
**Neue Sauerstoffderivate der D-Vitamine
als potentielle NGF-Induktoren**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Claus W. Prümper

aus Marsberg

Marburg/Lahn 1998

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg / Lahn

als Dissertation angenommen am:

24.6.1998

Tag der mündlichen Prüfung:

24.6.1998

Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Matusch

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. K. Hartke

Die vorliegende Arbeit entstand am
Institut für Pharmazeutische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. R. Matusch

Für die Anregung zu dieser Arbeit,
seine stets großzügige Unterstützung
und wohlwollende Förderung danke ich
Herrn Prof. Dr. R. Matusch sehr herzlich.

Danksagungen

Ein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Matusch für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Diskussions- wie auch Hilfsbereitschaft. Im besonderen möchte ich Herrn Floris van Elsäcker für die Einarbeitung in den Arbeitskreis, Frau Dr. A. Sinz für zahlreiche Anregungen und Herrn Dr. P. Krüger für die Beratung in Computerfragen danken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein für die Ermöglichung der Zelltests in seinem Arbeitskreis bedanken. Allen Mitgliedern seines Arbeitskreises, besonders Frau R. Hartmannsgruber, Frau R. Hühne und Frau Dr. I. Semkova danke ich für die überaus freundliche und fachlich versierte Unterstützung.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes danke ich für die Erfüllung zahlreicher Sonderwünsche. Vor allem bedanke ich mich bei Herrn Dr. T. Kämpchen, Frau H. Lang und Herrn U. Grundey für die geduldige Durchführung vieler NMR-Messungen.

Meiner lieben Frau Monty danke ich für ihr Verständnis und die absolut selbstlose Unterstützung meiner Arbeit.

Für Mario

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen und Acronyme

Theoretischer Teil

1. Einleitung.....	1
2. Problemstellung.....	5
3. Eigenschaften von Singulett- und Triplett-sauerstoff.....	11
3.1 Reaktionsmöglichkeiten von Singulett- und Triplett-sauerstoff.....	12
3.2 Erzeugung von Singulett-sauerstoff.....	13
4. Auswahl der Reaktionsbedingungen.....	13
4.1 Auswahl des Sensibilisators.....	14
4.2 Auswahl der Lichtquelle.....	14
4.3 Auswahl des Lösungsmittels.....	14
5. Vorversuche zur Darstellung der Substanzbibliothek.....	15
5.1 Photosensibilisierte Oxidation von Vitamin D in Dichlormethan.....	16
5.1.1 Identifizierung der Hauptprodukte.....	16
5.2 Photosensibilisierte Oxidation von Vitamin D in Ethanol.....	22
6. Darstellung der Substanzbibliothek.....	22
7. Isolierung von Verbindungen aus der photosensibilisierten Oxidation von Vitamin D ₃	23
7.1 Allgemeine Bemerkungen zur Isolierung der erhaltenen Produkte.....	24
7.2 Untersuchung der Fraktion A-1.....	26
7.3 Untersuchung der Fraktion A-2.....	26
7.4 Untersuchung der Fraktion A-3.....	27
7.5 Untersuchung der Fraktion A-4.....	28
7.6 Untersuchung der Fraktion C.....	29
8. Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen.....	31
8.1 Allgemeine Bemerkungen zur Strukturaufklärung der erhaltenen Verbindungen.....	31

8.1.1 Aufklärung der Stereochemie an C-6 bei Verbindungen mit zusätzlichem Ringssystem.....	34
8.2 Fragmentierungsprodukte.....	38
8.2.1 Polare Fragmentierungsprodukte 42 und 43	38
8.2.2 Lipophile Fragmentierungsprodukte 56 und 57	42
8.3 Verbindungen mit Endoperoxidfunktion.....	44
8.3.1 Die Vitamin D Endoperoxide 14 und 15	45
8.3.2 Die 6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3,10 α -diol (45) bis (47).....	49
8.3.3 Das (6S)-6,19-Epidioxy-10 α -Hydroxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3-on (55)	54
8.3.4 Das (6R)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-1(10),7-dien-3 β ,5 α -diol (48)	56
8.3.5 Das (6S)-1 α -Hydroxy-Endoperoxid (44)	60
8.3.6 Das (6R)-6,19-Epidioxy-5,10-Epoxy-9,10-secocholesta-7-en-3 β -ol (49).....	62
8.3.7 Die 6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3-one (58) und (59).....	64
8.4 Verbindungen mit zusätzlichem Fünfring.....	67
8.4.1 Die 6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-19-one (51) und (52)	67
8.4.2 (6R)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-1-on (50).....	71
8.5 Derivate ohne zusätzliches Ringsystem.....	73
8.5.1 Die Vitamin-D Hydroperoxide 12 und 13	73
8.5.2 Die 9,10-secocholesta-7,10(19)-dien-3 β ,5 β ,6-triole (53) und (54)	77
8.5.3 Das (6S)-6-Hydroxy-9,10-secocholesta-4,7,10(19)-trien-3-on (60)	83
9. Gezielte Derivatisierungen	85
9.1 Hydroxylierung von Vitamin D ₃ in 1-Position	86
9.2 Umsetzung von 1 α -Hydroxyvitamin D ₃ (84) mit Singulett-Sauerstoff	90
9.2.1 Die 1 α -Hydroxy-Endoperoxide (85) und (44).....	91
9.2.2 Die 9,10-Secocholesta-4,7,10(19) -trien-1 α ,3 β ,6-triole (88) und (89)	93
9.3 Umsetzung der Vitamin D-Endoperoxide 14 und 15 mit Triphenylphosphin	94
9.3.1 Das 3 β -Hydroxy-9,10-secocholesta 7,10(19)-dien-6-on (93a)	98
9.3.2 Das (6R)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien (91a).....	101
10. Untersuchungen zur NGF-induzierenden Wirkung von Vitamin D- Derivaten	103

10.1 Präparation und Kultivierung von Astrozyten	103
10.2 Fluoreszenz-NGF-ELISA	104
10.3 Optimierung der Testbedingungen	104
10.3.1 Verwendung von vorbehandelten Zellen	105
10.3.2 Verwendung von nicht vorbehandelten Zellen.....	108
10.4 Testung von isolierten Reinsubstanzen.....	110
10.5 Testergebnisse	111
10.5.1 Diskussion der Ergebnisse	114
11. Zusammenfassung	117

Experimenteller Teil

Allgemeine Methoden.....	121
Trennungen und Trennsysteme.....	122
Umsetzung von Vitamin D mit Singulett-Sauerstoff.....	125
Hydroxylierung von Vitamin D ₃ in 1 α -Position	125
Umsetzung von Vitamin D-Endoperoxiden 14 und 15 mit Triphenylphosphin.....	127
Materialien, die in der Zellkultur verwendet wurden	127
Materialien, die beim ELISA verwendet wurden	127
Präparation und Anzucht von Astrozyten	128
Behandlung der Kulturen.....	129
Bestimmung des NGF mittels ELISA	129
(4 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)-6-Hydroperoxy-9,10-secocholesta-4,7,10(19)-trien-3 β -ol (12a).....	131
(4 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,22 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)-6-Hydroperoxy-9,10-secoergosta-4,7,10(19),22-tetraen- 3 β -ol (12b)	133
(4 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6-Hydroperoxy-9,10-secocholesta-4,7,10(19)-trien-3 β -ol (13a)	135
(4 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,22 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6-Hydroperoxy-9,10-secoergosta-4,7,10(19),22-tetraen- 3 β -ol (13b)	137
(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3 β -ol (14a).....	138
(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> ,22 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6,19-Epidioxy-9,10-secoergosta-5(10),7,22-trien-3 β -ol (14b) ...	140
(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3 β -ol (15a).....	142

(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> ,22 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)-6,19-Epidioxy-9,10-secoergosta-5(10),7,22-trien-3 β -ol (15b) ...	143
1((<i>R</i>)-1',5'-dimethylhexyl)-4((α <i>E</i>)-2''-methylstyryl)-7a-methyl-(1 α ,7 α)- 5,6,7,7a-tetrahydroindan (36a)	145
1((2 <i>E</i>)-(1' <i>R</i> ,4' <i>R</i>)-1',4',5'-trimethyl-2-hexenyl)-4((α <i>E</i>)-2''-methylstyryl)-7a- methyl-(1 α ,7 α)-5,6,7,7a-tetrahydroindan (36b)	147
1((<i>R</i>)-1',5'-dimethylhexyl)-4((α <i>Z</i>)-2''-methylstyryl)-7a-methyl-(1 α ,7 α)- 5,6,7,7a-tetrahydroindan (37a)	149
1((2 <i>E</i>)-(1' <i>R</i> ,4' <i>R</i>)-1',4',5'-trimethyl-2-hexenyl)-4((α <i>Z</i>)-2''-methylstyryl)-7a- methyl-(1 α ,7 α)-5,6,7,7a-tetrahydroindan (37b)	150
6 α ,8 α -Dihydroxy-1,5,6,7,8,8a-hexahydroisochroman-3-on (42).....	152
6 α ,8 α β -Dihydroxy-1,5,6,7,8,8b-hexahydro-isochroman-3-on (43).....	153
(5 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-1 α ,3 β -diol (44).....	154
(4 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3 β ,10 α -diol (45)	156
(4 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)- 6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3 β ,10 α -diol (46)	158
(4 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)- 6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3 β ,10 β -diol (47)	160
(1 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)- 6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-1(10),7-dien-3 β ,5 α -diol (48)	162
(7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6,19-Epidioxy-5,10-epoxy-9,10-secocholesta-7-en-3 β -ol (49)	163
(5 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)- 6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-1-on (50)	165
(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-19-on (51)	167
(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-19-on (52)	168
(7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)-9,10-secocholesta-7,10(19)-dien-3 β ,5 β ,6-triol (53)	170
(7 <i>E</i>)- (6 <i>R</i>)-9,10-secocholesta-7,10(19)-dien-3 β ,5 β ,6-triol (54).....	172
(4 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)- 6,19-Epidioxy-10 α -hydroxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3-on (55)..	174
((4 <i>E</i>)-1 α ((<i>R</i>)-1',5' dimethylhexyl)-7a-methyl-(3 α β , 7 α)-hexahydroindan- 4-yliden)-acetaldehyd (56)	176
(4 <i>E</i>)-1 α ((<i>R</i>)-1',5' Dimethylhexyl)-4-(2'',2''-dimethoxyethyliden)-7a-methyl- (3 α β , 7 α)-hexahydroindan (57)	177
(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3-on (58).....	179
(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3-on (59)	180
(4 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6-Hydroxy-9,10-secocholesta-4,7,10(19)-trien-3-on (60).....	182
(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-1 α ,3 β -diol (85)	184

(5 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)- 9,10-secocholesta-4, 7,10(19) -trien-1 α ,3 β ,6-triol (88).....	186
(5 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-(6 <i>S</i>)-9,10-secocholesta-4, 7,10(19) -trien-1 α ,3 β ,6-triol (89)	187
(5 <i>Z</i> ,7 <i>E</i> - (6 <i>R</i>)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien (91a).....	189
(7 <i>E</i> ,22 <i>E</i>)-(6 <i>R</i>)-6,19-Epoxy-9,10-secoergosta-5(10),7,22-trien (91b)	191
(7 <i>E</i>)-(5 <i>S</i>)-3 β -Hydroxy-9,10-secocholesta 7,10(19)-dien-6-on (93a).....	192
(7 <i>E</i> , 22 <i>E</i>)-(5 <i>S</i>)-3 β -Hydroxy-9,10-secoergosta 7,10(19),22-trien-6-on (93b)	194

Abkürzungen und Acronyme

APT	Attached Proton Test
CI	Chemische Ionisation
¹³ C-NMR	breitbandenkoppeltes ¹³ C-NMR-Spektrum
COLOC	Correlation Spectroscopy via Long Range Coupling
COSY	Correlated Spectroscopy
<i>ddd</i>	Dublett von Dubletts von Dubletts
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoßionisation
FCS	Foetal Calf Serum
HEPES	N-(2Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
¹ H-NMR	vollständig gekoppeltes ¹ H-NMR-Spektrum
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	infrarot-, Infrarotspektroskopie
LC	Liquid Chromatographie
MG	Molekulargewicht
MS	Mass Spectroscopy
MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-galactoside
NGF	Nerve Growth Factor
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effekt
NOESY	Nuclear Overhauser Effekt Spectroscopy
PBS	Phosphate-Buffered Salt
PSN	Penicillin, Streptomycin, Neomycin
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TLC	Thin Layer Chromatographie
TMS	Tetramethylsilan
UV	ultraviolett-, Ultraviolettspektroskopie
VIS	visible, sichtbarer Bereich

Theoretischer Teil

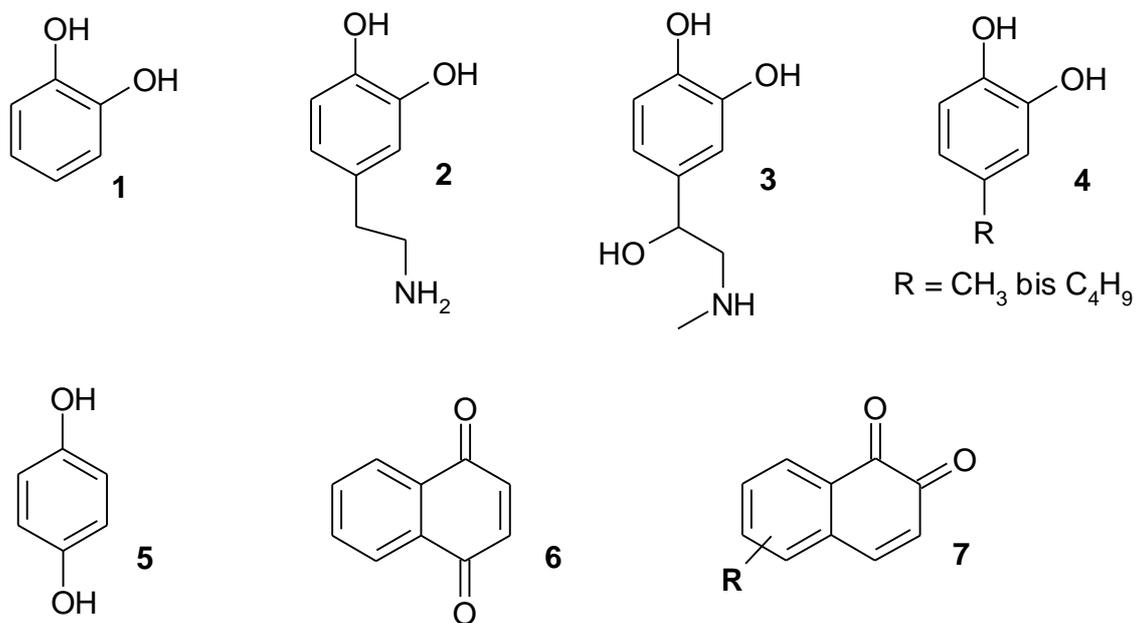
1. Einleitung

Der Schlaganfall zählt in vielen Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen. In den Statistiken der USA nimmt er nach Herzerkrankungen und Krebs die dritte Stelle ein und ist zudem die meistgenannte Ursache für Behinderungen Erwachsener [1]. Selbst wenn ein Patient einen Schlaganfall überlebt, so leidet er im Anschluß oft unter Koordinations-, Seh- und Empfindungsstörungen, Lähmungen oder geistigen Defekten. Im schlimmsten Fall endet der Patient im Koma. Die Ursache für einen Schlaganfall ist oft die plötzliche Durchblutungsstörung einer Gehirnregion, in deren Folge es zu einem massiven Gewebsuntergang kommt. Der Verlust von wichtigen Gehirnfunktionen durch eine Schädigung von Neuronen tritt aber nicht nur nach einem akuten Schlaganfall auf, sondern ebenfalls bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson. Eine aussichtsreiche Möglichkeit, diesen Patienten zu helfen und nebenbei den nicht unerheblichen volkswirtschaftlichen Schaden zu mindern, bietet der therapeutische Einsatz von neurotrophen Faktoren.

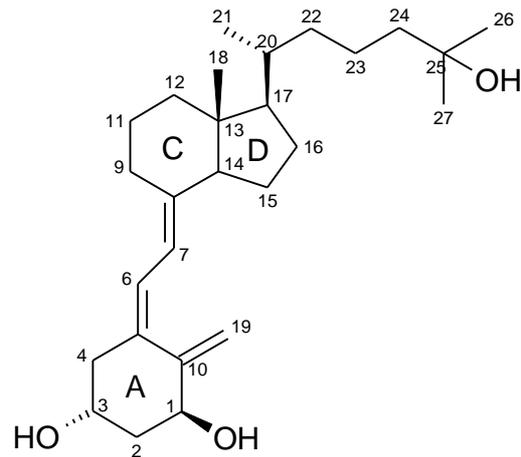
Diese neurotrophen Faktoren oder Wachstumsfaktoren sind für das Überleben von Neuronen und für die Zell-Regenerierung von entscheidender Bedeutung und können damit der Zerstörung von Gehirngewebe entgegenwirken. Als ältester bekannter und am besten untersuchter Wachstumsfaktor ist der Nervenwachstumsfaktor (NGF, nerve growth factor) hervorzuheben [2,3]. Wie gezeigt werden konnte fördert dieser die Ausbildung von Neuriten, verhindert das Absterben von Neuronen nach einer Läsion und verringert deren Apoptoserate [4,5]. Als hochmolekulares Protein ist NGF jedoch kaum in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, was den therapeutische Nutzen stark mindert.

In letzter Zeit hat sich jedoch gezeigt, daß bestimmte niedermolekulare Substanzen als Wachstumsfaktorinduktoren in der Lage sind, die endogene Produktion von NGF im Gehirn zu erhöhen [6,7]. Ein wesentlicher Baustein vieler NGF-Induktoren ist das Brenzcatechin-Strukturelement (1) [8,9]. Dieses Strukturelement tritt auch in den physiologischen Catecholaminen Dopamin (2) und Adrenalin (3) auf. Dopamin und Adrenalin bewirken jedoch nur bei Ischias-

nervenzelllinien von Ratten eine Zunahme des NGF-Gehalts [10]. Bei Maus-Astrozyten wird der NGF-Gehalt durch deren Applikation dagegen gesenkt [11]. Fehlt die Aminogruppe in der Seitenkette, wie bei den Brenzcatechin-abkömmlingen **4**, so kommt es unabhängig vom untersuchten Zelltyp zu einer deutlichen Anreicherung von NGF [12]. Hydrochinon (**5**) und 1,4-Naphtochinon (**6**) sind wie die substituierte 1,2-Naphtochinonderivate **7** ebenfalls wirksame Induktoren [13].



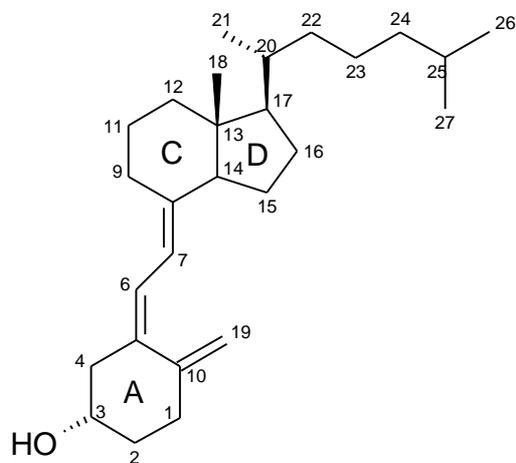
Nach einer vergleichenden Studie hat sich jedoch 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) (**8**) als weitaus effektiver erwiesen [14]. Der Studie zufolge ist Calcitriol (**8**) um einen Faktor 4000 wirksamer als 4-Methylbrenzcatechin (**4**) und wird lediglich von Interleukin-1 β übertroffen, das noch eine zehnfach höhere Wirksamkeit als Calcitriol zeigt. Wie NGF selbst ist Interleukin-1 β aber ein hochmolekulares Peptid (M_r = 18 kD) und daher ebenfalls nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Als fettlösliches Vitamin ist **8** hingegen lipophil genug, um die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. In der menschlichen Cerebrospinal-Flüssigkeit können daher ähnlich hohe Calcitriol Konzentrationen wie im Blutplasma erreicht werden [15]. Die Fähigkeit von **8** zur NGF-Induktion wurde schließlich nicht nur in vitro [16,17], sondern ebenfalls in vivo [18] bestätigt.



1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (**8**) (Calcitriol)

In verschiedenen Gehirnregionen sind bereits Rezeptoren für **8** gefunden worden [19,20]. So kann es dort unter anderem die Cholin-Acetyltransferase-Aktivität erhöhen [21]. Dies ist für die Therapie der Alzheimer Krankheit von Bedeutung, bei der die Degeneration cholinergischer Neuronen im Vordergrund steht [22].

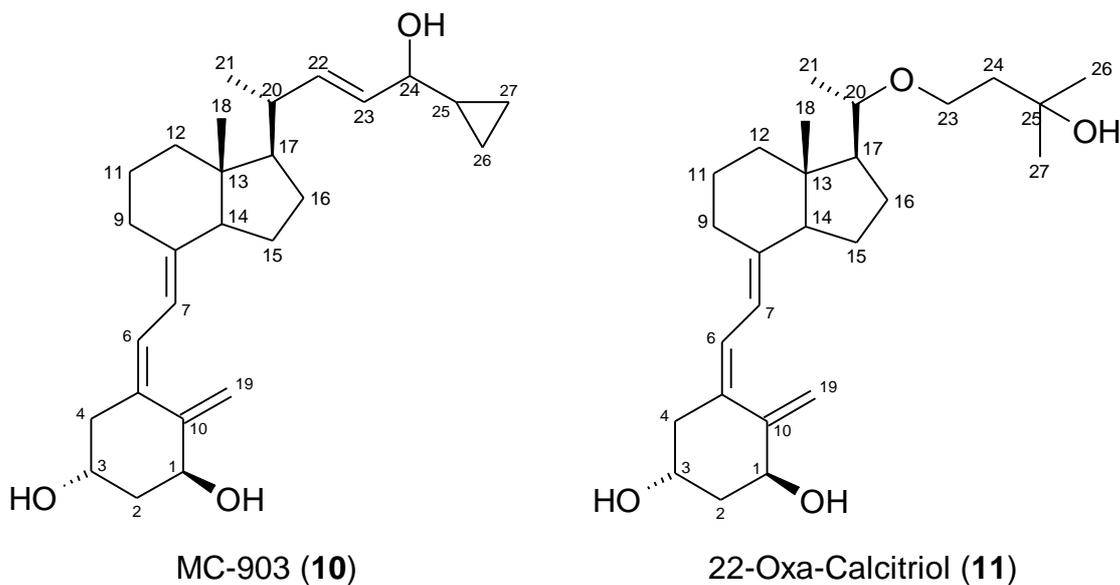
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (**8**) wird im menschlichen Körper in zwei unabhängigen Hydroxylierungsschritten aus Vitamin D₃ (**9**) gebildet und spielt eine zentrale Rolle für die Calcium-Homöostase [23]. Es fördert unter anderem den Mineralisationsprozeß in den Knochen, die Rückresorption von Calcium-Ionen im distalen Tubulus der Niere und deren Resorption über die Enterocyten aus dem Intestinaltrakt [24]. Es beeinflusst aber auch die Zelldifferenzierung [25], die Sekretion von Hormonen [26] und die Proliferation von T-Zellen [27].



Vitamin D₃ (**9**) (Cholecalciferol)

In den letzten Jahren wurden daher ebenfalls an zahlreichen anderen Zellen, wie etwa denen des hämatopoetischen Systems, Zellen der Epidermis [28] und der Lymphozyten, Rezeptoren gefunden, an denen $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (**8**) angreifen kann. Die Ergebnisse verschiedener Forschergruppen bestätigen jedoch die Annahme, daß $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (**8**) nicht für alle der genannten Rezeptoren den wirksamsten Agonisten darstellt [29,30]. Desweiteren steht bei einer Applikation dieser Substanz der guten Wirksamkeit und Hirngängigkeit die Gefahr einer Hypercalcämie entgegen.

Diese Nachteile begründen die Suche nach neuen Vitamin D-Derivaten, denn durch eine chemische Modifizierung kann der Effekt der Induktion von Wachstumsfaktoren eventuell von dem der Calciumresorption getrennt werden. In der Tat sind bereits einige solcher Verbindungen wie etwa MC-903 (**10**) oder 22-Oxa-Calcitriol (**11**) beschrieben worden. Sie steigern in vergleichbarer Weise die Expression von NGF, sind aber weit weniger calcämisch [9,31].



MC-903 (**10**), wird seit längerer Zeit in der Psoriasis-therapie eingesetzt. Es entfaltet dort eine um ca. 20 % höhere Wirksamkeit als Calcitriol (**8**) selbst [32]. Modifizierte Substanzen auf Vitamin D-Basis können demnach eine höhere biologische Aktivität als das eigentliche $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (**8**) aufweisen.

2. Problemstellung

Eine Möglichkeit zu neuen Vitamin-D Derivaten zu gelangen, ist die gezielte chemische Veränderung der Ausgangsverbindung. Dabei ist man gezwungen, aus der Vielzahl an möglichen Reaktionen eine Auswahl zu treffen. Zu Beginn einer Arbeit ist aber oftmals nicht klar, welche Funktionalisierungen oder Strukturveränderungen zum Erfolg führen, zumal die räumlichen Strukturen der entsprechenden Rezeptoren meist unbekannt sind. Durch die Vorauswahl der Derivatisierungsreaktionen werden daher die Chancen eine wirksame Verbindung zu erhalten deutlich eingeschränkt.

