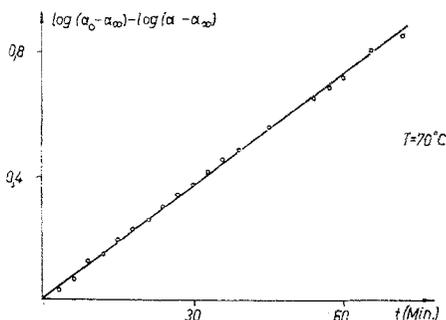


Abb. 4. Kinetik-Diagramm

Da mit Hilfe der opt. Drehung eine sehr bequeme und genaue Verfolgung des Reaktionsverlaufes möglich ist, haben wir die Kinetik der Retro-aldolspaltung einer Lösung des Na-Salzes von **3** in reinem Wasser bei 50 und 70° gemessen. Aus dem Diagramm in Abb. 4 ist ersichtlich, daß die Reaktion streng nach erster Ordnung der Salzkonzentration von **3** verläuft. Es ergeben sich Halbwertszeiten von 181 bzw. 25 Min. Eine Berechnung der Aktivierungsenergie ist daraus wegen der Temperaturabhängigkeit des Ionenproduktes von H₂O und der starken pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit nicht ohne zusätzliche Annahmen möglich.

Die Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der OH-Konz. wurde schon von *Meindl*³ halbquantitativ gezeigt. Es liegen also die wesentlichen Charakteristika einer reversiblen Aldoladdition vor.

Reduktionsversuche an **4** und **2**

Durch *Clemmensen*-Reduktion lassen sich aus **1** alle Carbonylgruppen entfernen und man erhält Cholansäure¹⁴. Auch zur weitgehend selektiven Reduktion der 3-Ketogruppe sowohl zu 3 α -OH¹⁵, als auch zur CH₂-

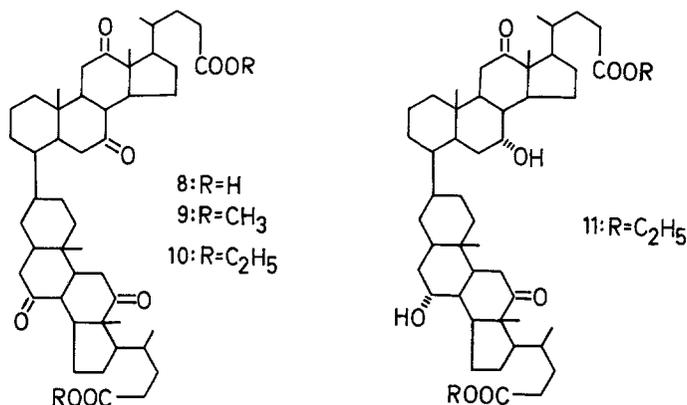
¹² *K. Koelichen*, Z. physik. Chem. **33**, 129 (1900).

¹³ *E. J. Corey* und *R. L. Young*, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1672 (1955).

¹⁴ *H. Wieland* und *E. Boersch*, Z. physiol. Chem. **106**, 190 (1919).

¹⁵ *W. Borsche* und *F. Hallwaß*, Ber. dtsh. chem. Ges. **55**, 3318 (1922).

Gruppe¹⁶ sind seit langem Methoden bekannt. Demgegenüber führt die *Clemmensen*-Reduktion von **4** zu einem sehr komplexen Gemisch, dessen Hauptprodukt (**8**) von *Meindl*³ isoliert wurde. Auf Grund der neuen Befunde ist die Verbindung als 7,12,7',12'-Tetraketo-(3,4'-bis-cholansäure) anzusprechen: Die *MS* der Methyl- bzw. Äthylester (**9** und **10**) liefern die Molekülionen 802 bzw. 830 und geben durch eine begünstigte Abspaltung der Seitenkette samt Ring D einen wichtigen Hinweis auf das Vorhandensein der 12-Ketogruppe⁴. Aus dem Ausbleiben einer Fragmentierung „in die beiden Hälften“ kann man auf das Fehlen von O-Funktionen (oder Doppelbindungen) in den Ringen A und A' schließen (fehlende Ladungsstabilisierung!). Die *ORD*-Kurve entspricht weitgehend 7,12-Diketocholansäurederivaten und das *NMR* zeigt keine Aufspaltung der 18-H- und 19-H-Methylsignale, woraus sich unmittelbar der fast symmetrische Bau dieser Verbindung ergibt; es herrscht wieder gute Übereinstimmung zwischen geforderten und gefundenen Signalen (vgl. Tab. 1).



Da sich durch die *Clemmensen*-Reduktion keine sehr weitgehende Entfernung der O-Funktionen aus **3** und **4** erreichen ließ, haben wir die Desulfurierung des Äthylthioketals mit Raney-Nickel versucht. Auch hierbei enthielt der Großteil des Reaktionsproduktes noch Carbonylfunktionen, wahrscheinlich teils durch unvollständige Ketalisierung, teils durch erschwerte Reduktion. Es gelang aber nach dünn-schichtchromatographischer Aufarbeitung in sehr geringen Ausbeuten eine Fraktion zu erhalten, in der massenspektrometrisch der Grundkörper mit O-freiem Steroidskelett (*MG* = 744) nachweisbar war. Er enthielt laut IR wohl noch die Carbomethoxygruppe, aber keine Carbonylgruppe mehr.

Reduktionsversuche von **4** mit NaBH₄ verliefen ebenso wie bei **2** als Modellsubstanz unbefriedigend (Epimerengemische von größtenteils vollständig reduzierten Produkten). Hingegen reduzierte Lithium-aluminium-

¹⁶ H. Wieland und V. Wiedersheim, Z. physiol. Chem. **186**, 229 (1930).

tri(tert.-butoxy)hydrid **2** überwiegend zum 3α , 7α -Dihydroxy-12-ketocholansäuremethylester (als Diacetat identifiziert). Dieselbe Selektivität zeigte das Reagens auch bei der Reduktion von **4** und **10**. Die Endprodukte der Reaktionen mit einem Überschuß an Reagens enthielten noch die 12-Ketogruppe (*MS*, *ORD*, *NMR*).

Folgenden Herren und Damen sind wir für die Aufnahme von Spektren zu besonderem Dank verpflichtet: *MS*: Dr. G. Schaden (MPI Kohlenforschung, Abt. Strahlenchemie, Mülheim/Ruhr), Dr. K. Frei (Sandoz A. G., Basel); *NMR*: Fr. Dr. I. Schuster (Wien), Dr. G. Schulz und Dr. G. Neudert (Schering A. G., Berlin), *ORD*: Dr. H. Falk (Wien) und Dr. H. Kemmner (Perkin-Elmer/Überlingen).

Die Mikroanalysen wurden von Herrn H. Bieler (Organ.-Chem. Institut der Universität Wien) bzw. im mikroanalytischen Labor der Sandoz A. G., Basel (Leitung Dr. W. Schöniger) ausgeführt.

Herrn Dr. E. Kerschbaum, Vorstand der Sanabo G. m. b. H., Wien, danken wir für sein förderndes Interesse. Der eine von uns (A. N.) dankt dem Bundesministerium für Unterricht für die Gewährung eines Stipendiums.

Experimenteller Teil

Alle Schmelzpunkte wurden am Heiztischmikroskop nach Kofler bestimmt. Für die Aufnahme der Spektren dienten folgende Geräte: *MS*: CH 4 (Atlas MAT), CH 4 B (Krupp MAT), 21-110 B (CEC) und MS 902 (AEI). *NMR*: A-60 und A-60 A (Varian). IR: IR-Spectrophotometer 237 (Perkin-Elmer). *UV*: Spectronic 505 (Bausch & Lomb). *ORD*: Spektropolarimeter P 22 (Perkin-Elmer) bzw. eine Kombination des lichtelekt. Polarimeters 141 (Perkin-Elmer) mit einem Beckman DU-Monochromator¹⁷.

Zur Molekulargewichtsbestimmung verwendeten wir das Dampfdruckosmometer der Fa. Dr. H. Knauer (Berlin). Die Messungen wurden bei 37° in CHCl_3 vorgenommen. Die Titrations zur Äquivalentgewichtbestimmung erfolgten mit einem Titrigraphen der Fa. Radiometer (Kopenhagen).