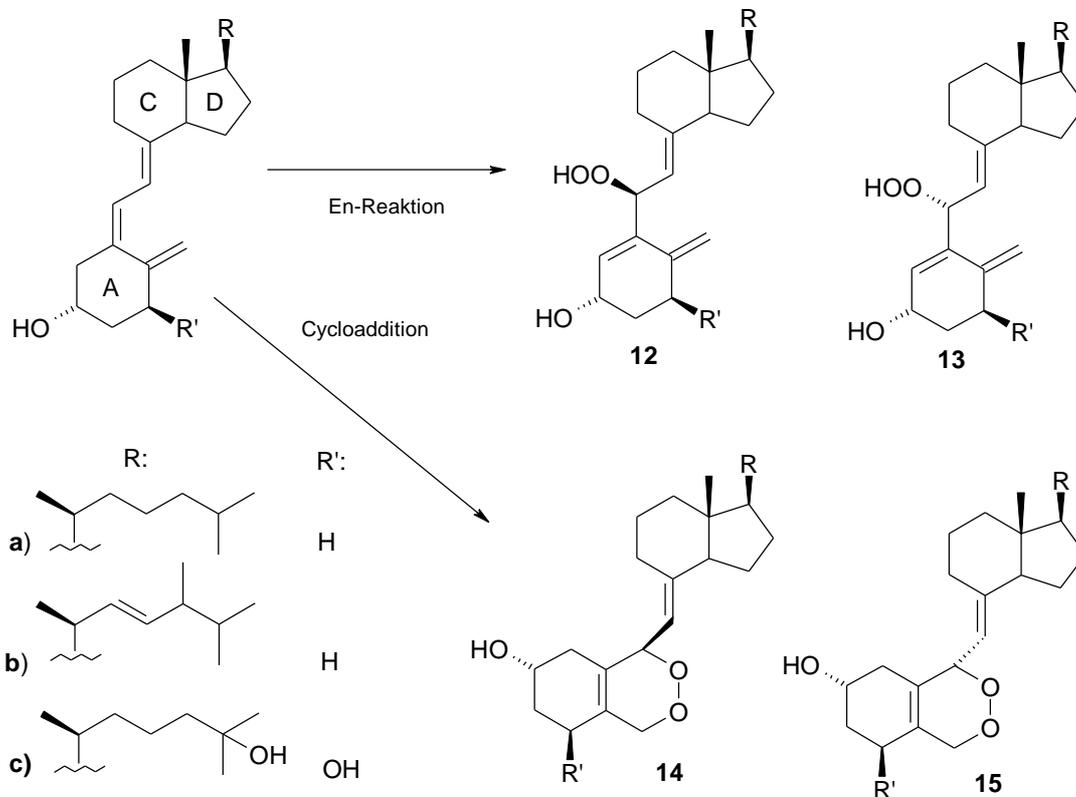
Eine andere, vollkommen neue Möglichkeit, Leitstrukturen und wirksame Verbindungen zu erhalten, ist die gleichzeitige Erzeugung einer kompletten Substanzbibliothek. Dazu kann eine einzige, weitgehend unselektive Reaktion eingesetzt werden. Durch diese kann es auch zu Strukturvariationen kommen, die man bei einer gezielten Derivatisierung nicht in Betracht gezogen hätte. Außerdem ist mit einer deutlich höheren Produktvielfalt zu rechnen.

Bei den bisher dargestellten und an Zellkulturen auf NGF-Induktion getesteten Vitamin D-Derivaten handelt es sich ausnahmslos um Seitenkettenmodifikationen von $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (**8**). Zur Erzeugung einer Substanzbibliothek und zur Gewinnung neuer Erkenntnisse war demnach eine Methode wünschenswert, die vorwiegend zur Derivatisierung am Ringsystem A und an den Doppelbindungen führt. Betrachtet man die Strukturen der NGF-Induktoren **1** bis **8** so fällt zudem auf, daß sich bei diesen Verbindungen immer zwei Sauerstoffatome in relativer Nähe zueinander befinden. Zur Auffindung neuer NGF-Induktoren erschien es demnach ebenso aussichtsreich, Sauerstoffderivate von Vitamin D_3 (**9**) zu erzeugen.

Reaktionen mit Sauerstoff im Grundzustand laufen aufgrund des Spinerhaltungsgebots vorwiegend radikalisch ab [33]. Durch diese häufig unselektiven Reaktionen kann es auch zu Veränderungen an den Ringen C und D sowie an der Seitenkette von Vitamin D_3 (**9**) kommen. Desweiteren gehen radikalische Reaktionen oft mit Fragmentierungen einher, wodurch eine Zerstörung des Grundgerüsts von **9** auftreten kann. Sauerstoff im Singulettzustand reagiert dagegen nicht radikalisch und vorwiegend an Doppelbindungen. Zu den bereits

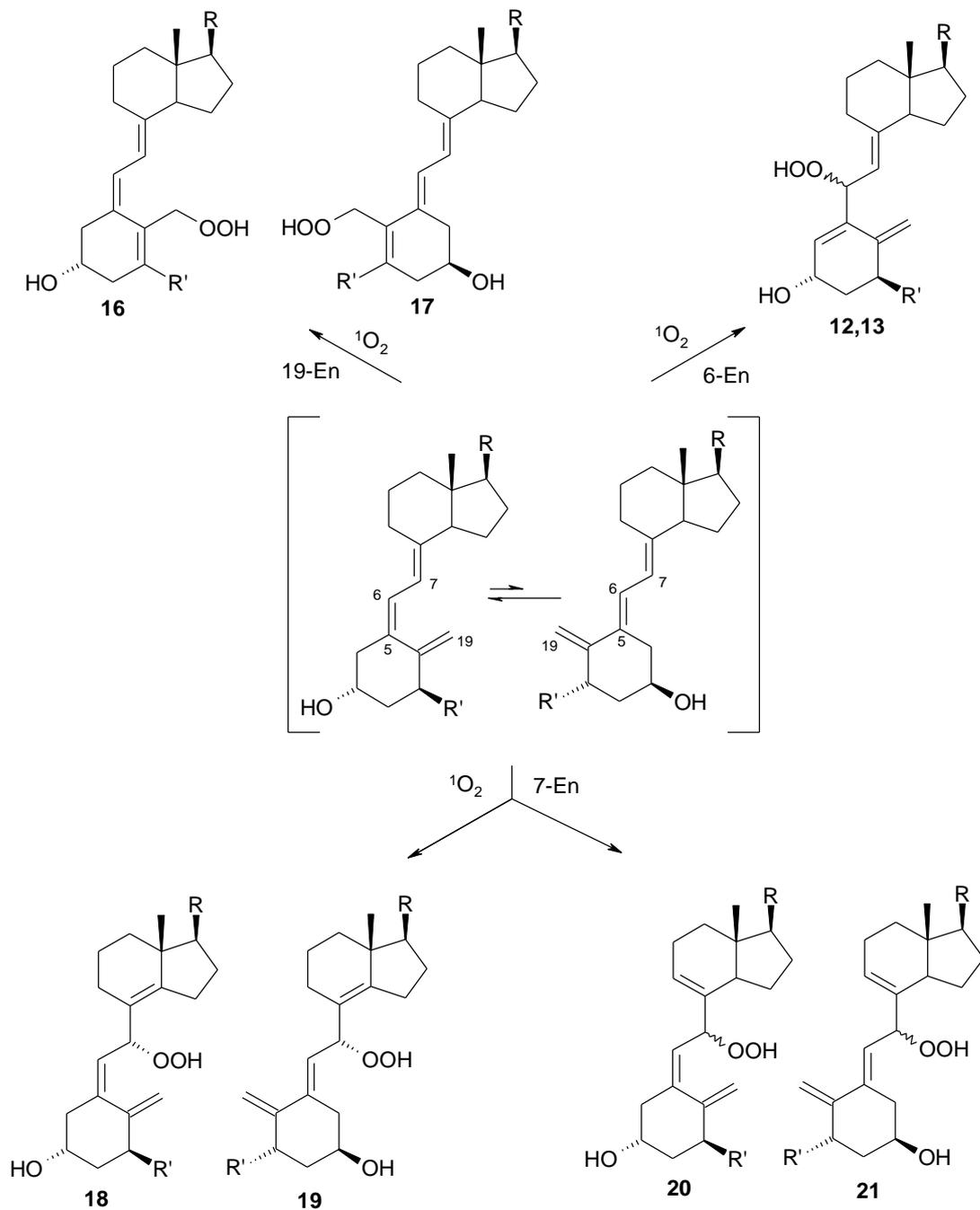
beschriebenen Produkten aus der Reaktion von Vitamin D mit Singulett-sauerstoff zählen die in Schema 1 gezeigten Hydro- und Endoperoxide [34,35].

Schema 1



Durch diese Reaktion kommt es vorwiegend zu einer Derivatisierung am Ringsystem A. Eine wichtige Bedingung für NGF-Induktoren auf Vitamin D-Basis können die Endoperoxide **14a** und **15a** erfüllen: Sie sind weit weniger calcämisch als Vitamin D₃ [36]. Die Endoperoxide **14c** und **15c** wurden bereits auf ihre Differenzierung von Leukämiezellen (HL-60) getestet [37]. Wie in einer späteren Arbeit nachgewiesen wurde, waren für die Wirkung jedoch nicht die Endoperoxide, sondern deren Folgeprodukt verantwortlich [38]. Auf ihre NGF induzierende Eigenschaft wurde noch keine der bisher bekannten Verbindungen untersucht. Neben den Vitamin D-Derivaten aus Schema 1 sind aber noch eine Reihe weiterer Primärverbindungen zu erwarten (vgl. Schema 2 und Schema 3).

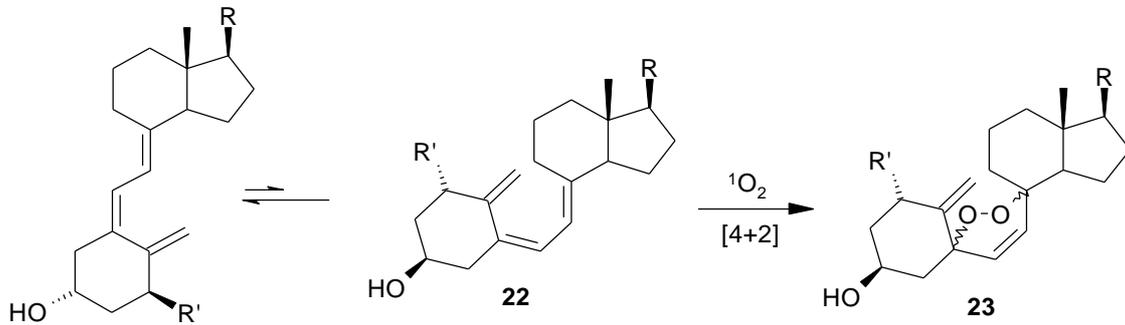
Schema 2



Für eine En-Reaktion kommt nicht nur das Kohlenstoffatom C-6 in Frage, wodurch die Hydroperoxide **12** und **13** gebildet werden, sondern ebenfalls C-7 (**18** bis **21**) und C-19 (**16** und **17**). Schließlich konnten Gielen und Mitarbeiter zeigen, daß auch eine Isomerisierung der 5,6-Doppelbindung eintreten kann [34], womit sich die Anzahl an möglichen Produkten weiter vergrößert. Man beachte außerdem, daß sehr oft Paare von Diastereomeren entstehen. Wie

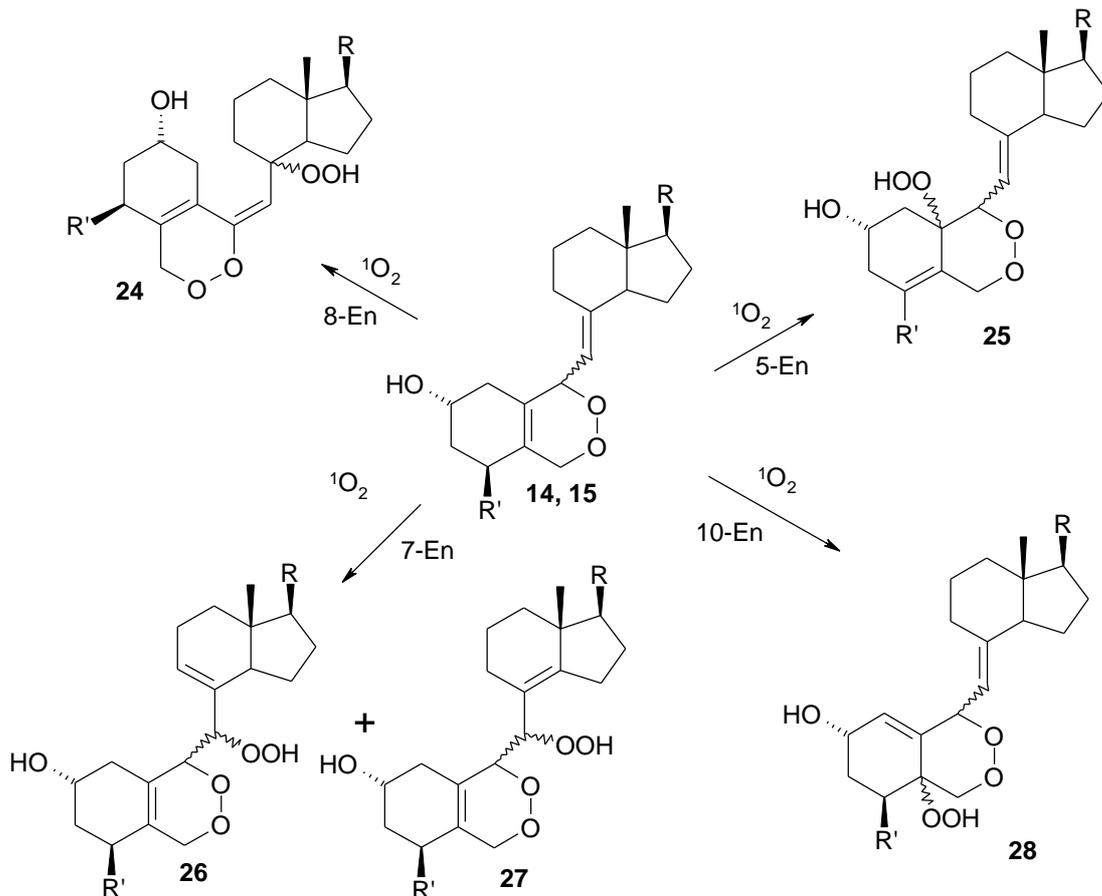
Schema 3 verdeutlicht, könnten neben den Endoperoxiden **14** und **15** zudem die Diastereomere **23** auftreten.

Schema 3



Die Anzahl an Produkten kann sehr einfach durch die Reaktionszeit gesteuert werden. Bei längeren Reaktionszeiten sollten die gezeigten Primärverbindungen ein bis zwei weitere Äquivalente an Singuletsauerstoff verbrauchen.

Schema 4



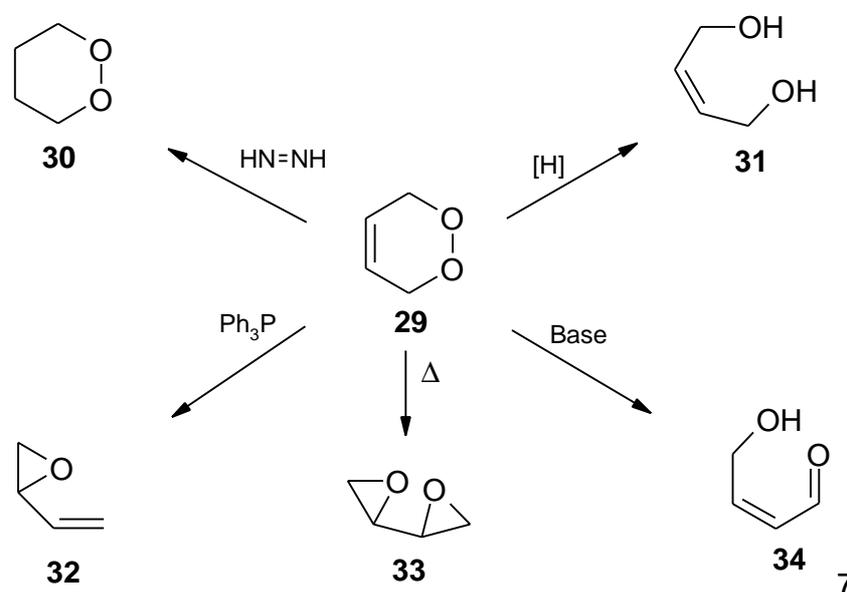
Eine kleine Auswahl der möglichen Folgeprodukte zeigt Schema 4. Durch eine anschließende En-Reaktion würden allein aus den Endoperoxiden **14** und **15**

achtzehn (!) neue Produkte entstehen. Zu einem geringen Prozentsatz wird auch Triplett-Sauerstoff im Reaktionsgemisch vorkommen. Es kann daher zusätzlich mit gewöhnlichen Oxidationsprodukten gerechnet werden.

Die vorgestellte Methode könnte daher dazu beitragen, den durch das Hochdurchsatz-Screening enorm gestiegenen Bedarf an biologisch attraktiven Testsubstanzen zu decken. Die Wahrscheinlichkeit eine wirksame Verbindung zu finden steigt aber nicht nur mit der Anzahl an bereitgestellten Substanzen, sondern auch mit deren struktureller Diversität. Dies ist ein generelles Problem der kombinatorischen Synthese. Zwar können durch diese sehr viele Verbindungen dargestellt werden, die Verschiedenartigkeit der Verbindungen ist aber meist nur gering [39].

Die Endo- und Hydroperoxide aus der Reaktion von Vitamin D mit Singulett-Sauerstoff lassen sich dagegen durch einfache chemische Reaktionen in eine Vielzahl von weiteren Verbindungen umwandeln [40], womit eine enorme Breite an Strukturvariationen zugänglich wird (vgl. Schema 5).

Schema 5



Ohne die Peroxidbindung zu öffnen kann aus dem ungesättigten Endoperoxid **29** durch Einwirkung von Diimid das gesättigte Endoperoxid **30** erhalten werden [41]. Die Peroxidbindung lässt sich dagegen selektiv mit Thioharnstoff oder Natriumsulfit hydrieren [42], wodurch man zu dem 1,4-Diol **31** gelangt. Eine basenkatalysierte Ringöffnung führt zu 4-Hydroxy-carbonylverbindungen

34 [43]. Durch thermische Umlagerung lassen sich Bisepoxide darstellen (**33**) [44] und durch Reaktion mit Triphenylphosphin kann die Endoperoxidfunktion deoxygeniert werden (**32**) [45].

Für den Einsatz des reaktiven und kurzlebigen Singulett-Sauerstoffs zur Erzeugung einer Substanzbibliothek spricht nicht nur die zu erwartende Produktvielfalt (Quantität) und Diversität (Qualität) der Verbindungen, sondern ebenfalls die Tatsache, daß Singulett-Sauerstoff auch physiologisch nach dem Russel-Mechanismus aus zwei Peroxyradikalen gebildet werden kann [46]. Es ist demnach durchaus denkbar, daß auch in vivo die eine oder andere Substanz, hervorgegangen aus einer solchen Reaktion von Vitamin D₃ mit Singulett-Sauerstoff, eine Rolle spielt.

Die resultierende Substanzbibliothek kann durch präparative **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography so weit in Unterbibliotheken aufgetrennt werden, daß am Ende zahlreiche Einzelverbindungen vorliegen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses Verfahren erstmals anzuwenden und auf seine Leistungsfähigkeit hin zu überprüfen.

Während bei einer gezielten Derivatisierung die Reaktionsprodukte weitgehend feststehen, können die zahlreichen Produkte aus der Reaktion von Vitamin D₃ mit Singulett-Sauerstoff nur in einem sehr weiten Bereich vorbestimmt werden. Deshalb mußte ein erheblicher Teil der Arbeit für die Strukturaufklärung der erhaltenen Verbindungen aufgebracht werden.

Weiterhin mußte für die Testung der Sauerstoffderivate ein Zellsystem etabliert werden, für das zunächst die Inkubationszeit und Konzentration an 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (**8**) ermittelt werden mußte, die zu einer maximalen Ausschüttung von NGF führt. Die so erhaltenen Testparameter mußten dann auf die charakterisierten Verbindungen übertragen werden, um deren NGF-induzierendes Potential zu ermitteln.

Neben der Isolierung und Charakterisierung neuer Vitamin D₃-Sauerstoff-derivate war die Feststellung der strukturellen Voraussetzungen die zur NGF-Induktion führen wichtig. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollten daher auch gezielte Derivatisierungen an Vitamin D₃ durchgeführt werden.

3. Eigenschaften von Singulett- und Triplett-Sauerstoff

Bevor auf die Auswahl der Reaktionsbedingungen eingegangen wird, sollen zunächst die verschiedenen Eigenschaften von Singulett- und Triplett-Sauerstoff besprochen werden.

Die Elektronenkonfiguration von Sauerstoff im Grundzustand ist $(1\sigma_g)^2 (1\sigma_u)^2 (2\sigma_g)^2 (2\sigma_u)^2 (3\sigma_g)^2 (1\pi_u)^4 (1\pi_g)^2$. Die Besetzung der Orbitale entspricht der Hundschen Regel. In den beiden antibindenden π -Orbitalen befindet sich damit jeweils nur ein Elektron. Diese besitzen einen parallelen Spin und sind dafür verantwortlich, daß der paramagnetische Triplett-Sauerstoff vorwiegend Radikalreaktionen in Allylstellung eingeht. Im Gegensatz dazu steht der diamagnetische Singulett-Sauerstoff 1O_2 . Mit einer Spinmultiplizität von 1 verfügt er über zwei Elektronen mit antiparallelem Spin, welche sich ebenfalls im π^* -Molekülorbital befinden. Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Elektronenanordnungen und Energieniveaus.

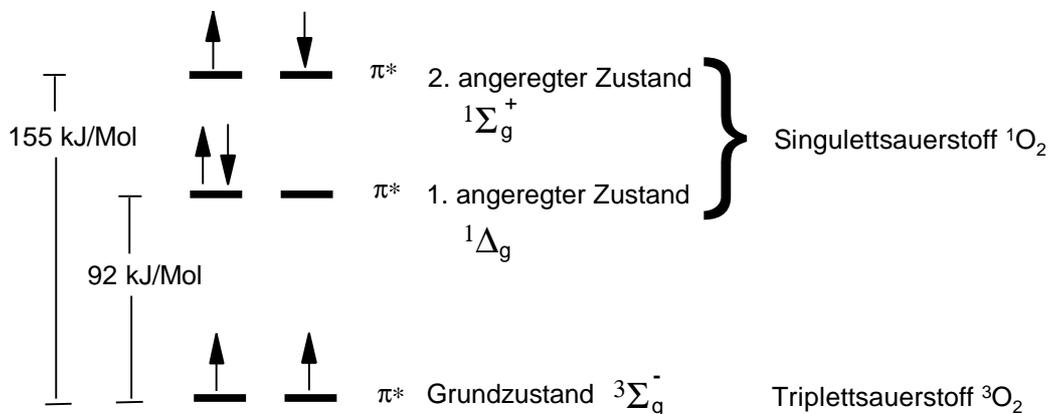


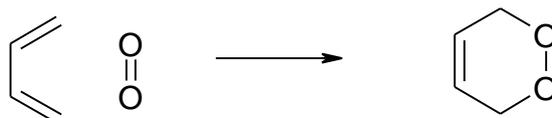
Abbildung 1: Elektronenanordnung und Energieniveaus von Singulett- und Triplett-Sauerstoff

Der Zustand des Singulett-Sauerstoff ist gegenüber dem des Triplett-Sauerstoff nur metastabil. In der Gasphase kann die Lebenszeit von Singulett-Sauerstoff im ersten angeregten Zustand bis zu 45 min betragen [47]. In Lösung wird seine Lebensdauer erheblich verkürzt. Für den $^1\Delta_g^+$ -Zustand variiert sie je nach Lösungsmittel zwischen 2 und 1000 μ s [48]. Eine eingehende Beschreibung der einzelnen Wellenfunktionen wurde bereits 1979 von Kasha und Brabham

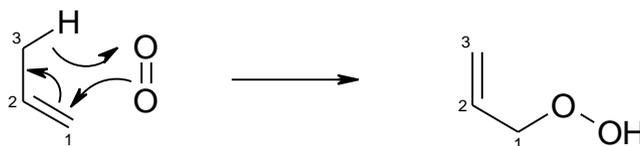
veröffentlicht [49]. Das unterschiedliche Reaktionsverhalten von Sauerstoff im Grund- und 1. angeregten Zustand erklärt jedoch auch Abbildung 1: $^1\Delta_g$ -Singulett-Sauerstoff besitzt Doppelbindungscharakter.

3.1 Reaktionsmöglichkeiten von Singulett- und Triplett-Sauerstoff

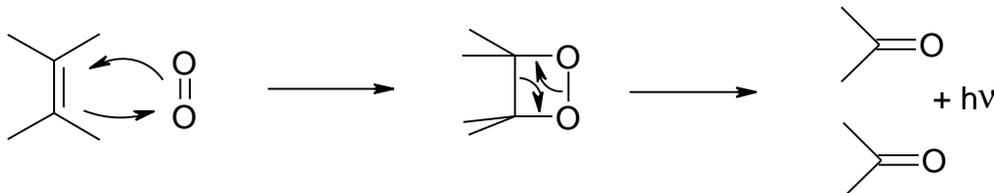
Aufgrund seines Doppelbindungscharakters ist Singulett-Sauerstoff befähigt, in einer $[\pi 4_s + \pi 2_s]$ Cycloaddition Endoperoxide zu bilden.



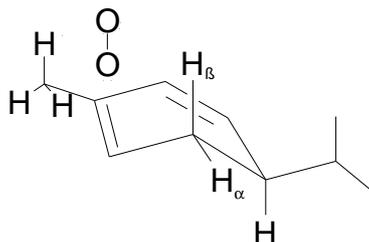
In einer En-ähnlichen Reaktion mit Olefinen, die in Allylstellung Protonen besitzen, kann es aber auch zur Hydroperoxidbildung kommen.



Bei Verbindungen, die zwar über elektronenreiche Doppelbindungen, jedoch nicht über ein Proton in Allylstellung verfügen, ist zudem die Reaktion zu Dioxetanen beobachtet worden.

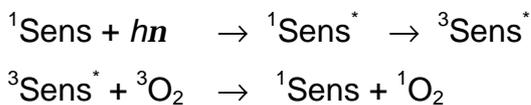


Diese sollte als $[\pi 2_a + \pi 2_s]$ -Cycloaddition ablaufen. Das Primärprodukt ist nur in Ausnahmefällen stabil [50]. In der Regel zerfällt es unter Chemolumineszenz in die entsprechenden Carbonylverbindungen. Als gemeinsame Zwischenstufe bei der Bildung von Endo- und Hydroperoxiden postulierten *Matusch* und *Schmidt* 1988 den folgenden Annäherungskomplex [51] :



3.2 Erzeugung von Singulett-sauerstoff

Zur Erzeugung von Singulett-sauerstoff eignen sich zahlreiche Verfahren wie der Zerfall von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Hypochlorit [52,53], der Einsatz von Persäuren [54], oder der thermische Zerfall von Endoperoxiden [55]. Gegenüber den genannten chemischen Methoden wird jedoch die Photosensibilisierung bevorzugt [56]. Dabei wird zunächst ein geeigneter Farbstoff (Sens) in Lösung durch Lichtabsorption und folgendes 'Intersystem Crossing' in einen angeregten Triplett-Zustand gebracht. Bei dem darauffolgenden Stoß mit Triplett-sauerstoff kommt es durch Energieübertragung unter Erhalt des Gesamtspins zur Bildung von Singulett-sauerstoff (Spinerhaltungsregel).



Eine Umsetzung mit auf diese Weise erzeugtem Singulett-sauerstoff liefert im allgemeinen die gleiche Produktverteilung wie unter Verwendung von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Hypochlorit [57]. Letztere Reaktion verläuft jedoch bei unreaktiven Edukten zunehmend radikalisch [58]. Dies erklärt, warum *Bland* und *Craney* 1974 nach der Umsetzung von Vitamin D mit Wasserstoffperoxid/Hypochlorit keines der erwarteten Endoperoxide aus Schema 1 erhalten konnten [59]. Hingegen zeigten *Gielen* [34] sowie *Yamada* [35], daß es durch die photosensibilisierte Oxidation von Vitamin D zu den gewünschten Produkten kommt.

4. Auswahl der Reaktionsbedingungen

Aufgrund der von *Bland* und *Craney* [59] geschilderten Schwierigkeiten bei der thermisch kontrollierten Erzeugung von Singulett-sauerstoff und den positiven Erfahrungen von *Matusch* und *Schmidt* [51] empfahl sich die Photosensibilisierung zur Erzeugung von Singulett-sauerstoff. Im Folgenden mußte jedoch noch eine Auswahl der Reaktionsbedingungen erfolgen.

4.1 Auswahl des Sensibilisators

Als Sensibilisatoren wurden erfolgreich Bengalrosa (RB) und Tetraphenylporphin (TPP) eingesetzt [35]. Nach den Erfahrungen von *Schmidt* erweist sich TPP jedoch als weniger geeignet [60]. Der Farbstoff neigt bei längerer Belichtung dazu, auszubleichen und seine Retentionszeit liegt auf Kieselgelsäulen in der Größenordnung von apolaren Reaktionsprodukten. Da nur lipophile Substanzen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können sind aber gerade diese Reaktionsprodukte von größerem Interesse.

Im Gegensatz dazu zeigt der rote Farbstoff Bengalrosa (3',4',5',6'-Tetrachlor-2,4,5,7,-tetraiodfluorescein Dinatriumsalz) kein Ausbleichen. Er kann vom Reaktionsgemisch leicht durch Ausschütteln mit apolaren Lösungsmitteln entfernt werden, wobei er in der polaren Phase verbleibt. Reste des Farbstoffes können bei der Chromatografie auf Kieselgel zudem mit mittelpolaren mobilen Phasen am Start zurückgehalten werden. Bei Einsatz von polymergebundenem Bengalrosa [61] ist man zwar frei in der Wahl des Lösungsmittels und kann den Farbstoff durch Filtration leicht abtrennen, jedoch kann man bei Lösungsmitteln mit hoher Dichte (wie Dichlormethan) nur schwer eine homogene Suspension erhalten. Außerdem kann es auch hier zum Ausbleichen des Farbstoffes kommen. Damit fiel die Wahl auf nicht polymergebundenes Bengalrosa als Sensibilisator.

4.2 Auswahl der Lichtquelle

Hervorgerufen durch die kurzwellige Strahlung kommt es bei Quecksilber-Hoch- und Mitteldruckdampfampen oftmals zu photochemischen Folgereaktionen. Als Lichtquelle wurde daher eine Hochdrucknatriumdampflampe eingesetzt. Diese sendet bis auf eine schwache Restemission im Bereich von 400-580 nm lediglich Licht der Wellenlänge 589 nm aus.

4.3 Auswahl des Lösungsmittels

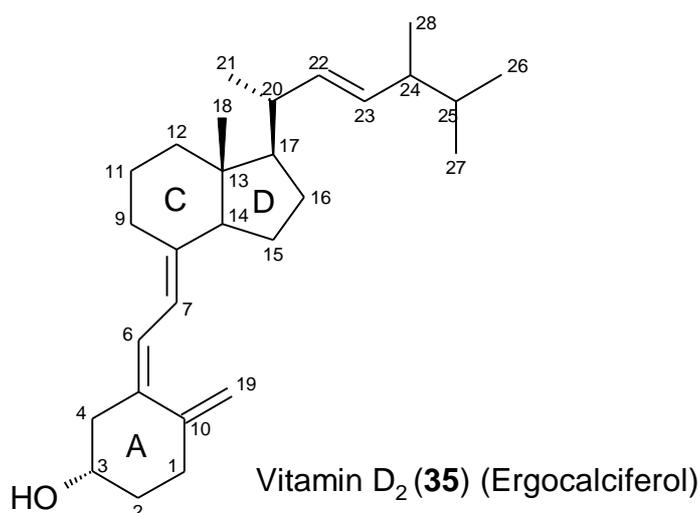
Wie bereits erwähnt, hat das Lösungsmittel einen erheblichen Einfluß auf die Lebensdauer von Singulett-sauerstoff. Die Singulett-sauerstoffaufnahme pro Molekül läßt sich über die Reaktionszeit beeinflussen. In Vorversuchen wurde

ein geeignetes Lösungsmittel ermittelt. Gleichzeitig konnten dabei auch die Überlegungen bezüglich des Sensibilisators und der Lichtquelle überprüft werden.

Um abzusichern, daß die später isolierten Produkte tatsächlich aus der Reaktion von Vitamin D₃ (**9**) mit Singulett-Sauerstoff hervorgegangen waren, sind in jedem Lösungsmittel Blindversuche durchgeführt worden. Für diese wurden identische Reaktionsbedingungen gewählt, lediglich die Natriumdampflampe war ausgeschaltet. Da Triplett-Sauerstoff wesentlich langsamer als Singulett-Sauerstoff reagiert [62], konnten dessen Produkte auch nach einer Reaktionszeit von 90 min nur in Spuren isoliert werden.

5. Vorversuche zur Darstellung der Substanzbibliothek

Die Umsetzung der Ausgangsprodukte erfolgte in einer Photobelichtungsapparatur. Aus den in Kapitel 4 genannten Gründen wurden als Lichtquelle eine Natriumdampflampe und Bengalrosa als Sensibilisator eingesetzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit analytischer HPLC. Um die Anzahl an Folgeprodukten zunächst niedrig zu halten, wurde die Reaktion sofort beendet sobald im Chromatogramm kein Ausgangsprodukt mehr zu erkennen war. Zur Darstellung von Folgeprodukten wurde die Reaktionszeit schrittweise verlängert.



Um für die biologischen Tests eine größere Anzahl an Verbindungen zu erhalten, wurde neben Vitamin D₃ (**9**) auch das in der Seitenkette modifizierte

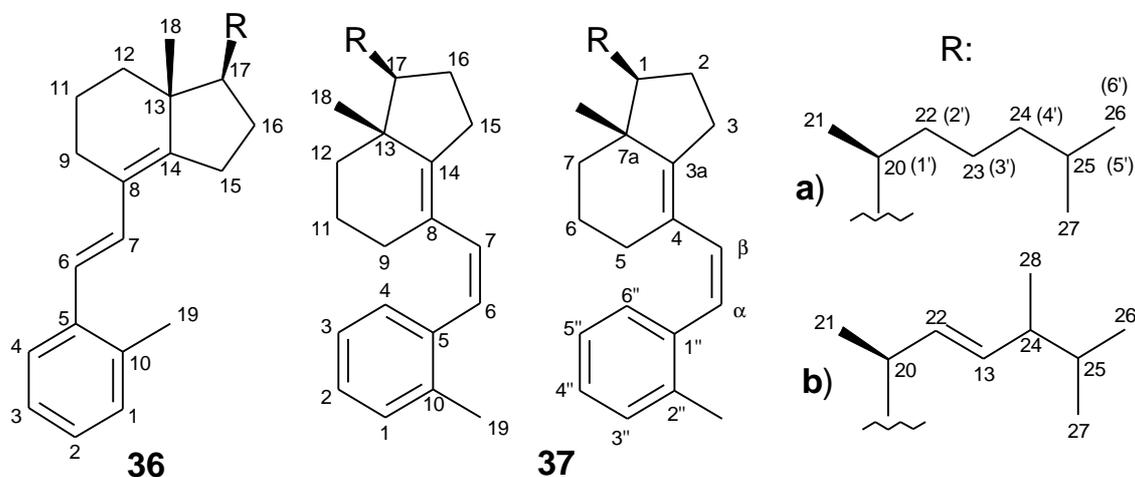
Vitamin D₂ (**35**) eingesetzt. Als aprotisches Lösungsmittel wurde Dichlormethan, als protisches Ethanol verwendet.

5.1 Photosensibilisierte Oxidation von Vitamin D in Dichlormethan

Bei der photosensibilisierten Oxidation von Vitamin D₃ in Dichlormethan erhielten Yamada und Mitarbeitern die diastereomeren Endoperoxide **14a** und **15a** in Ausbeuten von 29% (**14a**) und 22% (**15a**). Die Hydroperoxide **12a** und **13a** konnten sie zu 7% (**12a**) und 11% (**13a**) erhalten [35]. Trotz mehrfacher Versuche konnte das Ergebnis in Dichlormethan nicht reproduziert werden. HPLC-MS-Versuche zeigten, daß die beschriebenen Produkte (**12** bis **15**) nicht, oder nur in Spuren entstanden waren. Stattdessen fielen aber während der chromatographischen Untersuchungen auf Umkehrphase zwei lipophile Verbindungen bei hohen Retentionszeiten auf. Durch präparative Trennung (**P1**) konnten die Verbindungen **36** und **37** isoliert werden. Die Ausbeuten betragen 12% (**36**) und 15% (**37**) und lagen damit über den von Yamada und Mitarbeitern angegebenen Ausbeuten an Hydroperoxiden.

5.1.1 Identifizierung der Hauptprodukte

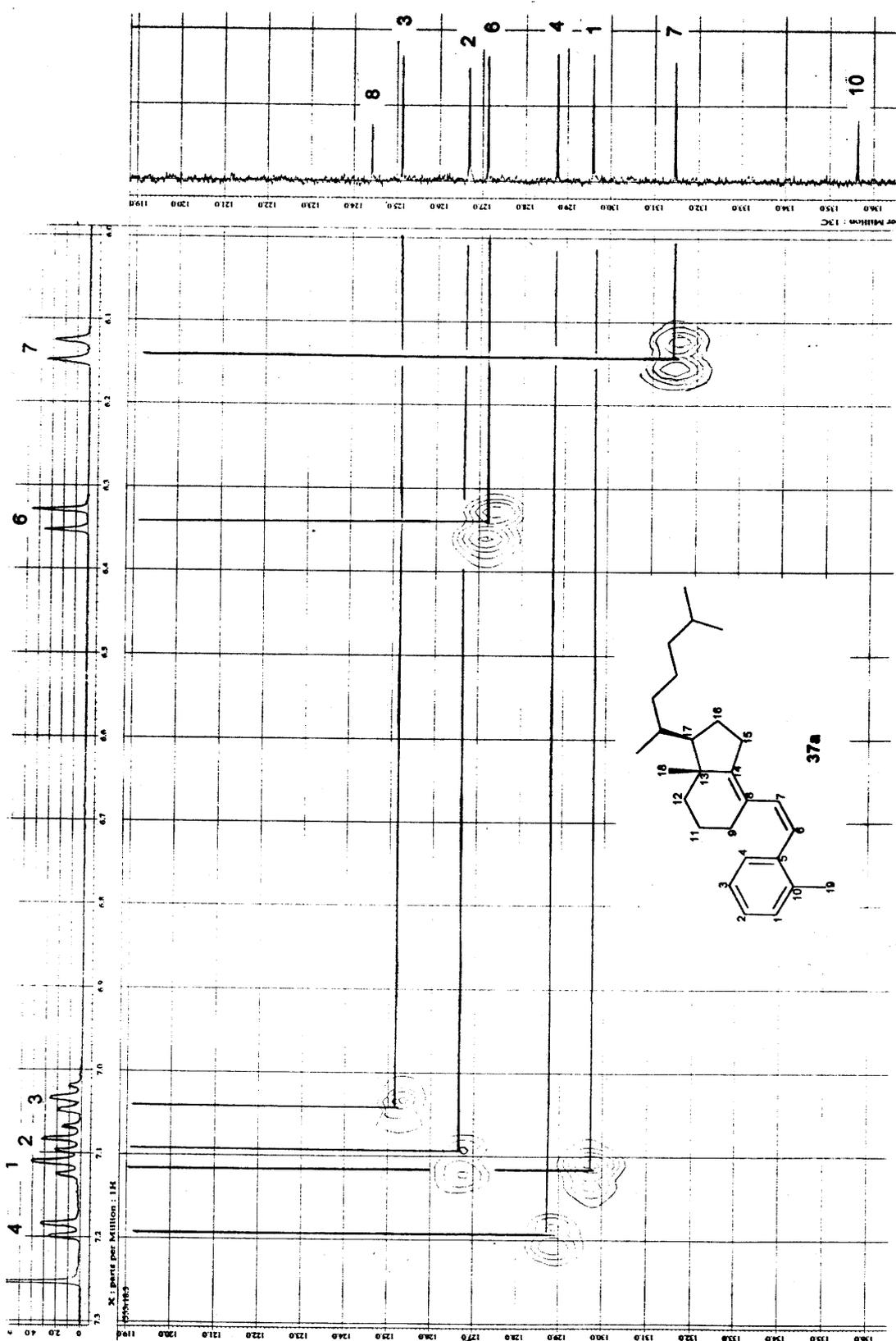
Um einen Vergleich mit den Spektren von Vitamin D₂ (**35**) bzw. Vitamin D₃ (**9**) zu ermöglichen, wurde eine entsprechende Bezeichnung der Kohlenstoffatome gewählt. Die korrekten Bezeichnungen finden sich im Experimentellen Teil und sind für **37a** angegeben.



In den EI-Massenspektren der Derivate des Vitamin D₃ **36a** und **37a** tritt das Molekülion bei m/z 364 auf. Damit konnte es sich nicht um Verbindungen aus Schema 1 handeln.

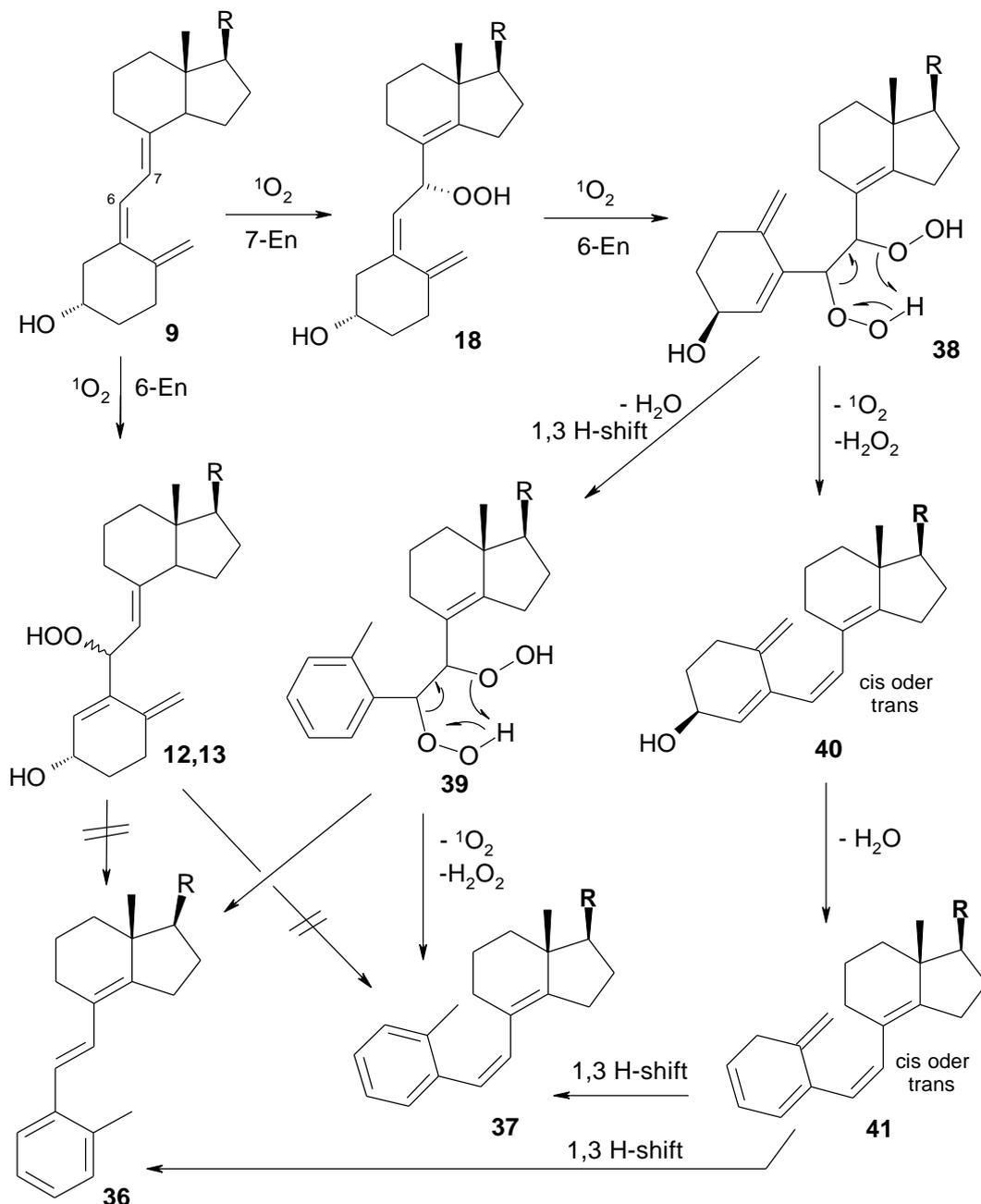
Die Auswertung der NMR Spektren zeigte, daß beide Verbindungen ein aromatisches System besitzen (vgl. Abbildung 2 S. 18). Ein zusätzliches Singulett im Protonenspektrum, welches bei beiden Verbindungen um 2.3 ppm auftritt und ein Integral von drei aufweist, deutet auf einen Methylsubstituenten am aromatischen System hin. Im Ausgangsmolekül Vitamin D₃ (**9**) bietet das Ringsystem A die einzige Möglichkeit zur Entstehung eines methylsubstituierten Aromaten. Dafür sprechen ebenfalls die Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektroskopie, wonach **36a** und **37a** die Summenformel C₂₇H₄₀ besitzen. Damit enthalten sie keinen Sauerstoff mehr und haben somit die Hydroxylgruppe in Position 3 verloren. Im Vergleich zu **9** ist die Anzahl an Kohlenstoffsignalen im olefinischen Bereich um jeweils vier erhöht, womit zwei weitere Doppelbindungen in jedem Molekül vorhanden sein müssen.

Im olefinischen Bereich des Protonenspektrums sind die Dubletts eines AB-Systems zu erkennen. Die Kopplungskonstante von 12.1 Hz der Verbindung **37a** deutet auf eine cis-verknüpfte Doppelbindung hin. Das entsprechende AB-System von **36a** zeigt eine Kopplungskonstante von 16.0 Hz und ist damit charakteristisch für eine trans-Kopplung. Infolge der neu entstandene Doppelbindung im Ring C erfährt die Methylgruppe in Position 13 eine Verschiebung zu tiefem Feld. Während deren Signal im ¹H-NMR-Spektrum von Vitamin D₃ bei 0.52 ppm liegt, tritt es hier bei 0.94 ppm (**36a**) bzw. 0.80 ppm (**37a**) auf. In den Spektren der Derivate des Ergocalciferols **36b** und **37b** resultieren Unterschiede zu **36a** und **37a** lediglich aus den Veränderungen in der Seitenkette. Die sp²-hybridisierten Kohlenstoffatome C-22 und C-23 treten im breitbandenkoppelten ¹³C-NMR bei 132 ppm (C-22) und 135 ppm (C-23) auf. Im ¹H-NMR-Spektrum sind die entsprechenden Protonen bei 5.2 ppm als Multiplett sichtbar. Ebenfalls deutlich zu erkennen ist das Dublett der zusätzlichen Methylgruppe in Position 24 (0.9 ppm).

Abbildung 2: Ausschnitt aus dem HMQC-Spektrum von **37a** (500 MHz/ CDCl_3)

Als Produkte einer photosensibilisierten Oxidation sind **36** und **37** äußerst ungewöhnlich. Durch die Blindversuche wurde bereits gezeigt, daß die Verbindungen auf keinen Fall aus einer radikalischen Reaktion mit Triplett-sauerstoff hervorgegangen sind. Als Salz ist Bengalrosa in Dichlormethan schlecht löslich. In der Praxis erweisen sich nicht gelöste Farbstoffteilchen oft als Singulett-sauerstoff-Quencher [61]. Um jeden Zweifel zu beseitigen wurde die Reaktion daher unter Zusatz von Radikalfängern wiederholt: Auch unter diesen Bedingungen entstehen **36** und **37**, weshalb die Verbindungen aus einer Reaktion mit Singulett-sauerstoff hervorgegangen sein müssen.

Schema 6



Schema 6 zeigt den möglichen Bildungsmechanismus. Infolge einer 7-En-Reaktion kann aus der Ausgangsverbindungen **9** zunächst das Hydroperoxid **18** entstehen. Dieses reagiert mit einem weiteren Equivalent Singulett-sauerstoff zu dem Dihydroperoxid **38**. Über einen sechsgliedrigen Übergangszustand sollte in einer konzertierten Reaktion Wasserstoffperoxid und Singulett-sauerstoff abgespalten werden, womit der Aufbau der 6,7-Doppelbindung erklärt wird. Liegt **38** in der 6R-Konfiguration vor, entsteht die cis-Verbindung **37**. Aus der 6S-Konfiguration von **38** resultiert dagegen die trans-Verbindung **36**. Darüber hinaus stehen beide Produkte im Gleichgewicht zueinander, was durch die Bestrahlung von Lösungen von **36** und **37** in Dichlormethan mit einer Natriumdampflampe gezeigt werden konnte. Bereits nach fünf Minuten kann das jeweils andere Isomer chromatographisch detektiert werden.

Im Verlauf seiner Arbeit an Reaktions- und Folgeprodukten aus der Photooxidation von p-Menthadienen konnte *Schmidt* 1987 lediglich ein Produkt isolieren, bei dem sich zwei Hydroperoxidfunktionen in direkter Nachbarschaft zueinander befanden [63]. Die Rotation um die Bindung zwischen den Hydroperoxidfunktionen war bei diesem Produkt jedoch nicht möglich. Bei **38** und **39** ist diese Rotation dagegen kaum eingeschränkt, was mit den Verbindungen **36** und **37** letztlich zu den ersten Singulett-sauerstoffprodukten ohne Sauerstoff im Molekül führte.

Das aromatische System kann durch Dehydrierung und darauffolgende 1,3-H-Verschiebung gebildet werden. Dies ist sowohl vor, als auch nach der Eliminierung von Wasserstoffperoxid und Singulett-sauerstoff möglich (vgl. Schema 6). Die Ergebnisse der HPLC-MS Untersuchungen (System **A1**) deuten jedoch an, daß zunächst die 5,6-Doppelbindung entsteht und erst dann die Aromatisierung erfolgt. Im Produktgemisch der photosensibilisierten Oxidation von Vitamin D₃ (**9**) in Dichlormethan konnte eindeutig eine Substanz mit einem Molekulargewicht von 382 g/mol nachgewiesen werden, welches dem von Verbindung **40** entspricht. Im Massenspektrum dieser Verbindung treten zudem für Vitamin D₃-Derivate charakteristische Fragmentationen auf. Abbildung 3 zeigt neben dem Verlauf der Masse $m/z = 382$ auch den Verlauf

der Masse $m/z = 364$ (Verbindungen **36a** und **37a**) sowie das Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC).

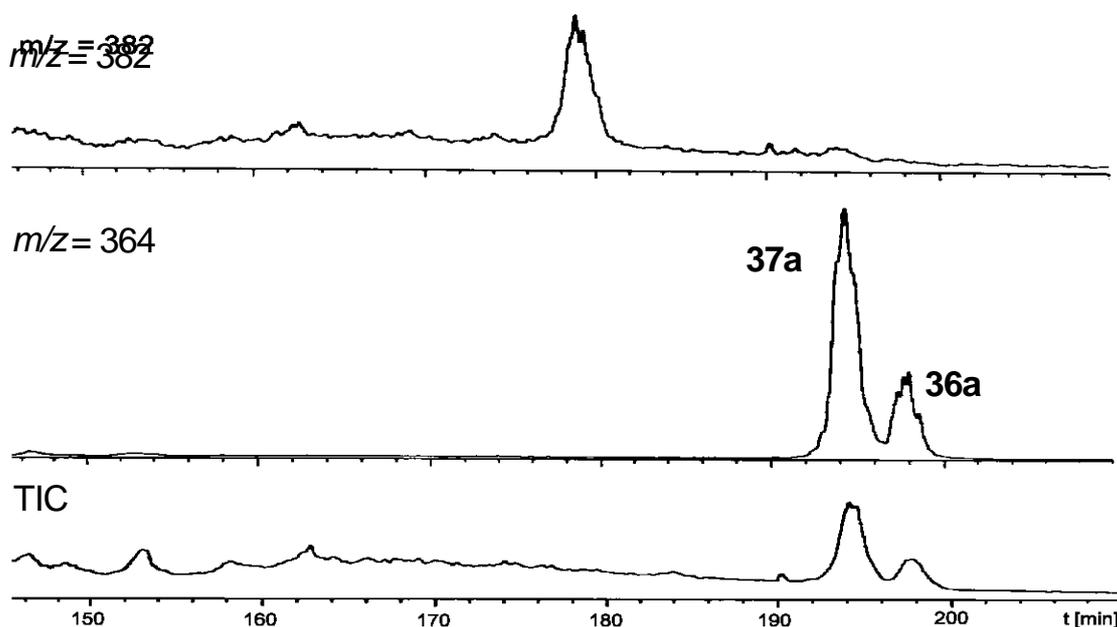


Abbildung 3: Ausschnitt aus dem HPLC-MS-Lauf der Produkte aus der photosensibilisierten Oxidation von **9** in Dichlormethan

Beim Übergang von **38** zu **40** oder **39** zu **36** und **37** wird Singulett-Sauerstoff freigesetzt, der unter Lichtemission ($\lambda = 633$ und 703 nm [64]) in den Grundzustand zurückkehrt. Aufgrund der langen Nachglühzeit der Natriumdampflampe konnte dieses charakteristische, rote Leuchten jedoch nicht detektiert werden.