Die Analysenproben wurden bei $100^\circ/10^{-2}$ Torr über P_2O_5 bzw. Silikagel getrocknet. Es zeigte sich jedoch, daß die meisten der dargestellten Produkte sehr hartnäckig Lösungsmittelreste festhalten, wie schon mehrfach an Gallensäurederivaten beobachtet wurde. Die Ermittlung korrekter Analysenwerte bereitete daher in einigen Fällen Schwierigkeiten.

Zur *DC* wurde Kieselgel G (Merck) verwendet. Als Laufmittel dienten Gemische aus Benzol und Essigester (4:1 bis 1:2 je nach Polarität) bzw. die Systeme „S-11“ und „S-15“ (Heptan/Essigester/Eisessig 10:10:2 bzw. 10:10:0,1) von *Eneroth*¹⁸. Die Sichtbarmachung erfolgte durch Besprühen der getrockneten Platten mit einer 2proz. Lösung von $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ in $2n\text{-H}_2\text{SO}_4$ ¹⁹

¹⁷ H. Falk und G. Haller, *Allgem. und prakt. Chem.* **19**, 160 (1968).

¹⁸ P. *Eneroth*, *J. Lipid Res.* **4**, 11 (1963).

¹⁹ R. *Beugelmans*, R. H. *Shapiro*, L. J. *Durham*, D. H. *Williams*, H. *Budzikiewicz* und C. *Djerassi*, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 2832 (1964).

und Erhitzen bis zum Auftreten der sehr differenzierten Fleckenfarben. Bei der präpar. Schichtchromatographie genügte meist Besprühen mit Wasser²⁰; dabei werden die Substanzen als helle Streifen sichtbar.

*Pseudo-dehydrocholsäure (3)*³

5,2 g (12,9 mMol) Dehydrocholsäure (**1**) wurden in 30 ml Äthanol aufgeschlämmt und 8 ml 2*n*-wäßr. NaOH (16 mMol) zugegeben. Die Mischung wurde 2 Tage im Kühlschrank stehengelassen. Das ausgefallene Na-Salz wurde abgesaugt, mit Äthanol gewaschen und getrocknet. Ausb. 4,5 g (82% d. Th.). In der Mutterlauge befand sich neben dem Na-Salz von **3** noch das von **1**. Zur Gewinnung der freien Säure wurde das Na-Salz unter Eiskühlung mit verd. H₂SO₄ zersetzt, die ausgefallene Säure abgesaugt und getrocknet. Im DC (S-11) war darin kein **1** nachweisbar.

Pseudo-dehydrocholsäure-methylester (4)

3 wurde in einem Gemisch von CHCl₃/Methanol (1 : 1) suspendiert und mit äther. Diazomethanlösung versetzt, bis die Lösung auch nach 15 Min. noch schwach gelb blieb. Danach wurde das Lösungsmittel im Vak. abgedampft, der Rückstand in wenig CH₂Cl₂ aufgenommen und der Ester (**4**) durch portionenweise Zugabe von Äther feinkristallin ausgefällt.

*Pseudo-dehydrocholsäure II*³

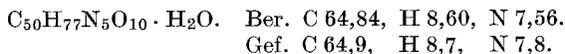
1,6 g **3** wurden mit 25 ml Eisessig 2 Stdn. in N₂-Atmosphäre unter Rückfluß gekocht. Verdünnen mit Wasser, Absaugen und Umkristallisieren aus Dioxan/Wasser oder Aceton lieferte eine gut kristallisierende Säure vom Schmp. 294—296°. C₄₈H₆₆O₉. Äqu.-Gew.: Ber. 393,5; Gef. 390 (Tit.).

Die Veresterung von P-II erfolgte analog wie bei **3**. Die Trennung von **5** und **6** gelang durch DC mit Benzol/Essigester (1 : 1) als Laufmittel. Aus Essigester/*n*-Hexan kristallisieren **5** und **6** mit den in Tab. 2 angegebenen Schmp. Die schnellerwandernde Komponente **5** erscheint beim Entwickeln des Chromatogramms mit Cer(IV)sulfat (s. o.) als leuchtend gelbgrün fluoreszierender Fleck schon bei gelindem Erwärmen, **6** wird etwas später als brauner Fleck sichtbar. Die R_f-Werte beider Komponenten liegen zwischen denen von **2** und **4**.

Dehydratisierung von 4 mit POCl₃/Pyridin

0,30 g **4** wurden in 2 ml absol. Pyridin nach Zugabe von 0,5 ml POCl₃ 24 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Hierauf wurde auf Eis gegossen und wie üblich aufgearbeitet. Es war laut DC ein Gemisch von **5** und **6** entstanden, in dem **5** deutlich angereichert war. Die Isolierung erfolgte durch präpar. DC.

Das Oxim von **4** wurde analog l. c.⁸ hergestellt. Schmp. 213—216° (Zers.) (aus Dioxan/Methanol oder Aceton/Methanol). [α]_D = + 1,4° (Dioxan, c = 0,3).



²⁰ K. Randerath, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Verlag Chemie, 1965.

Tabelle 2. Konstanten der Verb. 1—11

Verb.	Summenformel	MG: ber./gef.	Analyse: ber./gef.	Schmp. °C	UV: λ_{\max} (ϵ_{\max})	$[\alpha]_D$ (c:g/100ml)	ORD
1	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	402,5/402(MS)		238—240 (Z)	288 (80)*	+ 30°(0,1)*	
2	C ₂₅ H ₃₆ O ₅	416,5/416(MS)		241—242	292 (70)	+ 28°(0,4)	siehe Abb. 2
3	C ₄₈ H ₆₈ O ₁₀	805,0	C 71,61/71,41 H 8,51/ 8,30	> 280 Z	289 (150)*	+ 56°(0,1)*	
4	C ₅₀ H ₇₂ O ₁₀	833,1/800 ± 40 (Osm.)	C 72,08/71,86 H 8,71/ 8,42	237—239 (Z)	292 (130)	+ 30°(0,4)	siehe Abb. 2
Na-Salz v. 1				—	283 (100)**	+ 28°(1)**	
Na-Salz v. 3				—	284 (180)**	+ 43°(1)**	
5	C ₅₀ H ₇₀ O ₉	815,1/814(MS)	C 73,69/73,1 H 8,66/ 8,7	245—246 (Z)	288 (220)	—	siehe Abb. 2
6	C ₅₀ H ₇₀ O ₉	815,1/814(MS)		248—251 (Z)	283 (240)	—	
7	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	462,6/462(MS)	C 70,10/69,77 H 9,15/ 8,95	142—143	286 (80)	+ 36°(0,1)	[M] ₃₁₀ + 2000° [M] ₂₈₅ ± 0°
8	C ₄₈ H ₇₀ O ₈	775,0	C 74,39/74,82 ³ H 9,04/ 9,39	363—365 (Z)	293 (130)	—	[M] ₃₁₀ + 3100° [M] ₂₉₅ ± 0°
10	C ₅₂ H ₇₈ O ₈	831,2/830(MS)	C 75,13/74,94 ³ H 9,39/ 9,33	301—303	293 (120)	+ 19°(CHCl ₃)	
11	C ₅₂ H ₈₂ O ₈	835,2/834(MS)		262—265	290 (110)	—	[M] ₃₁₀ + 4600° [M] ₂₈₀ ± 0°

UV, $[\alpha]_D$ und ORD wurden in Dioxan gemessen. * in Methanol; ** in Wasser

*Hydroxylierung von 5 und 6 mit OsO₄*²¹

80 mg des Gemisches aus **5** und **6** (0,10 mMol) wurden in 1 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und mit einer Lösung von 40 mg (0,16 mMol) OsO₄ und 4 Tropfen Pyridin in 0,4 ml CH₂Cl₂ versetzt. Nach 30min. Stehen bei Raumtemp. hatte die Lösung dunkelbraune Farbe angenommen und wurde mit Hexan verdünnt. Der ausgefallene hellbraune Niederschlag wurde abgesaugt, mit 0,2 g D-Mannit in 6 ml 0,1*n*-NaOH 3 Stdn. bei Raumtemp. gerührt, wobei alles in Lösung ging, anschließend mit 10proz. H₂SO₄ angesäuert und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Der Abdampfrückstand der Methylenchloridlösung wurde wie üblich mit CH₂N₂ verestert und durch präpar. DC aufgetrennt. Außer zwei langsam wandernden Zonen, die nicht näher charakterisiert wurden, isolierte man als Hauptprodukt Dehydrocholsäuremethylester (DC-Vgl., Misch-Schmp.).