Die Reaktion der diastereomeren Hydroperoxide **12** und **13** mit Singulett-Sauerstoff führte nicht zu Verbindung **36** oder **37**. Dies untermauert den vorgeschlagenen Reaktionsweg und erklärt zudem weshalb die Verbindungen **12** und **13** von *Yamada* und Mitarbeitern isoliert werden konnten. Auch verwendete diese Forschergruppe eine Halogenlampe. Bei ansonsten identischen Reaktionsbedingungen muß daher die Lichtquelle für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. Eine Halogenlampe strahlt ein sehr viel breiteres Spektrum als eine Natriumdampflampe aus (vgl. Kapitel 4.2). Offenbar wurde die Bildung von **36** und **37** erst durch die höhere Selektivität der verwendeten Lichtquelle möglich.

5.2 Photosensibilisierte Oxidation von Vitamin D in Ethanol

In Ethanol führte die photosensibilisierte Oxidation der Ausgangsverbindungen zu den genannten Singulett-Sauerstoff-Produkten aus Schema 1. Die Ausbeute der Endperoxide des Vitamin D₃ betrug 28% (**14a**) und 31% (**15a**). Die Hydroperoxide konnten in Mengen von 6% (**12a**) und 10% (**13a**) erhalten werden. Die Ausbeuten der entsprechenden Vitamin D₂-Verbindungen **12b** bis **15b** liegen im gleichen Bereich.

6. Darstellung der Substanzbibliothek

Aufgrund der einleitenden Betrachtungen erschienen die zu erwartenden neuen Produkte, sowie die Folgeprodukte von **12** bis **15** aus der photosensibilisierten Oxidation von **9** in Ethanol, als die aussichtsreicheren Kandidaten für eine biologische Testung. Unter Verwendung einer Natriumdampfampe und Bengalrosa als Sensibilisator wurde die Darstellung der Substanzbibliothek daher in Ethanol vorgenommen. Es wurden 5g Vitamin D₃ (**9**) eingesetzt. Sollte die spätere Testung der Substanzen ergeben, daß eine der zusätzlichen Hydroxylfunktionen von Calcitriol (**8**) pharmakologisch notwendig ist, so kann diese auch zu einem späteren Zeitpunkt noch durch gezielte chemische Reaktionen eingeführt werden (siehe Kapitel 9). Diese Vorgehensweise wird auch durch den hohen Preis von Calcitriol (**8**) gerechtfertigt. Um die Weiterreaktion der primären Hauptprodukte zu ermöglichen, wurde die Reaktionszeit mit 45 Minuten deutlich länger als in den vorhergehenden Versuchen gewählt. Abbildung 4 zeigt das analytische Chromatogramm der Substanzbibliothek nach beendeter Reaktion und gibt einen Eindruck über die enorme Anzahl der entstandenen Verbindungen.

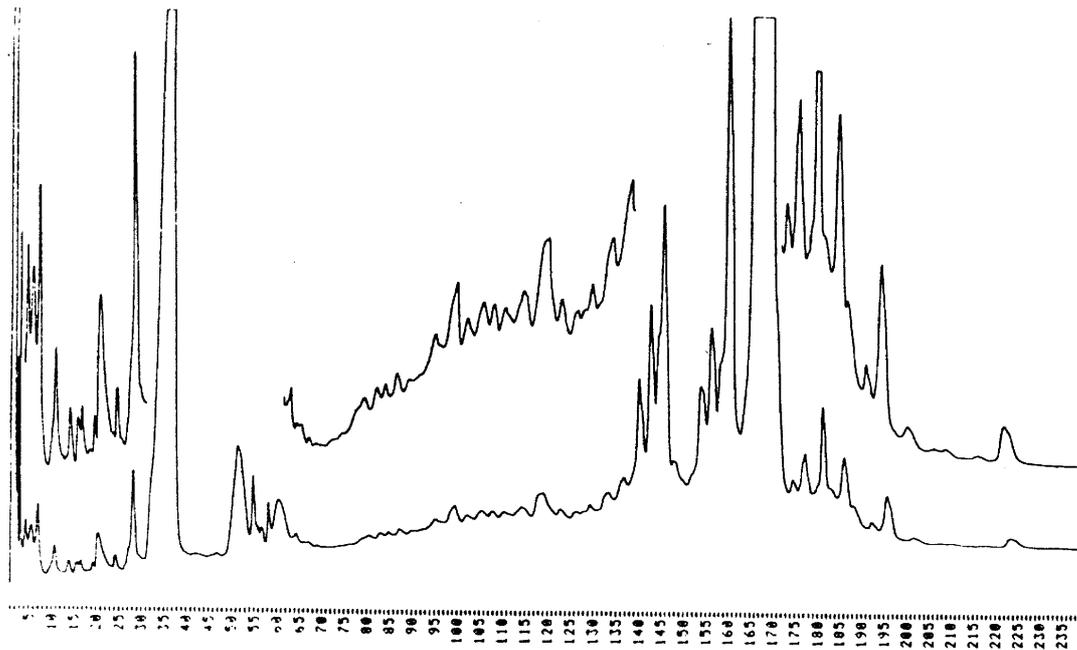


Abbildung 4: Chromatogramm der Substanzbibliothek nach Methode **A1**
(s. Exp. Teil) Detektion: UV 205 nm

Die netto Auswaage betrug 5.60 g, womit auf jedes Molekül Vitamin D₃ (9) statistisch 1.44 Moleküle Singulett-Sauerstoff entfallen waren.

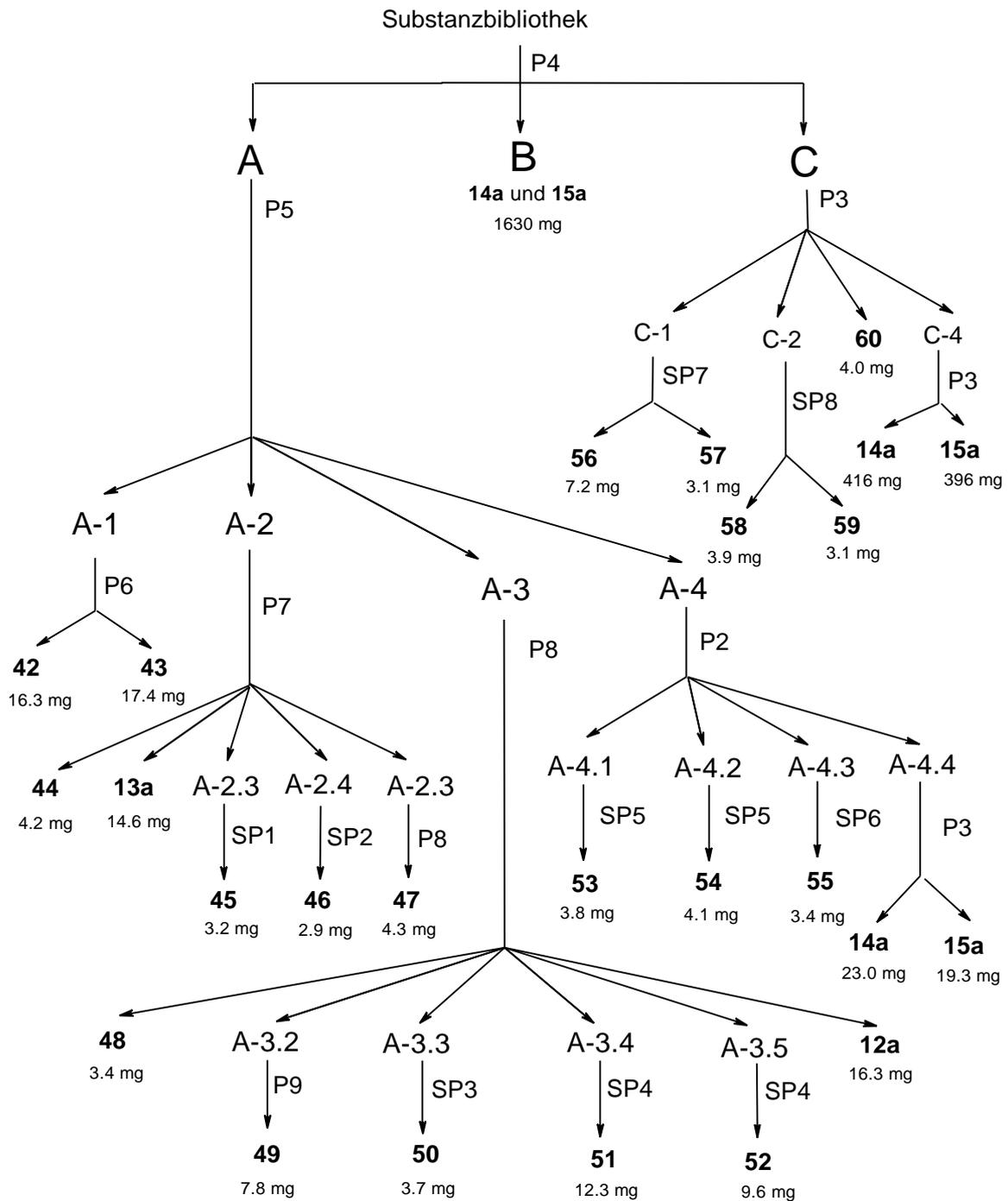
7. Isolierung von Verbindungen aus der photosensibilisierten Oxidation von Vitamin D₃

Bevor auf die Strukturaufklärungen und Bildungsmechanismen der erhaltenen Verbindungen eingegangen wird, soll zunächst die chromatographische Auftrennung der erhaltenen Substanzbibliothek besprochen werden. Um die Diskussion der spektroskopischen Daten zu vereinfachen, wurden die Derivate zur Strukturaufklärung in Gruppen zusammengefaßt.

7.1 Allgemeine Bemerkungen zur Isolierung der erhaltenen Produkte

Schema 7 zeigt die Auftrennung der Substanzbibliothek. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Trennsysteme findet sich im Experimentellen Teil.

Schema 7



Da die Endoperoxide **14a** und **15a** den Hauptanteil der Reaktionsprodukte bildeten, mußten diese zunächst aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt

werden (Trennung **P4** s. Exp. Teil). Abbildung 5 zeigt das erhaltene Chromatogramm sowie die analytische Vorbereitung (Trennung **A2**).

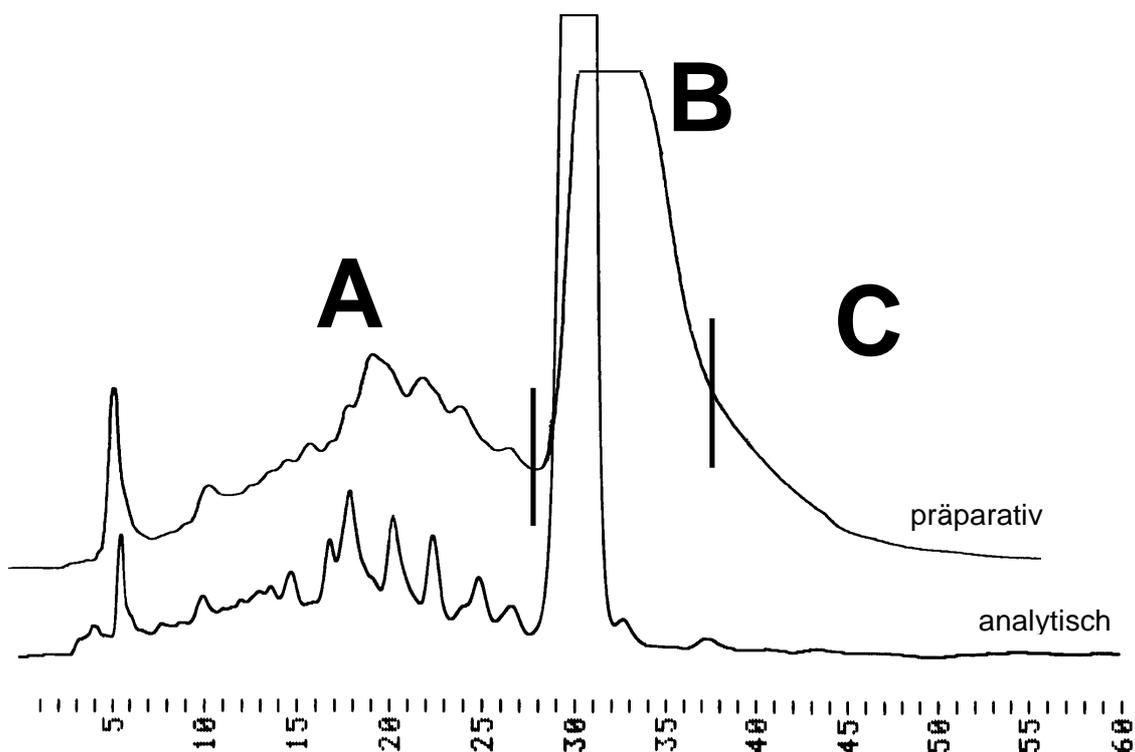


Abbildung 5: Analytische (**A2** s. Exp. Teil) und präparative (**P4**) Vortrennung der Reaktionsprodukte aus der Umsetzung von Vitamin D₃ mit ¹O₂ in Ethanol

Es ist deutlich der dominierende Peak der Endoperoxid-Fraktion B zu erkennen. Durch weitere chromatographische Versuche sowie HPLC-MS Untersuchungen wurde sichergestellt, daß die Fraktion B lediglich die Endoperoxide **14a** und **15a** enthielt.

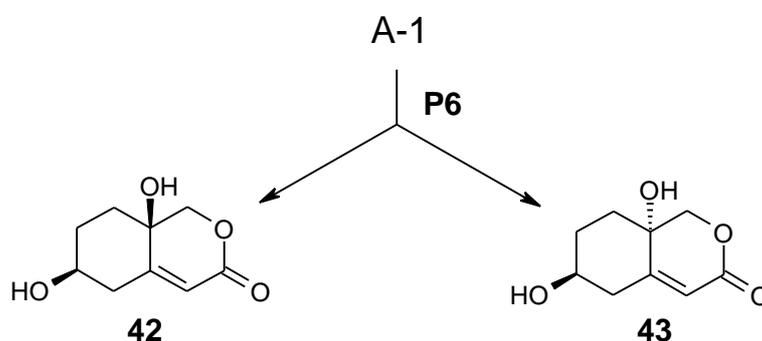
Aufgrund der Vielzahl und der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Verbindungen konnte zunächst nur eine grobe Vortrennung von Fraktion A erfolgen. Unter Verwendung von Trennsystem **P5** wurden die vier Fraktionen A-1 bis A-4 erhalten (vgl. Schema 7).

7.2 Untersuchung der Fraktion A-1

Die bisherigen Trennungen wurden mit Umkehrphasen durchgeführt. Neben erheblichen Mengen des Sensibilisators Bengalrosa sollten in der Fraktion A-1 daher nur die polarsten Verbindungen zu finden sein.

Da aber zum Überwinden der Blut-Hirn-Schranke ein gewisser Mindestgrad an Lipophilie erforderlich ist, konnte angenommen werden, daß die Verbindungen in dieser Fraktion nur von geringem Interesse sind. Um die Annahme zu überprüfen, wurden die beiden Hauptverbindungen isoliert (Schema 8).

Schema 8



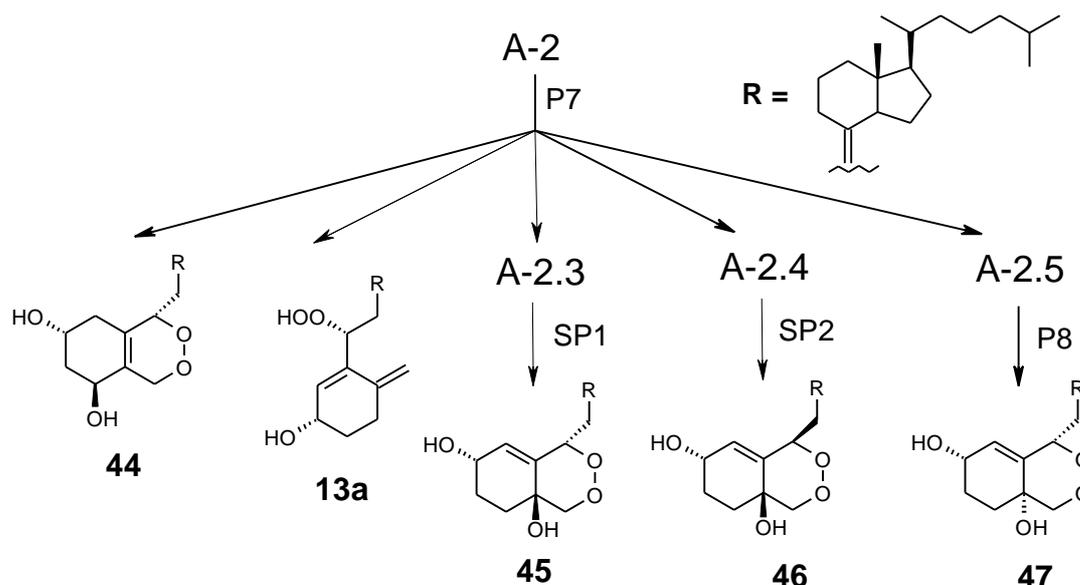
Die in der Literatur bisher noch nicht beschriebenen Verbindungen **42** und **43** sind sehr polar und haben zudem mit dem wirksamen $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (**8**) so gut wie keine strukturellen Gemeinsamkeiten mehr. Für einen späteren biologischen Test waren sie deshalb von untergeordneter Bedeutung. Durch die Methode der HPLC-MS Kopplung konnte gezeigt werden, daß in der Fraktion A-1 noch zahlreiche weitere Verbindungen mit geringem Molekulargewicht enthalten sind. Auch hier konnte von einer geringen Ähnlichkeit zu **8** und einer hohen Polarität ausgegangen werden, eine weitere Untersuchung der Fraktion erschien daher nicht sinnvoll.

7.3 Untersuchung der Fraktion A-2

Um Fraktion A-2 weiter auf einer Umkehrphase chromatographieren zu können mußte der Wassergehalt der mobilen Phase erhöht werden. Es zeigte sich, daß Fraktion A-2 unter diesen Bedingungen, auch in einem sehr großen Volumen, nicht mehr vollständig in Lösung ging. Von einer Filtration mußte Abstand genommen werden, da lipophilere Verbindungen aus der Fraktion

entfernt worden wären. Es wurde daher auf ein Normalphasen-Trennsystem (**P7**) mit Hexan-Isopropanol-Mischung als mobile Phase ausgewichen. Unter Verwendung dieses Trennsystems konnten aus Fraktion A-2 das bereits bekannte 6(R)-Hydroperoxid **13a** [35], die chromatographisch einheitliche Verbindung **44** sowie die Fraktionen A-2.3 bis A-2.5 erhalten werden (vgl. Schema 9).

Schema 9

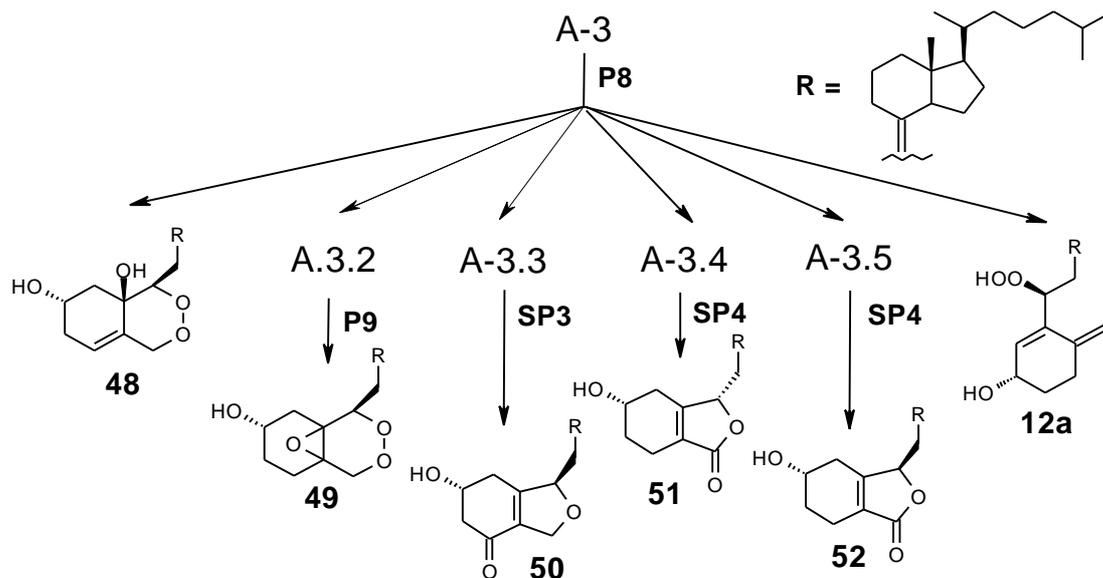


Zur Isolierung der Hauptverbindungen **45** und **46** aus den Fraktionen A-2.3 und A-2.4 konnte eine semipräparative Normalphasensäule eingesetzt werden (vgl. Schema 9). Die Trennung von Verbindung **47** gelang am besten mit präparativer Normalphasenchromatographie. Während von Verbindung **44** bereits wenige NMR-Daten veröffentlicht sind [37], stellen die diastereomeren, hydroxylierten Endoperoxide **45** bis **47** neue Verbindungen dar.

7.4 Untersuchung der Fraktion A-3

Unter Verwendung des Trennsystems **P8** konnten aus der Fraktion A-3 neben dem bereits von *Yamada* und Mitarbeitern charakterisierten 6(S)-Hydroperoxid **12a** [35] und der chromatographisch einheitlichen Verbindung **48** die Fraktionen A-3.2 bis A-3.5 erhalten werden (vgl. Schema 10)

Schema 10

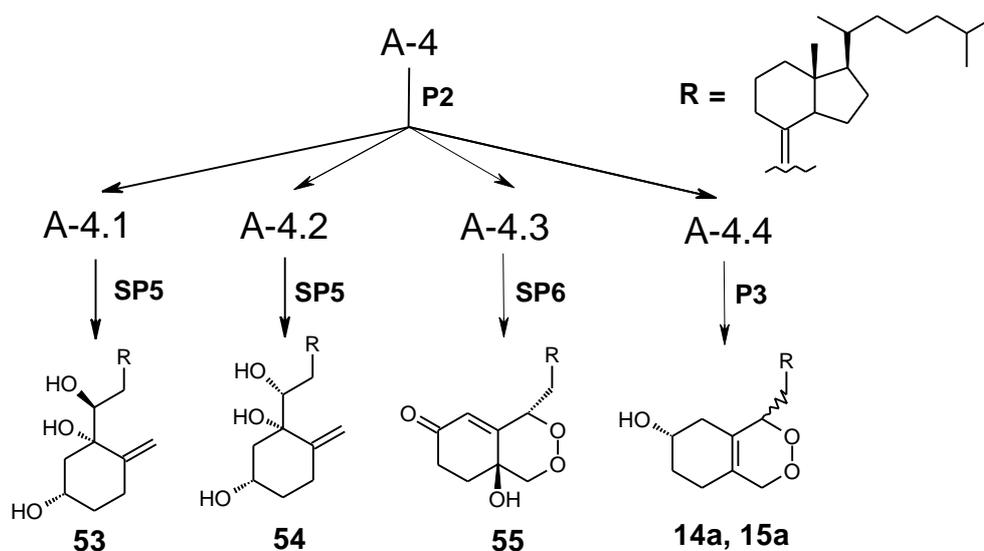


Aus der Fraktionen A.3-2 konnte durch Normalphasenchromatographie (**P9**) das epoxydierte Endoperoxid **49** gewonnen werden. Die Isolierung der Verbindungen **50** bis **52** aus den Fraktionen A-3.3 bis A-3.5 gelang unter semipräparativen Bedingungen auf einer Umkehrphase. Bei **50** bis **52** handelt es sich um Vitamin D₃-Derivate mit einem zusätzlichen Furanringsystem. Im biologischen Test erwies sich Verbindung **50** als wirksamer Induktor des Nervenwachstumsfaktors NGF. Bis auf **12a** [35] werden alle Verbindungen in dieser Arbeit erstmals beschrieben.

7.5 Untersuchung der Fraktion A-4

Zur folgenden Trennung (vgl. Schema 11) wurde das Normalphasen-Trennsystem **P2** verwendet. Es konnten die vier Fraktionen, A-4.1 bis A-4.4 erhalten werden.