Polarimetrische Verfolgung der Spaltung von 3 zu 1

Eine Lösung von 50 mg des Na-Salzes von **3** in 5,0 ml dest. Wasser wurde in einer auf 50,0 bzw. 70,0 ± 0,1° C thermostatierten Küvette (1 dm) polarimetriert. Meßwellenlänge 360 nm. Die Reaktion wurde bei 70° über drei, bei 50° über eineinhalb Halbwertszeiten verfolgt. Die Enddrehung haben wir unter gleichen Bedingungen an einer Lösung von 50 mg des Na-Salzes von **1** bestimmt. Aus der graph. Auswertung der Daten für eine Reaktion erster Ordnung durch Auftragen von log (α₀ - α_∞) - log (α - α_∞) gegen *t* ergibt sich in sehr guter Näherung eine Gerade, die zu den folgenden Werten führt:

$$k_{50} = 6,40 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1}, \text{ daraus } \tau_{1/2} = 181 \text{ Min.}$$

$$k_{70} = 4,62 \cdot 10^{-1} \text{ sec}^{-1}, \text{ daraus } \tau_{1/2} = 25 \text{ Min.}$$

Clemmensen-Reduktion von 4³

1 g **4** wurde in 30 ml Äthanol suspendiert und unter portionenweiser Zugabe von insgesamt 30 ml konz. HCl und 20 g amalgam. Zinkstaub 16 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Darnach wurde stark mit Wasser verdünnt, mit CH₂Cl₂ extrahiert und neutral gewaschen. Aus dem Abdampfrückstand ließ sich durch präpar. DC (Benzol/Essigester 3:1) und Umkristallisieren aus Äthanol in schlecht reproduzierbaren Ausbeuten der Äthylester **10** isolieren: Feine Nadeln vom Schmp. 301—303° (direkter Vergleich mit dem von Meindl erhaltenen Produkt). Aus **10** erhält man durch Verseifen mit Natriumäthylat in Äthanol (1 Stde. Rückfluß) nach üblicher Aufarbeitung die Säure **8³**.

Den *Methylester* stellten wir aus **8** durch Veresterung mit CH₂N₂ her. Schmp. 318—320° (Zers.). C₅₀H₇₄O₈. MG ber. 803,2, gef. 802 (MS).

*Äthylthioketale und deren Desulfurierung mit Raney-Nickel**Tri-äthylthioketal von 2*

0,10 g **2** wurden in 0,5 ml frisch dest. Borfluorid-ätherat gelöst und bei 0° mit 0,5 ml Äthandithiol versetzt²². Nach 20 Min. wurde die Kühlung entfernt und dann noch 2 Stdn. bei Raumtemp. belassen. Verdünnen mit CH₂Cl₂, Zugabe von Wasser, mehrmaliges Ausschütteln der org. Phase mit 10proz. KOH, Neutralwaschen und Trocknen lieferte nach Abdampfen des Lösungs-

²¹ R. Criegee, B. Marchand und H. Wannowius, Ann. Chem. **550**, 99 (1942).

²² L. F. Fieser, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1945 (1954).

mittels einen Rückstand, der aus Essigester/Hexan umkrist. wurde. Schmp. 204—205° (im *DC* einheitlich). *MG* ber. 645,1, gef. 644 (*MS*).

$C_{31}H_{48}O_2S_6$. Ber. C 57,72, H 7,50. Gef. C 57,29, H 7,14.

Das Tri-äthylthioketal von Dehydrocholsäureäthylester ist bereits beschrieben²³.

Äthylthioketal von 3

3 wurde analog wie **2** ketalisiert. Nach Umlösen aus CH_2Cl_2 /Äther hatte das Produkt den Schmp. 259—262°. $C_{53}H_{88}O_5S_{10}$. Äqu.-Gew.: ber. 593, gef. 582 (Titr.).

Äthylthioketal von 4

0,25 g **4** wurden, wie für **2** beschrieben, mit 1,5 ml Borfluorid-ätherat und 1,5 ml Äthandithiol umgesetzt, nach 2 Stdn. mit viel Wasser und Hexan durchgeschüttelt, abgesaugt und mit Hexan gründlich gewaschen. Umfällen aus Essigester/Hexan lieferte 0,35 g eines Produktes vom Schmp. 202—204°. $C_{60}H_{92}O_5S_{10}$. *MG* ber. 1214, gef. 1150 ± 100 (Dampfdruckosmometer).