Schema 11

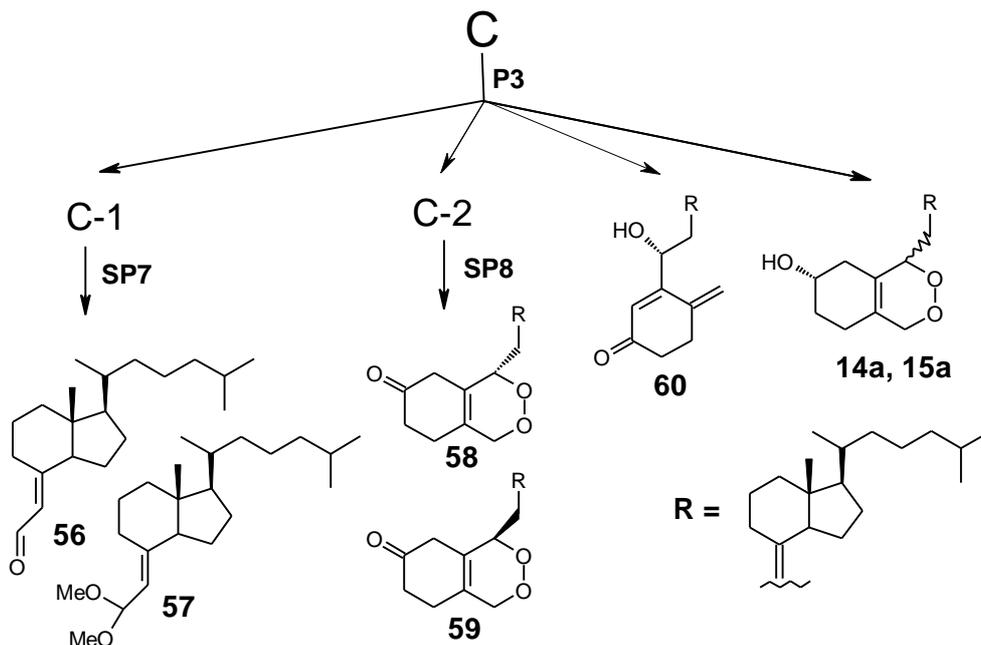


Durch weitere chromatographische Separierungen wurden aus den Fraktionen A-4.1 bis A-4.4 die Hauptkomponenten isoliert, wobei die in Schema 11 aufgeführten Normalphasen und Umkehrphasen zum Einsatz kamen. Neben den bekannten Endoperoxiden **14a** und **15a** [34] konnten so das neue Endoperoxid-Derivat **55** sowie die noch nicht beschriebenen Triole **54** und **53** gewonnen werden.

7.6 Untersuchung der Fraktion C

Die Auftrennung der lipophilen Fraktion C gelang am besten auf einer Normalphase mit Hexan/*tert*-Butylmethylether als mobiler Phase. Neben einem Gemisch der Endoperoxide **14a** und **15a** wurden durch die Trennung **P3** die Fraktionen C-1 und C-2 sowie die chromatographisch einheitliche Verbindung **60** erhalten.

Schema 12



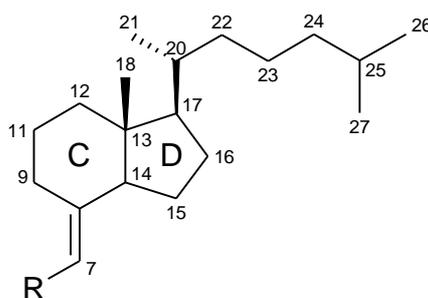
Die Fraktionen C-1 und C-2 wurden erneut chromatographiert (vgl. Schema 12). Aus Fraktion C-1 konnten durch Trennung **SP7** die Fragmentierungsprodukte **56** und **57** isoliert werden. Während **56** schon mehrfach in der Literatur beschrieben wurde [65,66], ist dessen Acetal **57** noch unbekannt. Die Fraktion C-2 enthielt die bisher noch nicht beschriebenen Endoperoxid-Derivate **58** und **59**. Entsprechend den nicht oxidierten Endoperoxiden **14a** und **15a** ist auch hier die 6(S)-Verbindung **58** lipophiler und eluiert auf einer Normalphase daher vor der 6(R)-Verbindung **59**.

8. Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen, bei denen es sich oft um sehr ähnliche Derivate des Vitamin D₃ handelt, besprochen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und um der Gefahr einer ständigen Wiederholung vorzubeugen, wurden sie zur Diskussion der analytischen Daten in Gruppen zusammengefaßt. Die Benennung der Einzelverbindungen erfolgte auf Grundlage der Nomenklatur für Steroide [67]. Bevor näher auf die Struktur der Verbindungen sowie die Bildungsmechanismen eingegangen wird, müssen zunächst einige allgemeine Bemerkungen zur Struktur und Strukturaufklärung folgen.

8.1 Allgemeine Bemerkungen zur Strukturaufklärung der erhaltenen Verbindungen

Die ¹³C-NMR-Spektren der isolierten Verbindungen wurden zunächst mit den Spektren von Vitamin D₃ (**9**) verglichen. Für alle Derivate bis auf **36** und **37** sowie den Vitamin D₂-Derivaten ergab sich das abgebildete gemeinsame Strukturmerkmal:



Aufgrund der annähernd identischen chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome in der Seitenkette, konnten Strukturveränderungen in diesem Bereich der Moleküle ausgeschlossen werden (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1

Verb.	C-18 [ppm]	C-20 [ppm]	C-21 [ppm]	C-22 [ppm]	C-23 [ppm]	C-24 [ppm]	C-25 [ppm]	C-26 [ppm]	C-27 [ppm]
9	12.0	36.1	18.9	36.1	23.6	39.5	28.0	22.6	22.8
12a	12.0	36.1	18.9	36.2	23.7	39.5	28.0	22.6	22.8
13a	12.0	36.1	18.9	36.2	23.5	39.6	28.1	22.6	22.9
14a	12.1	36.0	18.8	36.0	23.6	39.5	28.0	22.5	22.7
15a	11.8	36.0	18.8	36.1	23.7	39.5	28.0	22.5	22.7
44	11.9	36.1	18.8	36.1	23.7	39.5	28.0	22.6	22.8
45	11.8	36.0	18.8	36.1	23.5	39.5	28.0	22.6	22.8
46	11.9	36.1	18.8	36.1	23.9	39.5	28.0	22.6	22.8
47	11.9	36.1	18.8	36.1	23.9	39.5	28.0	22.6	22.8
48	12.2	36.1	18.8	36.1	23.8	39.5	28.0	22.6	22.8
49	12.1	36.0	18.9	36.1	23.6	39.5	28.0	22.6	22.8
50	12.2	36.1	18.9	36.1	23.9	39.6	28.1	22.6	22.9
51	11.8	36.0	18.8	36.0	23.9	39.5	28.0	22.5	22.8
52	12.1	36.0	18.8	36.0	23.8	39.5	28.0	22.5	22.8
53	11.9	36.1	18.8	36.1	23.9	39.5	28.0	22.6	22.8
54	12.0	36.1	18.9	36.2	24.1	39.6	28.1	22.6	22.9
55	12.2	36.0	18.8	36.0	23.6	39.5	28.0	22.6	22.8
56	12.1	35.8	18.8	35.9	23.8	39.4	28.0	22.5	22.7
57	11.9	36.0	18.8	36.0	23.4	39.4	27.9	22.5	22.7
58	12.2	36.0	18.9	36.1	23.6	39.5	28.0	22.6	22.8
59	11.8	36.1	18.9	36.1	23.7	39.6	28.1	22.6	22.9
60	11.8	36.0	18.9	36.1	23.4	39.5	28.0	22.5	22.8

Strukturveränderungen in den Ringen C und D konnten ebenfalls ausgeschlossen werden. Wie die kaum veränderten chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome C-9 und C-14 beweisen, ist bei allen isolierten Derivaten bis auf **36** und **37** die Doppelbindung zwischen C-7 und C-8 erhalten geblieben (vgl. Tabelle 2).

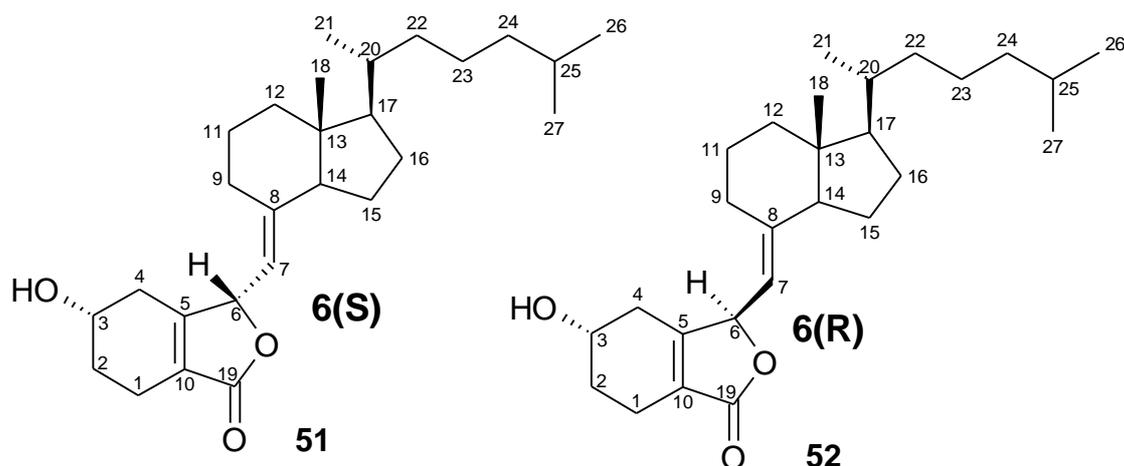
Tabelle 2

Verb.	C-7 [ppm]	C-8 [ppm]	C-9 [ppm]	C-11 [ppm]	C-12 [ppm]	C-13 [ppm]	C-14 [ppm]	C-15 [ppm]	C-16 [ppm]	C-17 [ppm]
9	117.5	145.1	29.4	22.3	40.4	45.9	56.3	23.9	27.7	56.6
13a	117.3	140.3	29.6	22.2	40.3	45.7	56.0	23.9	27.6	57.7
14a	117.4	140.3	30.0	22.2	40.3	46.2	56.0	23.9	27.6	57.7
15a	115.4	148.6	29.6	22.0	40.2	45.6	56.0	23.7	27.5	56.5
16a	114.5	149.5	29.6	22.1	40.3	45.6	56.0	23.8	27.5	56.6
44	113.5	150.2	29.7	22.2	40.3	45.7	56.0	23.9	27.5	56.7
45	117.6	145.9	29.6	22.1	40.0	46.0	55.8	23.8	27.5	56.5
46	112.3	150.5	29.9	22.2	40.3	45.9	56.0	23.7	27.6	56.7
47	117.9	145.4	29.6	22.3	40.2	45.6	55.8	23.3	27.3	56.6
48	110.0	152.3	30.2	22.1	40.1	45.9	56.2	23.7	27.6	56.5
49	112.6	150.2	29.6	22.2	40.1	46.0	56.1	23.9	27.5	56.6
50	112.5	151.2	29.7	22.1	40.1	46.0	55.9	23.8	27.6	56.3
51	114.4	148.6	29.6	22.2	40.2	45.7	55.8	23.4	27.5	56.6
52	114.4	148.4	29.5	22.0	40.0	45.5	55.8	23.8	27.5	56.5
53	118.5	150.8	29.8	22.3	40.3	45.7	55.6	23.3	27.5	56.7
54	114.6	149.5	29.7	22.0	40.5	45.4	55.6	23.9	27.7	56.3
55	111.4	153.3	29.9	22.0	40.0	45.8	55.9	23.8	27.5	56.5
56	124.0	167.9	29.3	22.2	40.0	47.6	57.1	24.2	27.3	56.9
57	117.6	145.8	29.4	22.1	40.0	45.4	55.6	23.8	27.9	56.6
58	114.2	150.2	29.5	22.1	40.1	45.7	56.1	23.8	27.5	56.6
59	114.3	149.8	29.9	22.3	40.3	45.8	55.9	23.9	27.6	56.7
60	124.2	138.8	29.5	22.1	40.2	46.1	55.7	23.8	27.5	56.6

Die Differenzen in den chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome C-7 und C-8 können durch die Unterschiedliche Substitution an C-7 erklärt werden. Die photosensibilisierte Oxidation von Vitamin D₃ führte demnach überwiegend zu Veränderungen am Ringsystem A. Da die Reaktionen mit Singulett-sauerstoff nicht stereoselektiv ablaufen, wurden zudem vielfach Stereoisomere gebildet. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der erhaltenen Vitamin D-Derivate nimmt daher einen nicht unerheblichen Teil dieser Arbeit ein.

8.1.1 Aufklärung der Stereochemie an C-6 bei Verbindungen mit zusätzlichem Ringsystem

Bei allen isolierten Verbindungen mit einem zusätzlichem Ringsystem läßt sich die Stereochemie an C-6 mittels der NOE-Differenz-Spektroskopie bestimmen. Anhand der bisher noch nicht beschriebenen Verbindungen **51** und **52** wird die allgemeine Vorgehensweise im Folgenden näher erläutert.



Durch zusätzliches Einstrahlen der Resonanzfrequenzen der Protonen H-3, H-6 und H-18 wird eine günstigere Besetzung der Niveaus erzwungen, als durch die Boltzmann-Gleichung vorgegeben. Dies führt zu einer Intensitätserhöhung der Nachbarkernsignale. Die Stärke des Kern-Overhauser-Effektes nimmt allerdings mit der sechsten Potenz des Abstandes ab. Der Kern-Overhauser-Effekt ist daher im allgemeinen nur dann feststellbar, wenn sich die Kerne auf eine Entfernung von weniger als 3 Å annähern [68]. Abbildung 6 zeigt die gemessenen NOE-Differenz-Spektren der 6(S)-Verbindung **51** sowie das Protonenspektrum.

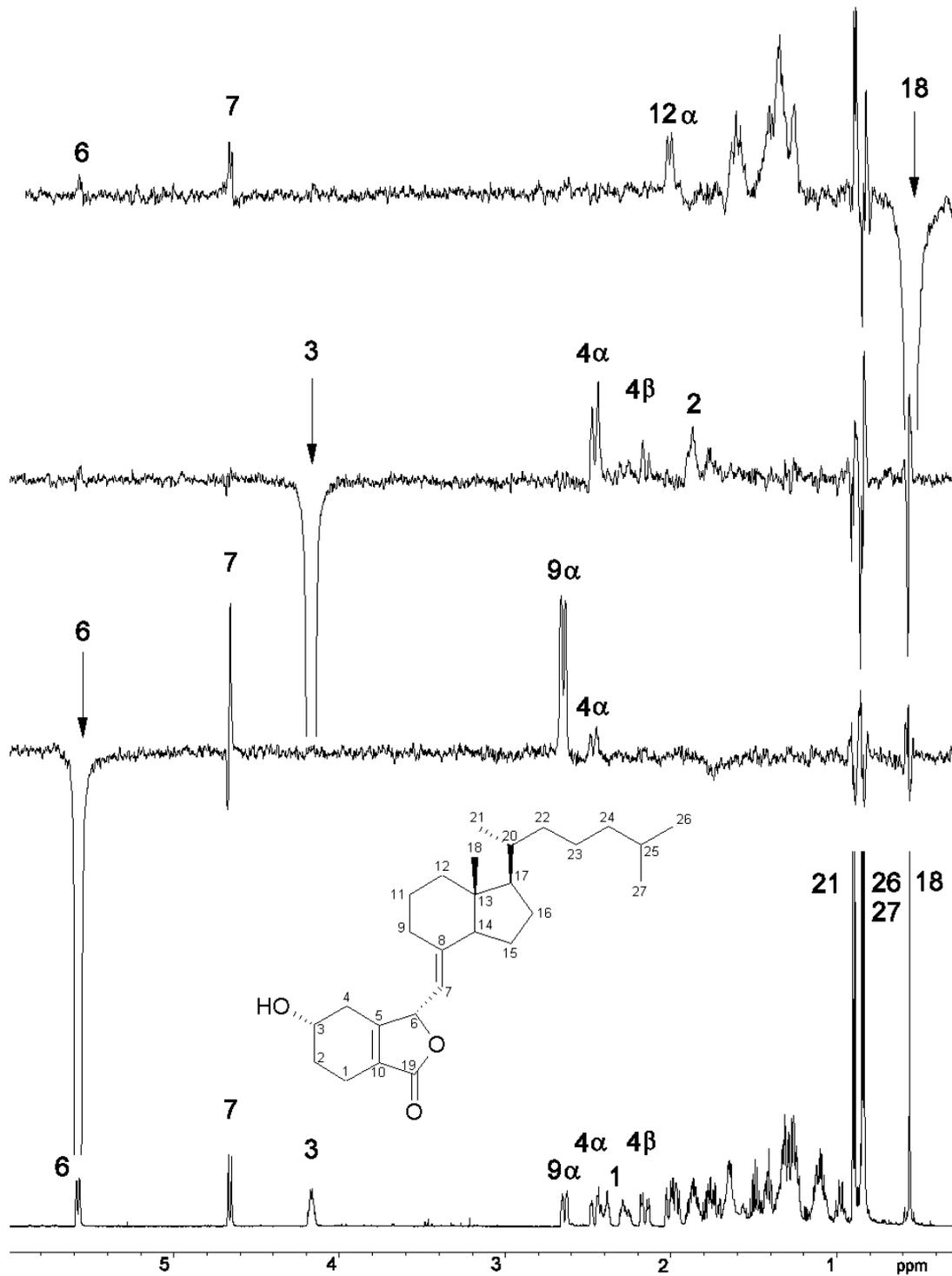


Abbildung 6: Vergleich der NOE-Differenz- und des Protonenspektrums von **51** (500 MHz / CDCl₃)

Durch Einstrahlung der Resonanzfrequenz von H-6 kommt es zu deutlich positiven Kern-Overhauser-Effekten bei H-7 und H-9α. Die Effekte besitzen in etwa gleiche Intensitäten. Desweiteren leitet sich nach Karplus [73] aus der

Kopplungskonstante zwischen H-6 und H-7 (8.9 Hz) ein Diederwinkel von $0-40^\circ$ oder $150-170^\circ$ ab. Aufgrund der NOEs müssen H-7 und H-9 α in etwa den gleichen Abstand zu H-6 haben, weshalb der Diederwinkel nur im Bereich von 150 bis 170° liegen kann. (vgl. Abbildung 7).

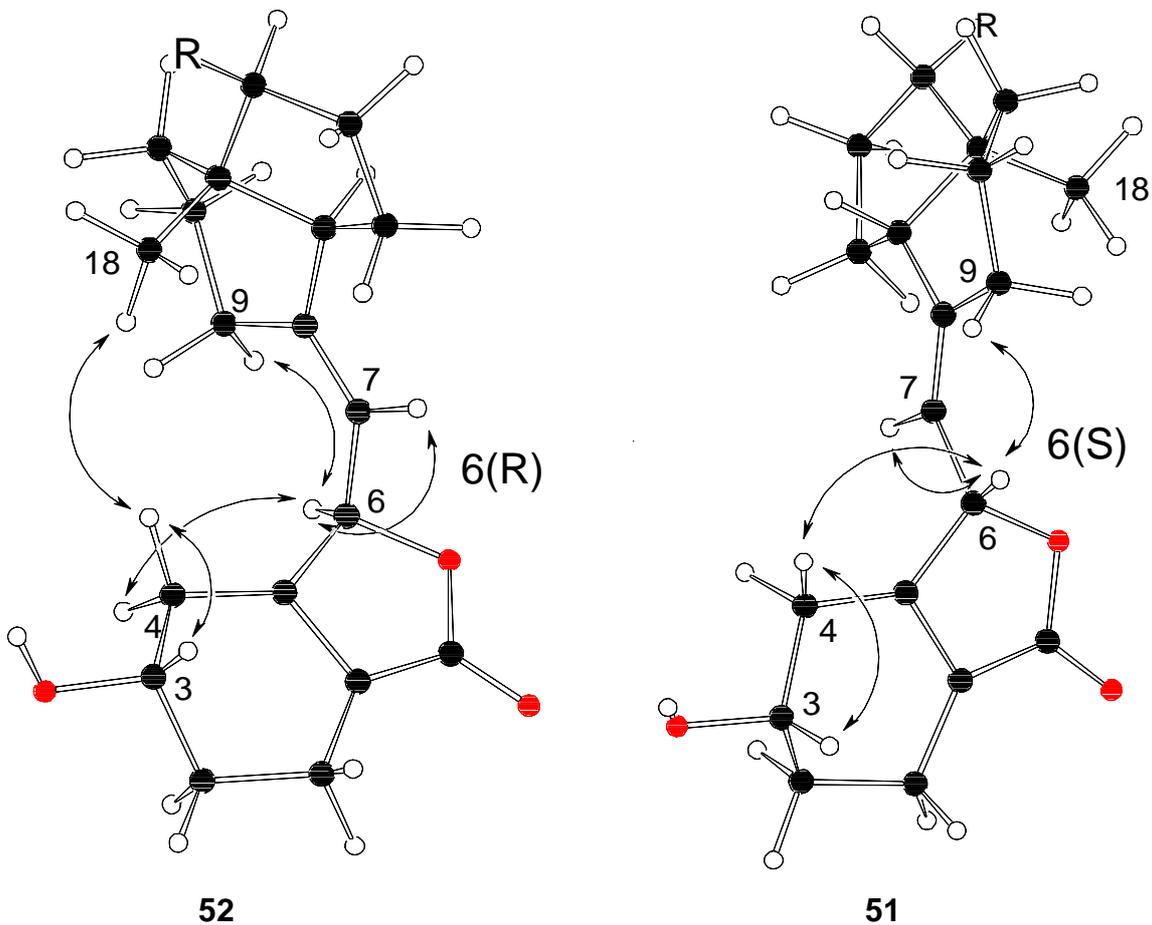


Abbildung 7: Orientierung der Methylgruppe 18 in Abhängigkeit zur absoluten Konfiguration an C-6, sowie gemessenen Kern-Overhauser-Effekte bei **52** und **51** (Die Seitenkette (R) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt)

Infolgedessen ist die Methylgruppe 18 nur bei einer $6(R)$ -Konfiguration in Richtung des Ringes A orientiert. Durch die Sättigung der Resonanzfrequenz von H-18 konnte daher bei der $6(S)$ -Verbindung **51** kein Kern-Overhauser-Effekt für die Protonen an C-4 beobachtet werden (vgl. Abbildung 6). Wie Abbildung 8 zeigt, trat bei der entsprechenden $6(R)$ -Verbindungen **52** jedoch ein deutlicher Effekt bei H-4 α auf.

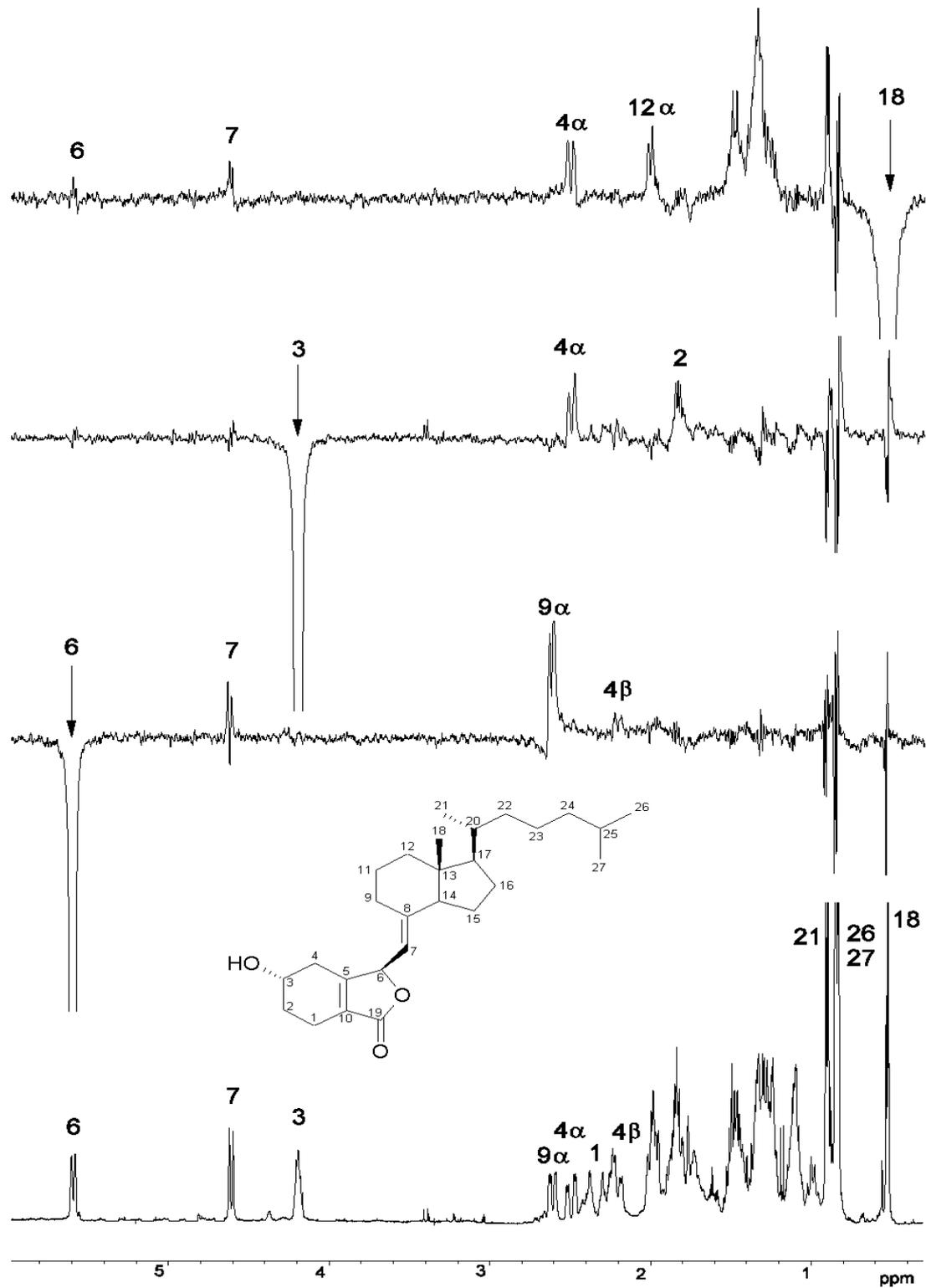


Abbildung 8: Vergleich der NOE-Differenz- und des Protonenspektrums von **52** (500 MHz / CDCl₃)

In einigen Fällen kann die Zuordnung der Stereochemie auch durch Einstrahlung auf H-3 und H-6 erfolgen. Sättigt man die Resonanzfrequenz von H-3, kommt es bei **51** und **52** zu einem deutlichen Kern-Overhauser-Effekt bei

H-4 α (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 8). Bei Sättigung der Resonanzfrequenz von H-6 tritt bei der 6(S)-Verbindung **51** ebenfalls ein Effekt für H-4 α auf. Die gleiche Messung führt bei der 6(R)-Verbindung **52** jedoch zu einem Effekt bei H-4 β (vgl. Abbildung 8). Befindet sich H-3 aber in einer gestaffelten Konformation zu den diastereotopen Protonen an C-4, kann durch Einstrahlung auf H-3 nicht mehr zwischen H-4 α und H-4 β unterschieden werden, wodurch eine Bestimmung der absoluten Konfiguration an C₆ nach dieser Methode unmöglich wird.

Die Orientierung der Methylgruppe 18 ist dagegen unabhängig von der Konformation des Ringes A, so daß die absolute Konfiguration an C-6 bei allen Verbindungen mit zusätzlichem Ringsystem durch Einstrahlung auf H-18 ermittelt werden konnte. Durch Sättigung der Resonanzfrequenz von H-6 wurde zuvor sichergestellt, daß sich die Methylgruppe 18 nur bei einer 6(R)-Konfiguration dem Ring A annähert.

8.2 Fragmentierungsprodukte

Die Fragmentierungsprodukte fanden sich zum einen in der sehr polaren Fraktion A-1 (**42** und **43** vgl. Schema 8) und zum anderen in der sehr lipophilen Fraktion C-1 (**56** und **57** vgl. Schema 12). In den mittelpolaren Fraktionen wurden dagegen keine Fragmentierungsprodukte gefunden.

8.2.1 Polare Fragmentierungsprodukte **42** und **43**

Das Molekulargewicht von Verbindung **42** konnte durch die hochauflösende Massenspektroskopie zu 184.0761 bestimmt werden, was lediglich die Summenformel C₉H₁₂O₄ zuläßt. Aus der Summenformel ergibt sich die Anzahl von vier Doppelbindungsäquivalenten.

Im breitbandentkoppelten ¹³C-NMR-Spektrum liegen mit 166.5 ppm, 161.0 ppm und 117.4 ppm drei der neun Kohlenstoffatome im olefinischen Bereich. Die chemischen Verschiebungen passen zur Gruppe eines α,β -ungesättigten Lactons oder Esters, worauf mindestens zwei der vier Doppelbindungsäquivalente entfallen. Die übrigen beiden werden demnach durch zwei Ringschlüsse im Molekül verursacht. Bei den Ringen kann es sich aber nicht

um die ursprünglichen Ringe C und D handeln, da in den NMR-Spektren weder das Signal der Methylgruppe in Position 13 noch eines der Seitenkette auftritt. Im ^1H -NMR-Spektrum ist bei 3.64 ppm jedoch das Multiplett eines Methinprotons zu erkennen, das an die Resonanz von H-3 in Vitamin D_3 (**9**) (3.91 ppm) erinnert. Außerdem fällt bei 4.24 ppm das Signal einer Methylengruppe auf. Wie durch die Aufnahme eines H,H-COSY-Spektrums gezeigt werden konnte, koppeln deren Protonen nur geminal, so daß die Methylengruppe isoliert im Molekül vorliegen muß. Die Kopplungskonstante ist dabei so gering, daß jedes der Protonen nur als breites Singulett auftritt. Dies spricht für die Nachbarschaft eines Sauerstoffatoms, denn die in der Regel negative geminale Kopplung wird durch den Elektronenzug vergrößert und kann so unter Umständen auch einen positiven Wert erreichen [69].

Im ^{13}C -DEPT-Spektrum liegt die Resonanz des Methylenkohlenstoffes bei 77.8 ppm, womit tatsächlich eine Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom angenommen werden kann. Ein weiteres quartäres Kohlenstoffatom tritt bei 65.3 ppm auf. Da aus der Summenformel abgeleitet werden kann, daß eine zweite Alkoholfunktion im Molekül vorhanden sein muß, spricht dies für eine Hydroxylsubstitution. Die Interpretation aller spektroskopischen Daten führte zu den Strukturen **42** und **43**, die bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden sind:



Bei der zweiten aus Fraktion A-1 isolierten Verbindung (**43**) handelt es sich um ein Diastereomer von **42**, was einwandfrei durch die Auswertung der spektroskopischen Daten belegt werden konnte. Da die Stereochemie an C-6 bereits im Ausgangsmolekül festgelegt war, kann zunächst davon ausgegangen werden, daß sich die beiden Stereoisomere nur in der absoluten Konfiguration an C-8a unterscheiden.

Aufgrund der weitgehenden Planarität der α,β -ungesättigten Lactonfunktion ergibt sich im Dreidingmodell für jedes Diastereomer nur eine spannungsfreie Sesselkonformation des Cyclohexanringes A. In der 8a(S)-Verbindung **43** ist dabei die Alkoholfunktion an C-6 axial und das entsprechende Methinproton äquatorial angeordnet. Bei der 8a(R)-Verbindung **42** kehrt sich dies gerade um (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3

Verbindung	Orientierung H-6	Orientierung OH	C-6 [ppm]	H-6 [ppm]	$^3J_{5a/6}$ [Hz]	$^3J_{5b/6}$ [Hz]
42 8a(R)	axial	äquatorial	70.2	3.64	4.7	11.2
43 8a(S)	äquatorial	axial	66.7	4.17	3.6	3.0

Ein äquatoriales Proton tritt im Spektrum bei deutlich tieferem Feld auf [70,71]. Die ^{13}C -Resonanz wird jedoch durch die axiale Alkoholfunktion zu höherem Feld verschoben [72]. Bei **43** liegt die Resonanz des Methinprotons H-6 um 0.6 ppm tieffeldiger, die des entsprechenden Kohlenstoffatoms aber um 3.5 ppm hochfeldiger als in **42** (vgl. Tabelle 3). Die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen deuten auf eine 8a(S)-Konfiguration von **43** hin, was selbst durch das einfache Dreidingmodell bestätigt werden kann (Vgl. Abbildung 9). Der Diederwinkel zwischen den Protonen an C-5 und dem Methinproton an C-6 beträgt bei **43** jeweils $\sim 60^\circ$, woraus nach Karplus eine Kopplungskonstante von 3-4 Hz resultieren sollte [73]. Mit 3 bzw. 3.6 Hz liegen beide 3J -Kopplungen in der Tat in diesem Bereich.

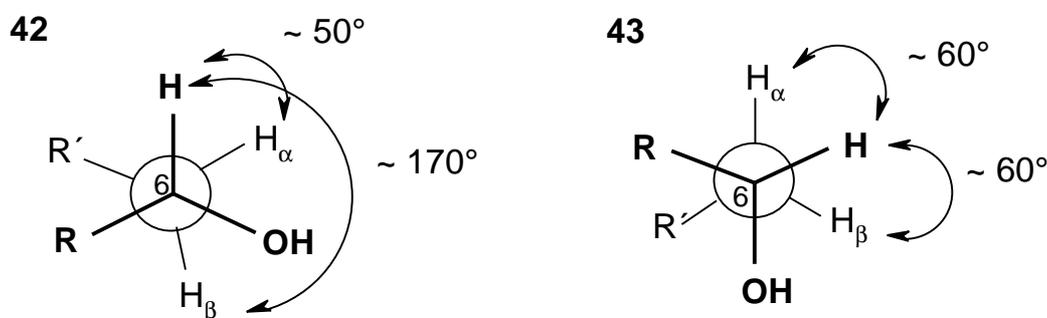
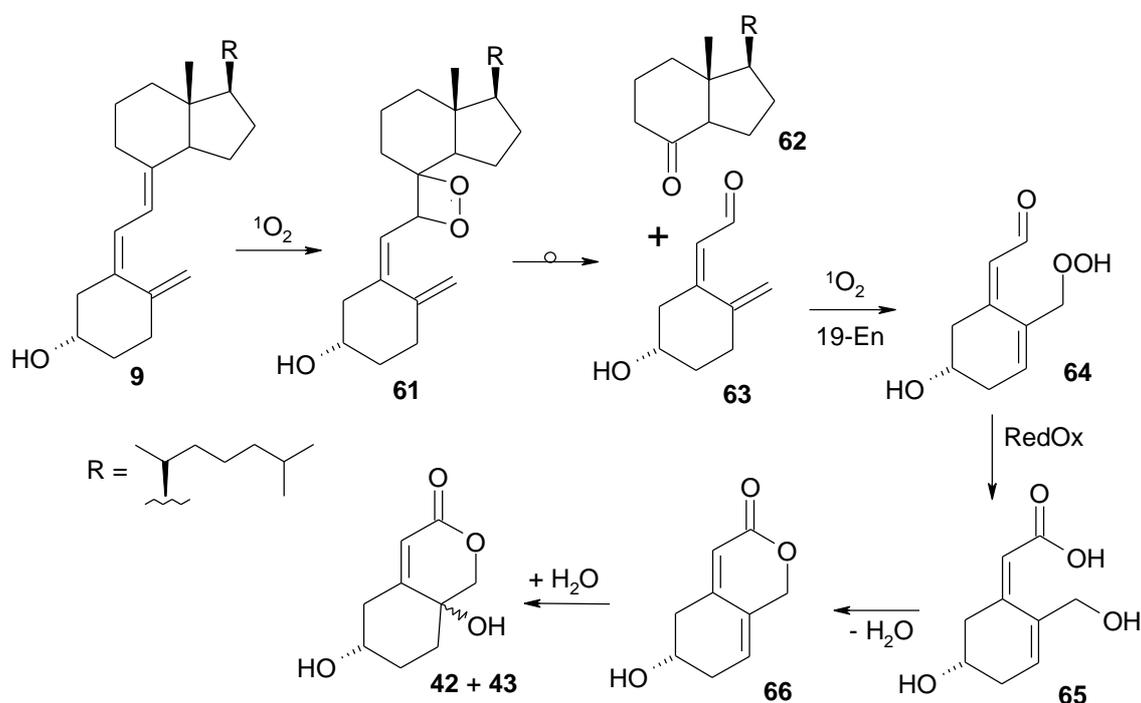


Abbildung 9: Newman-Projektion längs der C₆/C₅-Achse von Verbindung **42** und **43**

Wie bereits erwähnt, ist bei der 8a(*R*)-Verbindung **42** die Alkoholfunktion an C-6 äquatorial und das Methinproton axial orientiert. In den Spektren von **42** können die daraus resultierenden Unterschiede zu **43** nachvollzogen werden (vgl. Tabelle 3). Die Kopplungen der diastereotopen Protonen an C-5 mit H-6 betragen 4.7 bzw. 11.2 Hz. Nach Karplus ergeben sich daraus Diederwinkel von ~ 50 und ~ 170 Grad. Diese stimmen erneut mit dem Modell überein (Abbildung 9).

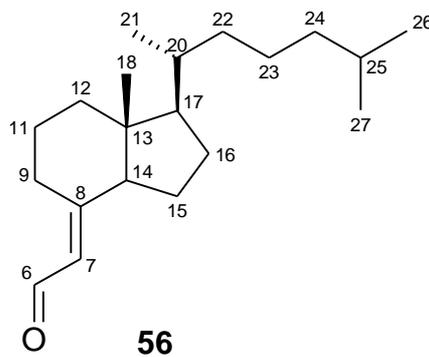
Schema 13 zeigt den möglichen Bildungsmechanismus der Fragmentierungsprodukte **42** und **43**. Ausgehend von Vitamin D₃ (**9**) kann zunächst das Dioxetan **61** gebildet werden, welches spontan zum Keton **62** und Aldehyd **63** zerfällt. Aus dem Aldehyd **63** sollte über das Hydroperoxid **64** und eine folgende RedOx-Reaktion die Carbonsäure **65** entstehen. Diese kann unter Abspaltung von Wasser zum Lacton **66** cyclisieren, aus welchem, infolge einer Markownikoff-Hydratisierung, die Diastereomere **42** und **43** gebildet werden können.

Schema 13



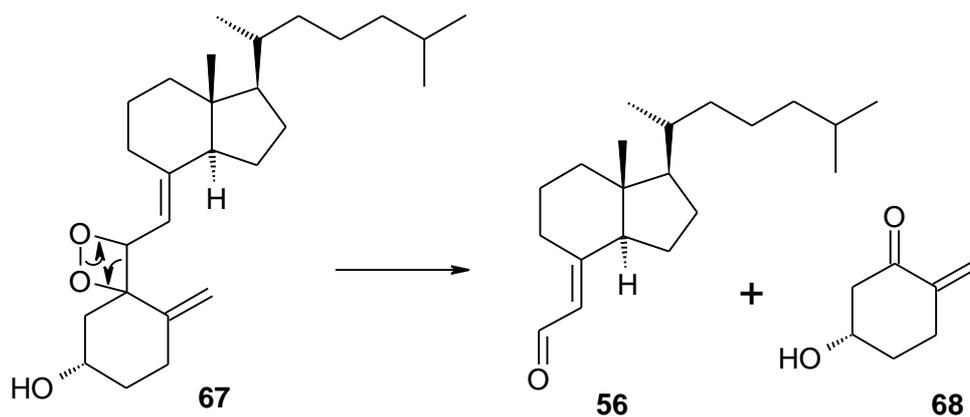
8.2.2. Lipophile Fragmentierungsprodukte 56 und 57

Die Darstellung und die spektroskopischen Eigenschaften des α,β -ungesättigten Aldehyds **56** aus Fraktion **C-1** sind bereits in der Literatur beschrieben worden [65,66]. Bei der asymmetrischen Totalsynthese von Vitamin D₃ (**9**) tritt **56** als Zwischenstufe auf [74].



Verbindung **56** kann aus dem zunächst gebildeten Dioxetan **67** entstanden sein (vgl. Schema 14). Wie bereits erwähnt, sind Dioxetane im allgemeinen sehr instabil. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die Primärverbindung **67** bereits kurz nach der Umsetzung mit Singulett-Sauerstoff zu **56** und **68** zerfallen ist.

Schema 14

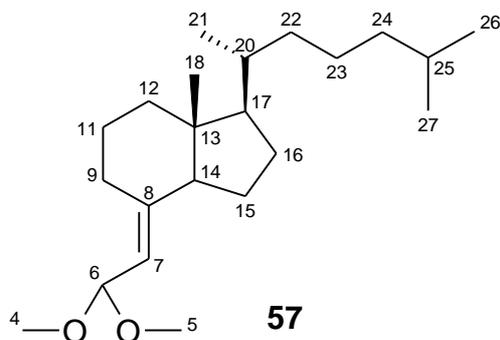


Im E⁺-Massenspektrum der zweiten aus Fraktion **C-1** isolierten Verbindung (**57**) tritt das Molekülion bei $m/z = 336$ auf. Der Basispeak bei $m/z = 305$ wird durch die Abspaltung einer Methoxygruppe verursacht. Ein weiteres, intensives

Signal bei $m/z = 274$ spricht für das Vorhandensein einer zweiten Methoxygruppe. Durch die hochauflösende Massenspektroskopie konnte eine Summenformel von $C_{22}H_{40}O_2$ erhalten werden.

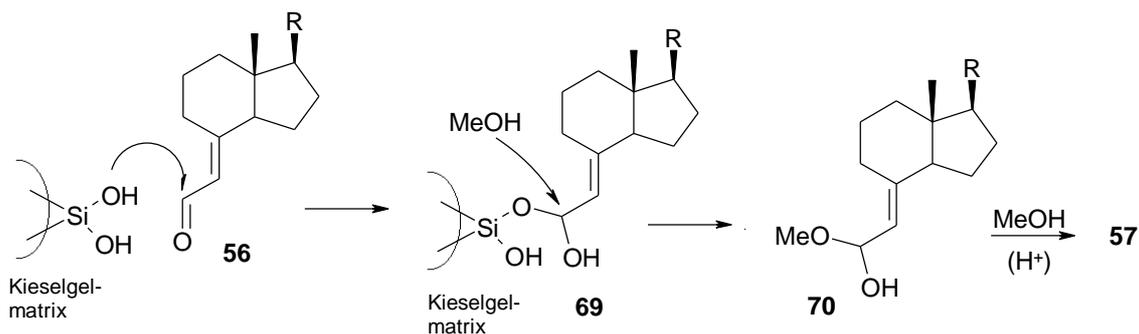
Im ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **57** zeigen sich 22 Kohlenstoffatome. Die Ringe C und D sowie die Seitenkette des Vitamin D_3 (**9**) sind erhalten geblieben (vgl. Tabelle 1 und 2). Die Kohlenstoffsignale des Ringes A treten jedoch nicht mehr auf. Anstelle des Carbonylkohlenstoffes in **56** tritt in **57** ein Signal bei 100.0 ppm auf. Dieses deutet auf ein acetalisiertes Kohlenstoffatom hin. Mit einer chemischen Verschiebung von 145.8 und 117.6 ppm kommen nur zwei weitere Kohlenstoffatome im olefinischen Bereich zur Resonanz. Diese können der Doppelbindung zugeordnet werden, die sich in (**9**) zwischen C-7 und C-8 befunden hat (vgl. Tabelle 2).

Im tieffeldigen Bereich des Protonenspektrums sind bei 5.01 und 5.10 ppm die beiden Dubletts eines AB-Systems zu erkennen ($^3J_{6/7} = 6.5$ Hz). Desweiteren treten bei 3.31 und 3.29 ppm zwei Singulets auf. Die chemischen Verschiebungen und die Integrale von je drei Protonen bestätigen das Vorkommen zweier Methoxygruppen. Bei Verbindung **57** handelt es sich um das Acetalisierungsprodukt von **56**.



Verbindung **57** kann nicht während der photosensibilisierten Oxidation von Vitamin D_3 in Ethanol entstanden sein. Weitaus wahrscheinlicher ist dagegen, daß die Verbindung erst im Verlauf der chromatographischen Aufarbeitung mit Methanol als mobiler Phase gebildet wurde (vgl. Schema 15).

Schema 15



Der von **56** mit freien Silanolgruppen gebildete Komplex **69** ist als Heteroether instabil und wird daher leicht durch Methanol gespalten. Es entsteht das Halbacetal **70**, welches in einem gleichwertigen Reaktionsschritt in das Acetal **57** übergeht.

8.3 Verbindungen mit Endoperoxidfunktion

Die Verbindungen mit Endoperoxidfunktion bilden die größte Gruppe der entstandenen Verbindungen. Sie lassen sich über die chemische Verschiebung und die Kopplungskonstante der Methylengruppe 19 charakterisieren (vgl. Tabelle 4).

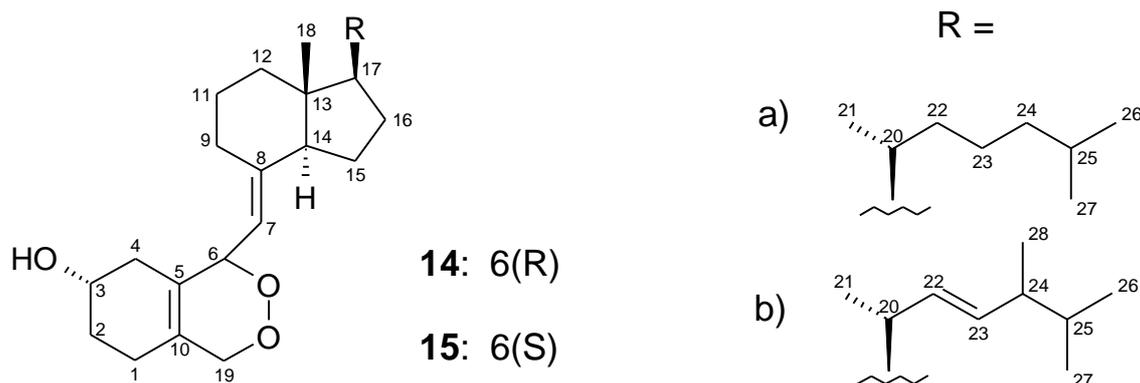
Tabelle 4

Verbindung	C-19 [ppm]	H-19a [ppm]	H-19b [ppm]	² J [Hz]
14a	72.2	4.48	4.31	15.6
15a	72.2	4.60	4.17	15.6
14b	72.3	4.47	4.29	15.4
15b	72.2	4.59	4.16	15.4
44	70.3	4.68	4.59	15.8
45	82.5	4.18	4.09	12.5
46	82.3	4.27	4.02	12.9
47	82.5	4.12	4.02	12.5
48	73.9	5.01	4.27	14.0
49	72.8	4.26	4.19	13.4
55	81.8	4.38	4.12	13.2
58	71.9	4.61	4.35	15.8
59	71.9	4.64	4.32	16.1

Bei den Verbindungen **45** bis **47**, **49** und **55** ist das Kohlenstoffatom C-10 sp^3 -hybridisiert, wodurch die veränderte geminale Kopplung der Methylenprotonen von C-19 erklärt werden kann. Die Tieffeldverschiebung des Kohlenstoffatoms C-19 der Derivate **45** bis **47** und **49** resultiert aus der Hydroxylsubstitution von C-10.

8.3.1 Die Vitamin D Endoperoxide **14** und **15**

Die diastereomeren Endoperoxide des Vitamin D₃ (**9**) wurden während der Vorversuche in Ausbeuten von 28% (**14a**) und 31% (**15a**) erhalten. Aufgrund der deutlich verlängerten Reaktionszeit war der Anteil der Endoperoxide an der erhaltenen Substanzbibliothek geringer. Dennoch machten sie mit 24% (**14a**) und 21% (**15a**) den Hauptanteil der Produkte aus.



Für den weiteren Verlauf der Arbeit ist eine nähere Betrachtung der NMR-spektroskopischen Daten notwendig. Die Kohlenstoffatome der Diastereomere **14** und **15** lassen sich unter Verwendung der wenigen Angaben in der Literatur [35], den Vergleich mit den NMR-Daten der Ausgangsverbindungen und unter Verwendung der Datenbank SPECINFO sicher den entsprechenden Signalen im ^{13}C -NMR-Spektrum zuordnen. Abbildung 10 zeigt das Spektrum des 6(R)-Endoperoxids **14a**.

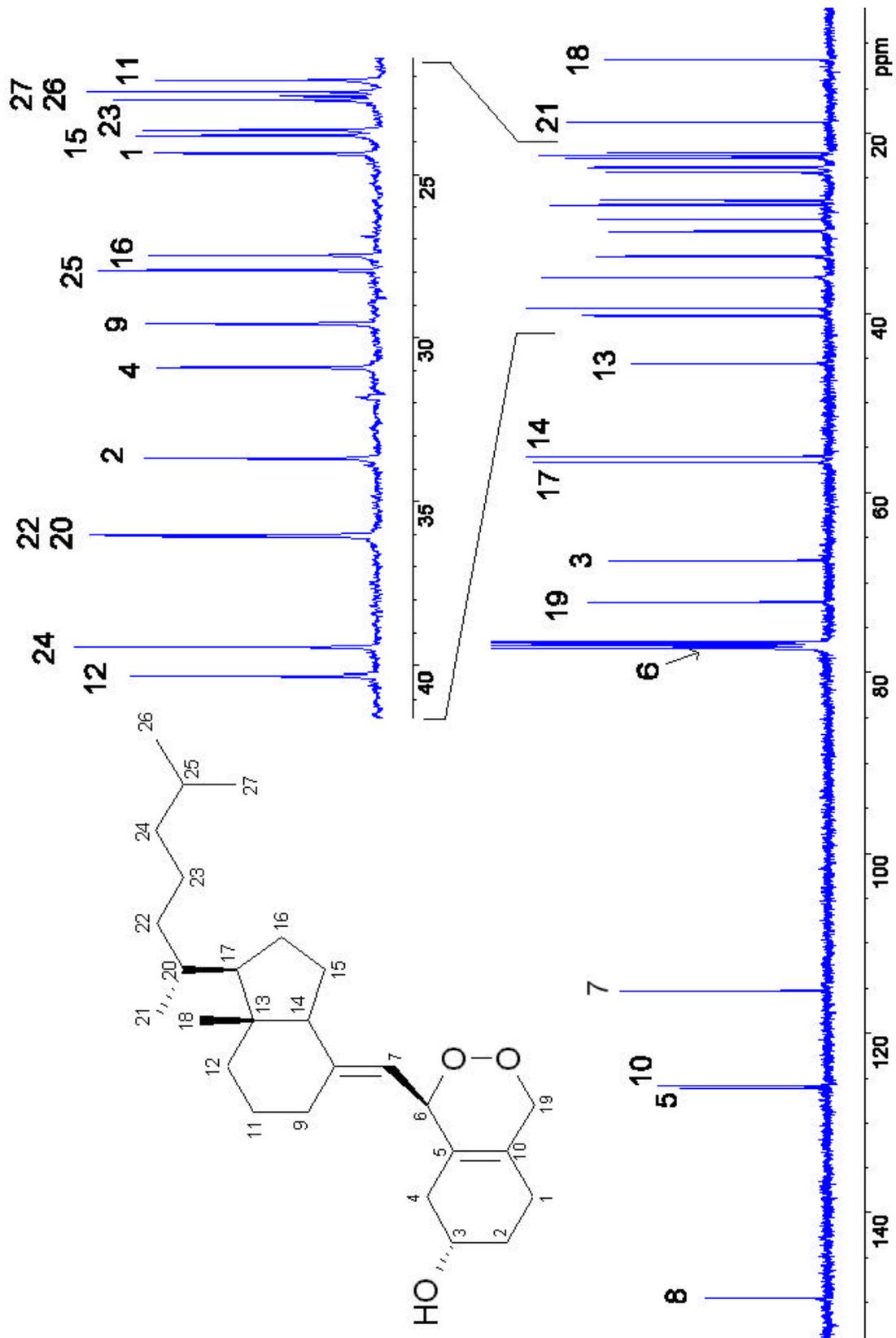


Abbildung 10: ^{13}C -NMR-Spektrum des 6(R)-Endoperoxids 14a (100 MHz/ CDCl_3)

Die ^{13}C -NMR-Spektren der Diastereomerenpaare **14a** und **15a** sowie **14b** und **15b** sind sich äußerst ähnlich. Die stärksten Abweichungen treten bei den Kohlenstoffatomen des Ringes A, sowie bei denen in der Nähe des neu entstandenen Chiralitätszentrums auf (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C-4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-18 [ppm]
14a	23.8	33.3	66.1	31.8	125.9	76.9	115.4	125.8	12.1
15a	24.4	33.7	67.5	30.9	126.8	76.7	114.5	125.9	11.7
14b	23.3	33.4	66.2	29.7	125.9	76.8	115.5	125.8	12.4
15b	24.5	33.8	67.6	31.0	126.8	76.7	114.6	125.9	11.7

Das Kohlenstoffatom C-18 kommt in den 6(R)-Verbindungen **14a** und **14b** jeweils tieffeldiger als in den 6(S)-Verbindungen **15a** und **15b** zur Resonanz.