Desulfurierung mit Raney-Nickel²³

0,31 g Äthylthioketal von **4** wurden in 20 ml Dioxan/Tetrahydrofuran (3:1) mit etwa 10 g frisch aktiviertem Raney-Ni 8 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Das Raney-Ni wurde dann abfiltriert, mit *THF* ausgewaschen und das Filtrat eingedampft. Den Rückstand haben wir mit Hexan extrahiert. Durch präpar. *DC* (Benzol) wurde daraus eine schnellwandernde Zone abgetrennt, in der laut *MS* eine Verbindung vom *MG* 744 (mit einem Schlüsselbruchstück bei 629 = *M*-Seitenkette) angereichert ist.

IR: 1740 cm^{-1} ($COOCH_3$), keine Bande um 1710 cm^{-1} ($C=O$).

Reduktionen mit $LiAlH[OC(CH_3)_3]_3$

0,10 g (0,24 mMol) **2** wurden in 3 ml absol. *THF* gelöst und bei 0° mit 2 ml einer 0,5mol. Lösung von $LiAlH[OC(CH_3)_3]_3$ in *THF*²⁴ (1,0 mMol) versetzt. Nach 15 Min. wurde mit verd. H_2SO_4 zersetzt, mit CH_2Cl_2 versetzt, neutralgewaschen und das Lösungsmittel nach dem Trocknen abgedampft. Den Rückstand haben wir in 1 ml Pyridin mit 0,5 ml Ac_2O 2 Stdn. im Wasserbad erhitzt. Dann wurde wie üblich aufgearbeitet und durch präpar. *DC* gereinigt. Das schnellerwandernde Hauptprodukt (50 mg) mit Schmp. 177—179° (aus CH_2Cl_2 /Äther) wurde als 3,7-Diacetoxy-12-keto-cholansäuremethylester identifiziert (Lit.-Schmp.²⁵ 177—178,5°; Misch-Schmp. mit authent. Probe). Aus einer langsamer wandernden Zone wurden 15 mg 3-Acetoxy-7,12-diketo-cholansäuremethylester isoliert (Schmp. 160—162°; authent.²⁶ Probe: Schmp. 163—164°; Misch-Schmp. 162—164°).

0,30 g (0,36 mMol) **4** setzte man, wie für **2** beschrieben, mit 4 ml des Hydridreagens (2,0 mMol) um (30 Min. Reaktionsdauer bei Raumtemp.). Aus

²³ H. Hauptmann, J. Amer. chem. Soc. **69**, 562 (1947).

²⁴ Ch. Tamm, Helv. Chim. Acta **43**, 338 (1960).

²⁵ P. A. Plattner und H. Heusser, Helv. Chim. Acta **27**, 748 (1944).

²⁶ R. Grand und T. Reichstein, Helv. Chim. Acta **28**, 344 (1945).

dem Reaktionsprodukt ließ sich durch präpar. *DC* (S-11) eine sehr langsam wandernde Substanz gewinnen (beim Entwickeln lila Fleck), die glasig erstarrte. Bei nochmaliger Behandlung mit einem Überschuß an Hydridreagens blieb sie unverändert. $C_{50}H_{78}O_{10}$ (?). *MG* ber. 839, gef. 780 ± 70 . IR: $3600, 3460\text{ cm}^{-1}$ (breit): OH, 1735 ($COOCH_3$), 1710 cm^{-1} ($C=O$). *ORD* (Dioxan): $[M]_{315} + 4200^\circ$, $[M]_{290} \pm 0^\circ$. *NMR*: 18-H- und 19-H-Methylsignal fallen praktisch zusammen: $\delta = 1,03$ ppm. Ber. 19-H: 1,02, 18-H: 1,03 (für $3\alpha, 3\alpha', 7\alpha, 7\alpha'$ -Tetrahydroxy-12,12'-diketo-(3,4'-bis-cholansäuremethylester]).

65 mg **10** ergaben mit 1,8 ml Hydridreagens nach Reinigung durch präpar. *DC* (Benzol/Essigester 3 : 1) 30 mg einer Substanz mit Schmp. $262\text{--}265^\circ$, dessen spektroskopische Daten sie als **11** charakterisieren (Tab. 2).