In den ^1H -NMR-Spektren treten im Bereich von 0.9 bis 2.0 ppm insgesamt 24 Protonen auf. Die Signale überlagern sich teilweise erheblich. Abbildung 11 (S. 48) zeigt das erhaltene ^1H -NMR-Spektrum des 6(R)-Endoperoxids **14a** mit allen Zuordnungen. Aufgrund der Signalüberlagerungen kann die Ermittlung der chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonen nur unter Einbeziehung von zweidimensionalen Spektren erfolgen. Im tieffeldigen Bereich fallen die Signale der Protonen an C-19 auf. Durch die Cycloaddition von Singulett-Sauerstoff an Vitamin D₃ (**9**) verändert dieses Kohlenstoffatom seine Hybridisierung von sp^2 nach sp^3 , woraus eine geminale Kopplung von über 15 Hz resultiert. (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6

Verb.	Konf.	H-3 [ppm]	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	$^3J_{6/7}$ [Hz]	H-19a [ppm]	H-19b [ppm]	$^2J_{19}$ [Hz]
14a	6(R)	4.10	5.19	4.92	9.3	4.48	4.31	15.6
15a	6(S)	3.95	5.27	4.76	8.9	4.60	4.17	15.6
14b	6(R)	4.09	5.18	4.87	9.2	4.47	4.29	15.4
15b	6(S)	3.92	5.26	4.75	8.8	4.59	4.16	15.4

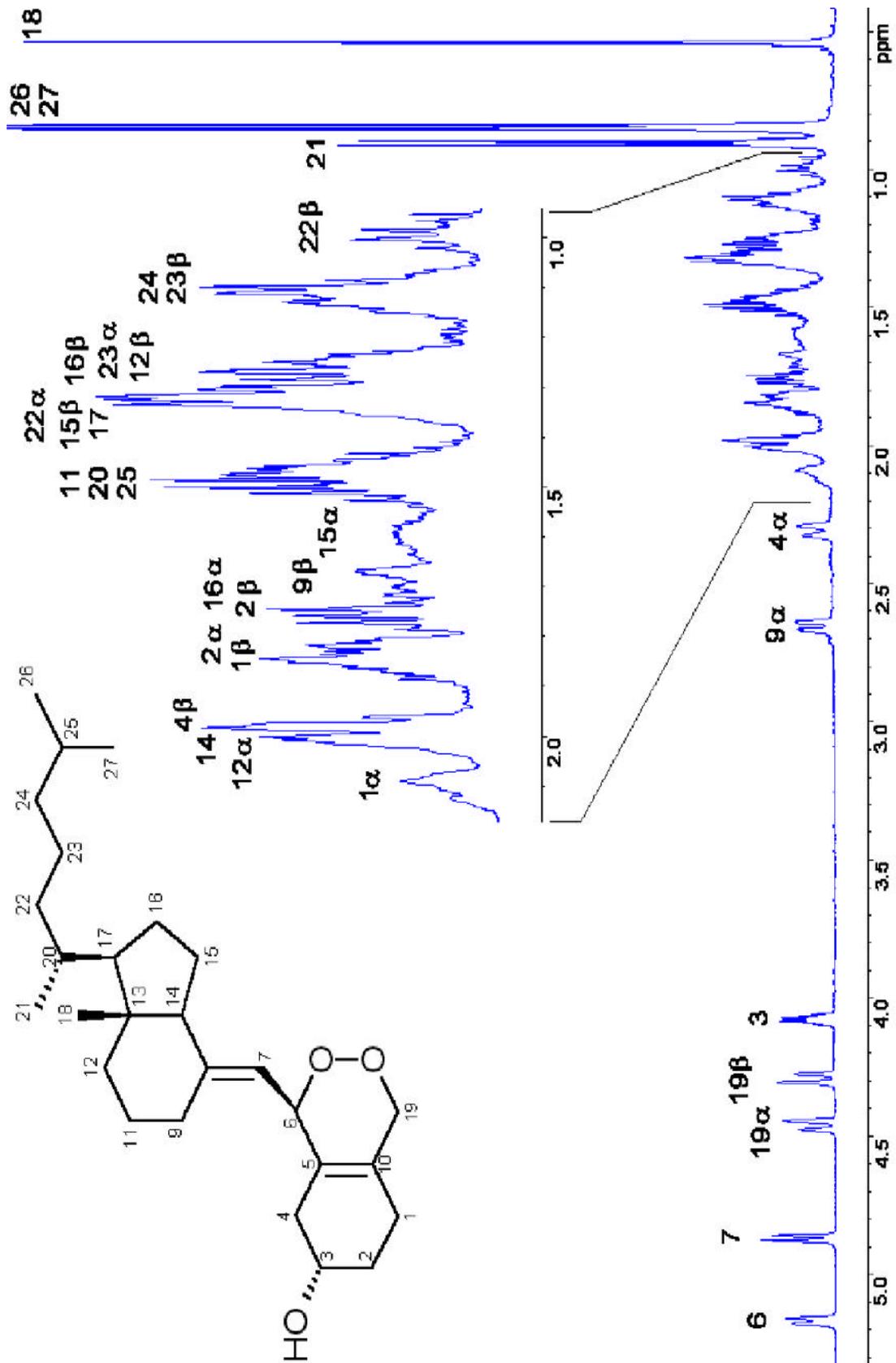
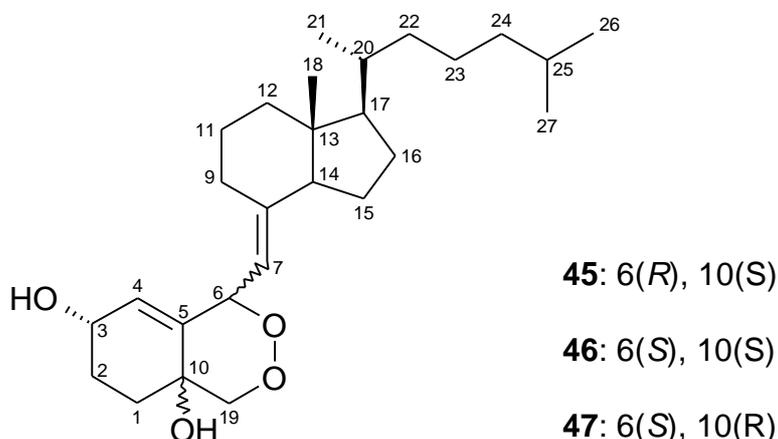


Abbildung 11: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 6(R)-Endoperoxids 14a
(500 MHz / CDCl_3)

Die Kopplungskonstante von H-6 und H-7 ist bei den 6(R)-Verbindungen jeweils größer als bei den entsprechenden 6(S)-Verbindungen. Eine Unterscheidung der Diastereomere **14** und **15** ist zudem aufgrund der deutlichen Differenzen in den chemischen Verschiebungen der tieffeldigen Signale möglich (vgl. Tabelle 6). *Yamada* und Mitarbeiter geben die chemischen Verschiebungen von H-6 und H-7 bei **15a** mit 4.76 (H-6) und 5.23 ppm (H-7) und bei **14a** mit 4.88 (H-6) und 5.17 ppm (H-7) an [34]. Durch die Aufnahme eines HMQC-Spektrums konnte jedoch gezeigt werden, daß dem Proton H-6 bei allen vier Endoperoxiden die größere chemische Verschiebung zugeordnet werden muß. In den Spektren der Derivate des Ergocalciferols **14b** und **15b** resultieren Unterschiede zu **14a** und **15a** lediglich aus den Veränderungen in der Seitenkette.

8.3.2 Die 6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3,10a-diole (**45**) bis (**47**)

Bei den Verbindungen **45** bis **47** handelt es sich um hydroxylierte Endoperoxide aus Fraktion A-2 (vgl. Schema 9). Die Verbindungen sind Diastereomere und werden in dieser Arbeit erstmalig beschrieben.



Nach chemischer Ionisation mit Ammoniakgas tritt im Massenspektrum der gewonnenen Verbindungen ein $[M+H]^+$ -Signal bei $m/z = 433$ auf. Anhand der hochauflösenden Massenspektroskopie ergab sich eine Summenformel von $C_{27}H_{44}O_4$. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung **9** ist die Gesamtzahl der Kohlenstoffatome damit gleichgeblieben, es befinden sich aber jetzt drei weitere Sauerstoffatome in jedem Molekül.

In den ^{13}C -APT-Spektren treten mit zwei quartären und zwei tertiären Kohlenstoffatomen lediglich vier Signale im olefinischen Bereich auf. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, befindet sich eine der beiden Doppelbindungen zwischen C-7 und C-8. Im Unterschied zu den Endoperoxiden **14** und **15** wird die zweite Doppelbindung daher ebenfalls durch ein quartäres und ein tertiäres Kohlenstoffatom gebildet. Da in den Ringen C und D sowie in der Seitenkette keine Veränderungen erfolgt sind (vgl. Tabelle 2 und 3), beweist dies eine Verlagerung der Doppelbindung im Ring A. Infolgedessen erfährt auch der Methylenkohlenstoff C-19 einen deutlichen Tieffeldshift (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
45	27.1	26.8	63.6	125.9	139.0	80.9	117.6	66.2	82.5
46	26.7	26.3	63.5	125.1	138.7	79.6	112.3	65.5	82.3
47	30.4	27.5	67.6	129.1	136.5	80.0	117.9	65.9	82.5
14a	23.8	33.3	66.1	31.8	125.9	76.9	115.4	125.8	72.2
15a	24.4	33.7	67.5	30.9	126.8	76.7	114.5	125.9	72.2

Die chemische Verschiebung von C-10 weist auf eine Hydroxylsubstitution hin, was auch durch die Summenformel abgesichert ist. Das olefinische Methinproton von C-4 tritt im ^1H -NMR-Spektrum als Dublett auf. Bei dem Kopplungspartner handelt es sich um das Proton am hydroxylierten C-3. Dies zeigt sich im eindimensionalen Spektrum nur als schlecht aufgelöstes Multiplett, im H,H-COSY-Spektrum ist aber eine eindeutigen Zuordnung aufgrund des Cross-Peaks möglich. Die zweite Doppelbindung befindet sich damit in α -Position zu C-3. Außerdem ist in den Protonenspektren das AB-System von H-6 und H-7 sowie das Signal der Methylengruppe 19 zu erkennen (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8

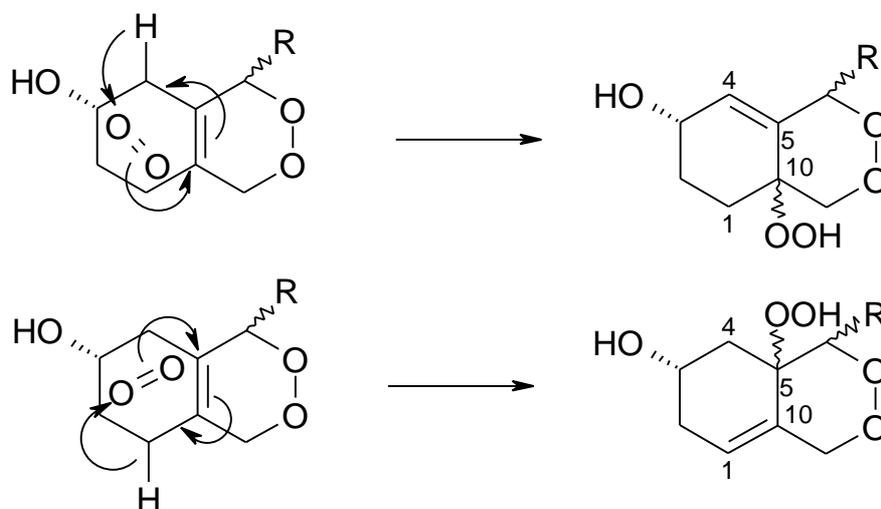
Verb.	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	$^3J_{6/7}$ [Hz]	H _{19a} [ppm]	H _{19b} [ppm]	2J [Hz]
45	5.23	5.62	7.0	4.18	4.09	12.5
46	5.65	4.83	8.3	4.27	4.02	12.9
47	5.21	5.58	7.9	4.12	4.02	12.5
14a	5.19	4.92	9.3	4.48	4.31	15.6
15a	5.27	4.76	8.8	4.60	4.17	15.6

Die geminale Kopplung der Methylenprotonen ist bei den Verbindungen **45** bis **47** deutlich geringer als bei den Endoperoxiden **14a** und **15a**. Dies kann auf die Verlagerung der Doppelbindung im Ring A zurückgeführt werden.

Die Verbindungen sind Folgeprodukte der Endoperoxide **14a** bzw. **15a**. Durch eine 10-En-Reaktion sind zunächst die entsprechenden Hydroperoxide entstanden (vgl. Schema 4), welche durch Reduktion die hydroxylierten Endoperoxide **45** bis **47** bilden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden zahlreiche Verbindungen isoliert, bei denen die Hydroxylgruppe in Position 3 zur Ketogruppe oxidiert worden ist. Die Reduktion der Hydroperoxide, sowie die Oxidation der Hydroxylgruppe kann daher durch eine intermolekulare RedOx-Reaktion zwischen zwei Vitamin D-Derivaten erklärt werden.

Bei der Hydroperoxidbildung ist aber prinzipiell auch die H-Abstraktion an C-1 denkbar. Durch diese Reaktion würde eine Doppelbindung zwischen C-1 und C-10 entstehen (vgl. Schema 16).

Schema 16



Die Tatsache, daß H-4 nur mit H-3 koppelt, stellt sicher, daß die Doppelbindung bei den hier vorliegenden Molekülen zwischen C-4 und C-5 liegt. Um die Möglichkeit einer Gerüstumlagerung auszuschließen, wurde zusätzlich noch ein Korrelations-NMR-Experiment mit Pulsintervallen, die für kleine Kopplungskonstanten zwischen ^{13}C - und ^1H -Kernen optimiert sind, durchgeführt. Das HMBC-Spektrum ermöglicht die Aufklärung der Konnektivitäten über die $^2\text{J}(\text{CH})$ - und $^3\text{J}(\text{CH})$ -Kopplungen. In diesem ist deutlich

die $^3J(\text{CH})$ -Kopplung zwischen dem olefinischen Methinkohlenstoff C-4 und dem Proton H-6 zu erkennen. Bei der alternativ diskutierten Lage der Doppelbindung dürfte diese nicht auftreten. Das quartäre Kohlenstoffatom C-10 koppelt ebenfalls gut sichtbar mit den Protonen an C-1, C-19, C-4, und C-6, womit auch dessen Lage im Molekül als gesichert angesehen werden kann.

Im Vergleich zum Vitamin D₃ (**9**) befinden sich mit C-6 und C-10 zwei neue Chiralitätszentren in den Molekülen. Mit den Verbindungen **45** bis **47** konnten drei der vier möglichen Diastereomere isoliert werden. Die absolute Konfiguration an C-6 ließ sich, wie in Kapitel 8.2 beschrieben, mittels der NOE-Differenz-Spektroskopie bestimmen. Für **45** ergab sich die 6(R)-Konfiguration, für **46** und **47** die 6(S)-Konfiguration. Die Verbindungen **46** und **47** müssen sich daher zwangsläufig in ihrer absoluten Konfiguration an C-10 unterscheiden. Die veränderte Chiralität an C-10 wird durch die Differenzen bei den chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome des Ringes A bestätigt (vgl. Tabelle 7). Sehr viel deutlichere Differenzen zeigen jedoch die Protonenspektren von **46** und **47**. Während das Proton H-7 mit 4.83 ppm in **46** noch in einem für die Endoperoxide **14a** und **15a** typischen Bereich auftritt (vgl. Tabelle 8), erfährt es in **47** eine zusätzliche Tieffeldverschiebung, so daß es erst bei 5.58 ppm zur Resonanz kommt. Da sich **46** und **47** nur am Chiralitätszentrum C-10 unterscheiden, muß die veränderte Konfiguration an diesem Kohlenstoffatom für diese tieffeldige Lage von H-7 verantwortlich sein (vgl. Abbildung 12).

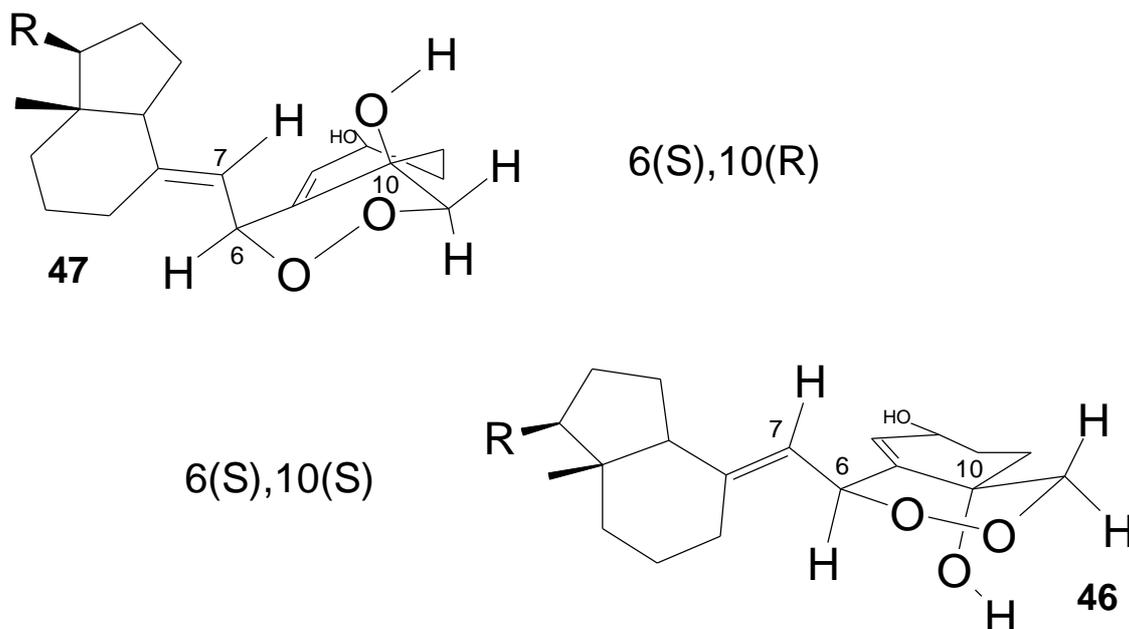


Abbildung 12: Mögliche Annäherung von H-6 und H-7 an die Alkoholfunktion von C-10 bei verschiedenen Konfigurationen an C-10 (Die Seitenkette (R) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt)

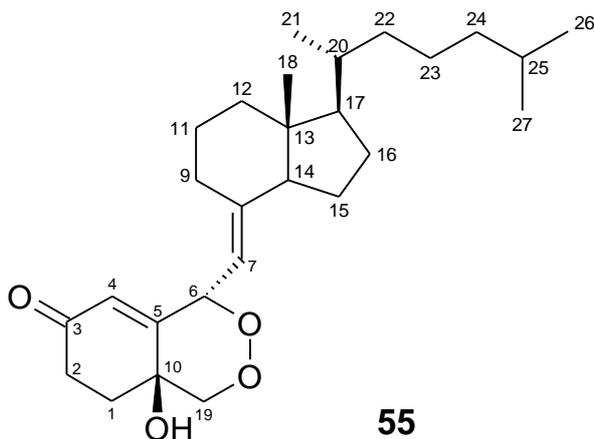
Wenn neben der 6(S)-Konfiguration von **47** eine 10(R)-Konfiguration vorliegt, kann sich das Proton H-7 der Alkoholfunktion an C-10 nähern. Tieffeldverschiebungen von Protonen, die sich räumlich einer Hydroxylgruppe nähern, sind in der NMR-Spektroskopie schon seit längerer Zeit bekannt und daher bereits mehrfach beschrieben worden [75,76]. Verbindung **47** muß daher über die 6(S),10(R)-Konfiguration verfügen. Bei **46** ist das Chiralitätszentrum C-10 invertiert. Bei der 6(S),10(S)-Konfiguration sollte H-7 in einem für die Endoperoxide **14a** und **15a** typischen Bereich zur Resonanz kommen, während H-6 tieffeldiger auftritt (vgl. Abbildung 12). Mit 5.56 ppm ist H-6 im Vergleich zu **14a** und **15a** tatsächlich tieffeldverschoben. Das Proton H-7 erfährt mit 4.83 ppm dagegen die gleiche chemische Verschiebung wie bei **14a** und **15a** (vgl. Tabelle 8). Die Effekte unterstreichen die 6(S),10(S)-Konfiguration von **46**.

Weiterhin muß die absolute Konfiguration von **45** bestimmt werden. Die chemischen Verschiebungen der Methylenkohlenstoffe des Ringes A von **45** und **46** sind annähernd identisch (vgl. Tabelle 7), weshalb beide Verbindungen die gleiche Konfiguration an C-10 aufweisen sollten. Für Verbindung **45** bedeutet dies die 6(R),10(S)-Konfiguration. Auch bei dieser Konfiguration kann sich H-7 der Alkoholfunktion von C-10 annähern. Die sehr tieffeldige Lage von

H-7, sowie die mit **14a** und **15a** vergleichbare chemische Verschiebung von H-6 bestätigt die 6(R),10(S)- Konfiguration bei **45** (vgl. Tabelle 8).

8.3.3 Das (6S)-6,19-Epidioxy-10a-Hydroxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3-on (**55**)

Durch die Trennung **SP6** konnte Verbindung **55** aus Fraktion A-4.3 isoliert werden. (vgl. Schema 11). Es handelt sich um eine bisher noch nicht beschriebenes Vitamin D-Derivat.



Im EI-Massenspektrum zeigt sich der Molekülpeak bei $m/z = 430$. Das Molekulargewicht wurde mit hochauflösender Massenspektroskopie zu 430.3101 g/mol bestimmt, woraus sich die Summenformel $C_{27}H_{42}O_4$ ergibt. Im Vergleich zu Vitamin D₃ (**9**) ist die Anzahl an Protonen um zwei reduziert.

Da auch in **55** lediglich Veränderungen am Ringsystem A stattgefunden haben, treten im ^{13}C -APT-Spektrum der Verbindung noch immer die Signale der Kohlenstoffatome C-7 und C-8 auf (vgl. Tabelle 2). Wie bei den Verbindungen **45** bis **47** wird eine weitere Doppelbindung durch ein quartäres und ein tertiäres Kohlenstoffatom gebildet. Die chemischen Verschiebungen von C-19, C-1, und C-2 beweisen, daß sich diese Doppelbindung auch bei **55** zwischen C-4 und C-5 befindet (vgl. Tabelle 9).

Tabelle 9

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
55	30.4	32.7	198.6	124.9	155.4	65.2	111.4	76.4	81.8
45	27.1	26.8	63.6	125.9	139.0	80.9	117.6	66.2	82.5
46	26.7	26.3	63.5	125.1	138.7	79.6	112.3	65.5	82.3
47	30.4	27.5	67.6	129.1	136.5	80.0	117.9	65.9	82.5

Im Gegensatz zu **45** bis **47** kommt im olefinischen Bereich des Spektrums zusätzlich ein Carbonylkohlenstoff zur Resonanz. Das Signal des vormals hydroxylierten C-3 tritt jedoch nicht mehr auf. Die spektroskopischen Daten, sowie die geringere Masse von **55**, lassen eine Oxidation der Alkoholfunktion in Position 3 zur Carbonylfunktion annehmen. Infolgedessen liegen die Signale der Kohlenstoffatome C-1 und C-2 tieffeldiger als in **45** bis **47** (vgl. Tabelle 9).

Die Lage der Carbonylgruppe wird durch die Multiplizität des Methinsignals von C-4 im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt. Während das Proton in **45** bis **47** ein Dublett bildet, kommt es in **55** bei 5.91 ppm als Singulett zur Resonanz. Die Nachbarschaft eines quartären Kohlenstoffatoms wird damit bestätigt. Wie durch ein HMQC-Spektrum gezeigt werden konnte, treten die Protonen der Methylengruppe 19 als ein Paar von Dubletts auf. Die geminale Kopplung von 13.2 Hz ist mit der entsprechenden Kopplungskonstante von **45** bis **47** vergleichbar. Die um 16.4 ppm tieffeldigere Lage von C-5 (155.4 ppm) ist der Beweis für die Oxidation zum Keton an C-3.

Tabelle 10

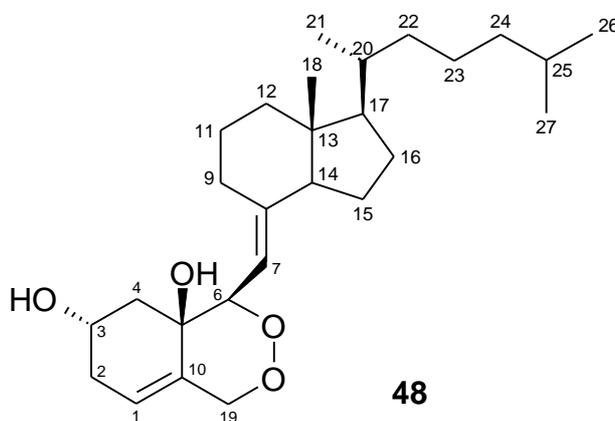
Verb.	H-3	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	$^3J_{6/7}$ [Hz]	H-19a [ppm]	H-19b [ppm]	2J [Hz]
55	-	5.58	4.83	8.4	4.38	4.12	13.2
45	4.25	5.23	5.62	7.0	4.18	4.09	12.5
46	4.25	5.65	4.83	8.3	4.27	4.02	12.9
47	4.27	5.21	5.58	7.9	4.12	4.02	12.5

Im olefinischen Bereich des Protonenspektrums zeigen sich außerdem noch die Dubletts des AB-Systems von H-6 und H-7. Das Multiplett des Methinprotons von C-3 fehlt jedoch (vgl. Tabelle 10).

Wie in Kapitel 8.1.1 beschrieben, wurde die Stereochemie an C-6 durch die NOE-Differenz-Spektroskopie ermittelt. Für **55** ergab sich die 6(S)-Konfiguration. Bei den Diastereomeren **45** bis **47** war ein Zusammenhang zwischen der chemischen Verschiebung des Protons H-7 und der Stereochemie an C-10 festgestellt worden. Da in **55** das Proton H-7 hochfeldiger als H-6 zur Resonanz kommt (vgl. Tabelle 10), sollte neben der 6(S)-Konfiguration eine 10(S)-Konfiguration vorliegen. Die Annahme wird durch einen Vergleich der Protonenspektren von **46** und **55** bestätigt. Die ebenfalls in einer 6(S),10(S)-Konfiguration vorliegende Substanz **46** zeigt eine identische chemische Verschiebung von H-7 (4.83 ppm). Im Rahmen der Messgenauigkeit ist bei beiden Verbindungen die Kopplung dieses Protons mit H-6 ebenfalls identisch (vgl. Tabelle 10) Die genannten Tatsachen lassen keinen anderen Schluß zu, als daß **55** in der 6(S),10(S)-Konfiguration vorliegt. Die isolierte Verbindung kann als Folgeprodukt des Endoperoxids **15a** aufgefaßt werden. Wie bei der Bildung von Verbindung **46**, so ist auch bei **55** durch eine 10-En-Reaktion zunächst ein Hydroperoxid entstanden, welches anschließend reduziert wurde. Im Gegensatz zu **46** ist bei **55** aber zusätzlich eine Oxidation der Hydroxylgruppe in Position 3 zur Ketogruppe eingetreten.

8.3.4 Das (6R)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-1(10),7-dien-3b,5a-diol (**48**)

Verbindung **48** konnte aus Fraktion A-3 erhalten werden (vgl.Schema 10). Es handelt sich erneut um ein bisher noch nicht charakterisiertes hydroxyliertes Endoperoxid.



Da die hochauflösende Massenspektroskopie die Summenformel $C_{27}H_{44}O_4$ lieferte, mußten sich auch hier, wie bei den Verbindungen **45** bis **47**, drei zusätzliche Sauerstoffatome im Molekül befinden. Im EI-Massenspektrum tritt das Molekülion ebenfalls bei $m/z = 432$ auf.

Gemeinsam mit den Verbindungen **45** bis **47** hat **48** zudem die Multiplizitäten der vier olefinischen Kohlenstoffsignale im ^{13}C -APT-Spektrum. Da die Doppelbindung zwischen C-7 und C-8 erhalten geblieben ist (vgl. Tabelle 2), wird die zweite Doppelbindung ebenfalls durch einen quartäres und ein tertiäres Kohlenstoffatom gebildet. Aufgrund der weitgehend unveränderten Kohlenstoffresonanzen in den Ringen C und D sowie denen in der Seitenkette (vgl. Tabelle 1 und 2), muß sich diese Doppelbindung im Ring A befinden.

Bei den Verbindungen **45** bis **47** kommt zwischen 65 und 75 ppm ein hydroxylsubstituiertes, quartäres Kohlenstoffatom zur Resonanz. Ein entsprechendes Signal tritt auch bei **48** auf (70.0 ppm). Die zweite Hydroxylgruppe im Molekül wird zudem durch die Summenformel abgesichert. Die bisher genannten spektroskopischen Daten ließen zunächst vermuten, es könnte sich bei **48** um das vierte Diastereomer zu den Verbindungen **45** bis **47** handeln. Die chemische Verschiebung der Methylengruppe 19 liegt hier jedoch deutlich hochfeldiger (73.9 ppm), was nur mit einer alternativen Lage der zweiten Doppelbindung zwischen C-10 und C-1 erklärt werden kann (vgl. Schema 16). Das Proton H-1 tritt daher im 1H -NMR-Spektrum als Multiplett (5.59 ppm) und nicht, wie bei **45** bis **47** als Dublett auf. Die Protonen der Methylengruppe 19 kommen jeweils als Dubletts bei 5.01 bzw. 4.27 ppm zur Resonanz. Durch die benachbarte π -Bindung sollte sich die in der Regel negative geminale 2J -Kopplung um theoretisch 1.5 Hz erniedrigen [77]. Tatsächlich beträgt sie hier (-)14.0 Hz während sie bei **45** bis **47** einen Wert von maximal (-)12.9 Hz annimmt.

Bei **48** war die Klärung der Stereochemie mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Im 1H -NMR-Spektrum werden sowohl das α -Proton von C-4 durch die Signale von H-12 α und H-14 (1.98 ppm), als auch das β -Proton durch Protonen der Seitenkette verdeckt (1.4 ppm). Dennoch wurde versucht, mittels zweier NOE-Experimente die Stereochemie an C-6 zu bestimmen. Wie in

Kapitel 8.1.1 beschrieben, wurden dazu die Resonanzfrequenzen von H-6 und H-18 eingestrahlt (vgl. Abbildung 13).

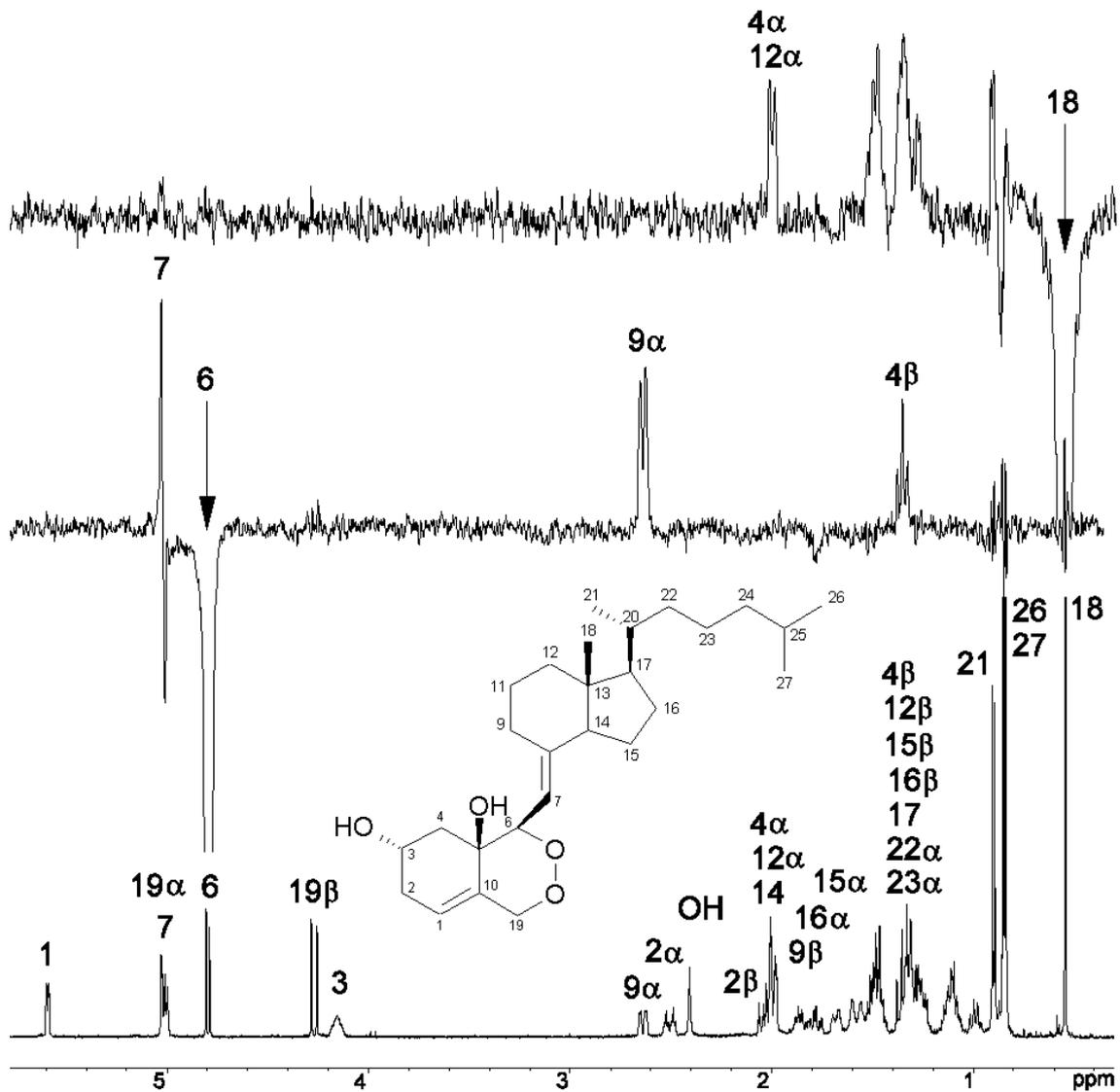


Abbildung 13: Vergleich der NOE-Differenz- und des Protonenspektrums von **48** (500 MHz / CDCl_3)

Durch Einstrahlen der Resonanzfrequenz von H-18 kommt es unter anderem zu einem starken Effekt im Bereich von 2 ppm. Wie eingangs erwähnt, fallen hier die Resonanzen von H- 4α , H- 12α und H-14 zusammen, was eine genaue Zuordnung erschwert. Auffallend ist die hohe Intensität des Effektes im Vergleich zu den Verbindungen **51** und **52** (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 6). Da im homonuklearen NOE-Experiment die Intensitätssteigerung für ein Proton aber maximal 50 % beträgt [78], kann man davon ausgehen, daß sich wenigstens zwei Signale überlagern. H-14 ist aber zu weit von H-18 entfernt,

als daß ein Effekt auftreten könnte. Der Kern-Overhauser-Effekt bei 2 ppm muß daher auf H-4 α und H-12 α zurückgeführt werden. Das Molekül liegt demnach in einer 6(*R*)-Konfiguration vor.

Als nächstes muß die Stereochemie an C-5 gelöst werden, bei dem sich die Hydroxylfunktion entweder auf der gleichen oder der entgegengesetzten Seite der Molekülebene wie H-6 befinden kann. Stehen Alkoholfunktion und H-6 auf der gleichen Seite, so nähert sich H-6 sehr stark der Alkoholfunktion an. Da das Proton H-6 mit 4.80 ppm aber vergleichsweise hochfeldig zur Resonanz kommt, spricht dies für eine entgegengesetzte Anordnung (vgl. Abbildung 14). Das Resultat ist eine 5(*R*)-Konfiguration.

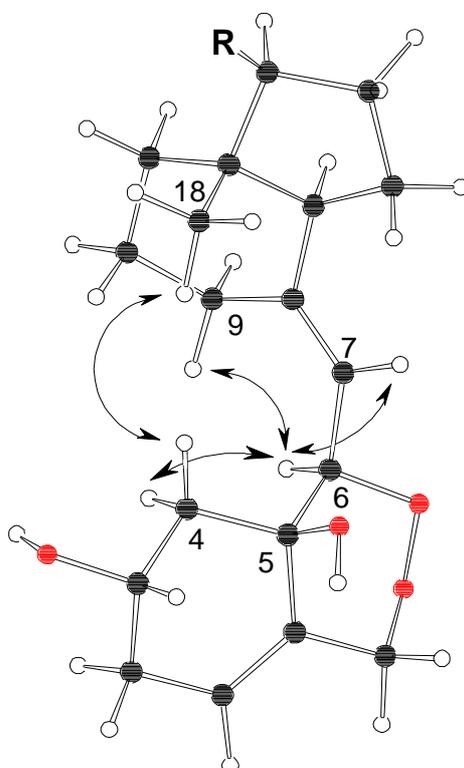


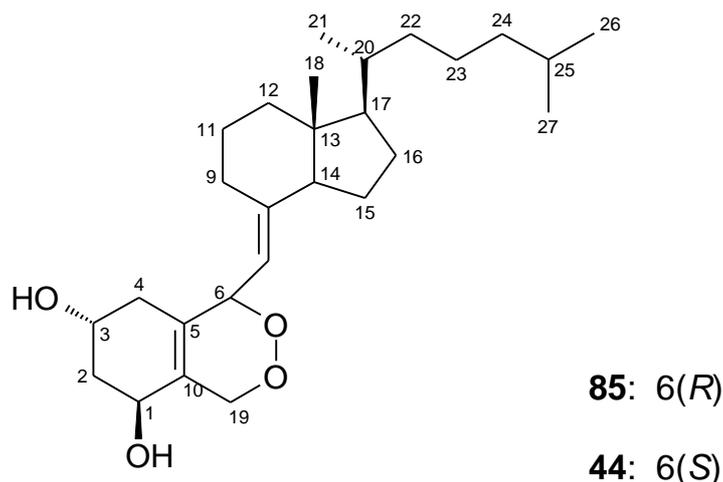
Abbildung 14: Räumliche Struktur und gemessene Kern-Overhauser-Effekte von Verbindung **48**. (Die Seitenkette (R) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.)

Desweiteren sieht man beim Einstrahlen der Resonanzfrequenz von H-6 auch einen deutlichen Effekt bei 1.4 ppm. Durch ein HMQC-Spektrum konnte gezeigt werden, daß neben Protonen der Seitenkette und der Ringe C und D auch H-4 β in diesem Bereich zur Resonanz kommt. Die Protonen der Seitenkette

und der Ringe C und D sind zu weit von H-6 entfernt, als daß ein Kern-Overhauser-Effekt auftreten könnte. Dieser muß demnach durch eine Annäherung von H-6 an H-4 β verursacht werden. Wie anhand von Dreidringmodellen festgestellt wurde, ist eine solche Annäherung nur bei der bereits angenommenen 5(*R*)-6(*R*)-Konfiguration möglich. Verbindung **48** ist aus dem Endoperoxid **14a** entstanden. Durch eine 5-En-Reaktion wurde zunächst das entsprechende Hydroperoxid gebildet, welches nach Reduktion in **48** übergegangen ist.

8.3.5 Das (6*S*)-1a-Hydroxy-Endoperoxid (**44**)

Das Endoperoxid **44** konnte durch Trennung **P7** aus Fraktion A-2 gewonnen werden (vgl. Schema 9).

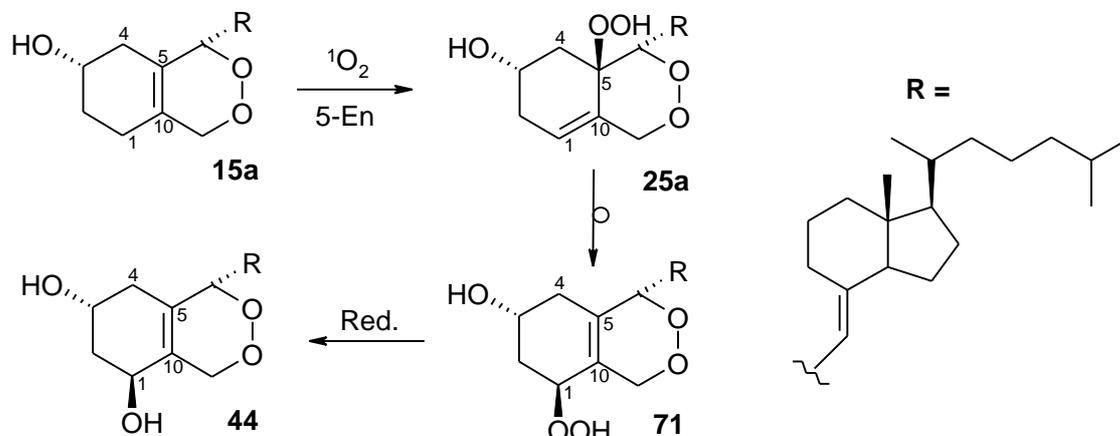


Sowohl **44** als auch sein C-6 Diastereomer **85** wurden bisher erst einmal in der Literatur erwähnt. *Yamada* und Mitarbeiter untersuchten die Verbindungen 1985 auf ihr Vermögen, die Zelldifferenzierung einer menschlichen Leukemie-Zelllinie (HL-60) zu induzieren [37]. In dieser Arbeit sind nur wenige Daten aus den Protonenspektren von **44** und **85** aufgeführt und die Signale sind teilweise nicht vollständig zugeordnet. Wegen der sehr geringen Mengen die isoliert werden konnten, war es der Gruppe ebenfalls nicht möglich, ^{13}C -NMR-Spektren aufzunehmen. Aufgrund der mangelhaften spektroskopischen Daten waren *Yamada* und Mitarbeiter daher auch nicht in der Lage die Stereochemie an C-6 eindeutig zu bestimmen.

Durch NOE-Experimente konnte für **44** die 6(*S*)-Konfiguration ermittelt werden (vgl. Kapitel 8.1.2). Die Verbindungen **44** und **85** wurden im Verlauf der Arbeit auch durch gezielte Derivatisierungen erhalten.

Eine Erklärung für die ungewöhnliche Hydroxylsubstitution von **44** liefert eine mögliche Autoxidationsreaktion mit nicht sensibilisiertem Sauerstoff. Diese sehr selektiven Reaktionen laufen häufig in Allylstellungen ab [79], wodurch eine Hydroperoxyfunktion an C-1 des Moleküls eingeführt wird. Wie das Auffinden der hydroxylsubstituierten Endoperoxide **45** bis **48** zeigt, kann das gebildete A-Ring-Hydroperoxid sehr leicht zur entsprechenden Alkoholverbindung **44** reduziert werden. Autoxidationsreaktionen laufen jedoch sehr viel langsamer als Umsetzungen mit Singulett-Sauerstoff ab [62], was gegen einen solchen radikalischen Reaktionsverlauf spricht. Außerdem konnten während der Blindversuche Triplett-Sauerstoff-Oxidationsprodukte nur in Spuren gefunden werden. Sehr viel wahrscheinlicher ist daher, daß **44** das Folgeprodukt einer 5-En-Reaktion ist (vgl. Schema 17).

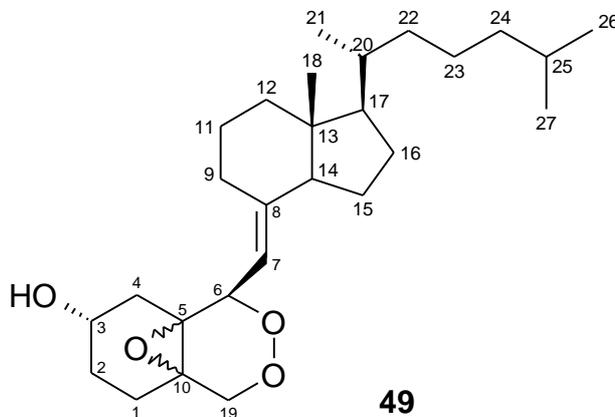
Schema 17



Infolge dieser En-Reaktion bildet sich zunächst das 5(*R*)-Hydroperoxid **25a**. Als tertiäres Hydroperoxid unterliegt **25a** sehr leicht einer Allylumlagerung [80], an dessen Ende sich das 1 α -Hydroperoxid **71** findet. Aus diesem kann **44** durch Reduktion entstehen. Allylumlagerungen von Hydroperoxiden lassen sich bereits durch einfaches Erwärmen hervorrufen [81] und werden gerade bei Steroiden häufig beobachtet [80, 82].

8.3.6 Das (6*R*)-6,19-Epidioxy-5,10-Epoxy-9,10-seccholesta-7-en-3*b*-ol (**49**)

Durch die Trennung **P9** wurde aus Fraktion A-3.2 epoxydierte Endoperoxid **49** erhalten. **49** stellt eine neue Verbindung dar.



Im Massenspektrum nach chemischer Ionisation mit Ammoniakgas zeigt sich das Molekülion von **49** als $[M+NH_4]^+$ - Addukt bei $m/z = 450$. Nach Elektronenstoßionisation tritt als höchstes Signal aber lediglich ein $[M - H_2O]^+$ -Fragment auf ($m/z = 414$). Die Eliminierung eines zweiten Wassermoleküls konnte nicht beobachtet werden, weshalb, im Gegensatz zu den zuvor besprochenen Endoperoxiden, keine zweite Alkoholfunktion im Molekül vorkommen sollte.

Im ^{13}C -APT-Spektrum kommt im olefinischen Bereich lediglich ein quartäres, sowie ein tertiäres Kohlenstoffatom zur Resonanz. Diese können auch hier der Doppelbindung zwischen C-7 und C-8 zugeordnet werden (vgl. Tabelle 2). Obwohl keine weitere Doppelbindung im Molekül vorhanden ist, gleichen die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome des Ringes A denen der Endoperoxide **14a** und **15a**. Deutlich hochfeldiger kommen aber C-5 und C-10 zur Resonanz (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C-4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
49	21.4	33.0	65.6	27.0	63.8	78.6	112.6	59.5	72.8
14a	23.8	33.3	66.1	31.8	125.9	76.9	115.4	125.8	72.2
15a	24.4	33.7	67.5	30.9	126.8	76.7	114.5	125.9	72.2

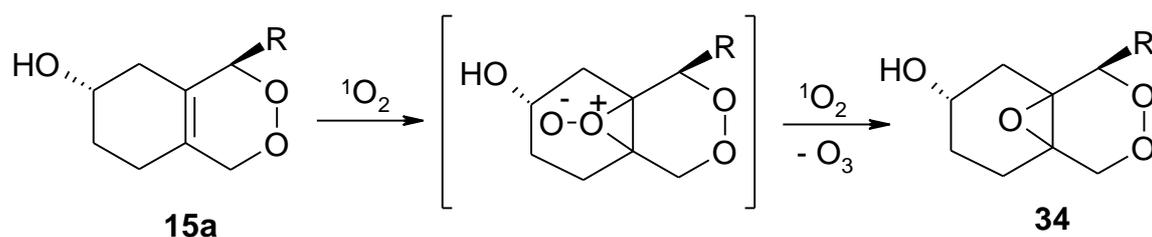
Mit 63.8 und 59.5 ppm passen die chemischen Verschiebungen von C-5 und C-10 zu einer Oxiranfunktion, was ebenfalls durch die Summenformel abgesichert ist.

Im Protonenspektrum von **49** kommt bei 4.23 ppm das Signal der Methylengruppe 19 zur Resonanz. Die geminale Kopplung beträgt 13.4 Hz und ist damit geringer als bei **14a** und **15a** (15.6 Hz). Die kleinere Kopplung der Methylenprotonen von C-19 läßt schließen, daß das benachbarte Kohlenstoffatom C-10 sp^3 -hybridisiert ist (vgl. Tabelle 4). Bei 5.16 ppm und 4.87 ppm treten außerdem die Dubletts des AB-Systems der Protonen H-6 und H-7 auf ($^3J = 10.0$ Hz) und bei 3.88 ppm kommt das Methinproton H-3 als Multipllett zur Resonanz.

Verbindung **49** besitzt drei neue Chiralitätszentren. Durch NOE-Experimente ergab sich die 6(R)-Konfiguration (vgl. Kapitel 8.1.1). Wesentlich schwieriger gestaltete sich die Zuordnung der Stereochemie an den quartären Kohlenstoffatomen C-5 und C-10. Die Chiralitäten sind jedoch nicht unabhängig voneinander, weshalb lediglich zwei Kombinationen möglich sind. Die erhaltenen spektroskopischen Daten lieferten jedoch keinerlei Anhaltspunkte, die auf eine dieser Kombinationen schließen ließen. Die isolierten Vitamin D-Derivate bilden zumeist ein Harz und kristallisieren daher nur sehr schlecht. Aus diesem Grund konnten auch von **49** bis zum Ende der praktischen Arbeiten keine Kristalle und demzufolge auch keine Röntgenstruktur erhalten werden. Die Frage nach der absoluten Konfiguration an C-5 und C-10 muß daher offen bleiben.

Als Folgeprodukt des Endoperoxids **14a** kann **49** durch eine radikalische Reaktion mit Triplett-Sauerstoff oder durch eine Epoxydierung mit Singulett-Sauerstoff entstanden sein (vgl. Schema 18).

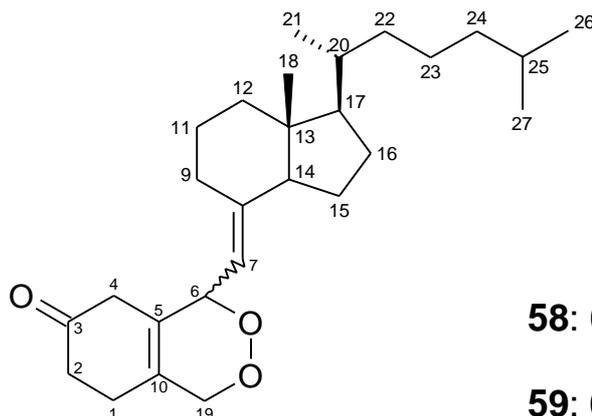
Schema 18



Die Reaktion verläuft vermutlich über die in Schema 18 gezeigte Zwischenstufe und geht mit der Bildung von Ozon einher [83]. Die Epoxydierung gehört nicht zu den besprochenen Hauptreaktionsarten von Singulett-Sauerstoff. Dennoch wurde sie schon häufiger beobachtet und findet sogar praktische Anwendung [84]. Durch Zusatz von Radikalfängern gelang *Schaap* und *Faler* der Nachweis, daß die Bildung von Oxiranen bei der photosensibilisierten Oxidation tatsächlich auf Singulett- und nicht auf Triplett-Sauerstoff zurückgeführt werden kann [85].

8.3.7 Die 6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3-one (58) und (59)

Die Verbindungen **58** und **59** konnten durch die Trennung **SP8** aus Fraktion C-2 erhalten werden. Es handelt sich um diastereomere Endoperoxide (vgl. Tabelle 4), die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben werden.



Beide Verbindungen haben die Summenformel $C_{27}H_{42}O_3$. Im EI-Massenspektrum tritt das Molekülion daher bei $m/z = 414$ auf. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung Vitamin D_3 (**9**) ist die Anzahl an Protonen um zwei reduziert. Mit Verbindung **55** wurde diese reduzierte Protonenanzahl zuvor bereits bei einem Derivat mit einer Carbonylfunktion beobachtet.

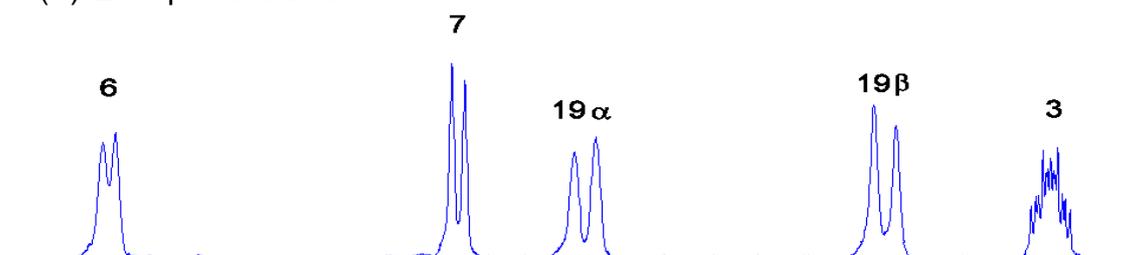
Mit C-3 kommt auch in den ^{13}C -APT-Spektren von **58** und **59** ein Carbonylkohlenstoff zur Resonanz (vgl. Tabelle 12). Die um 10 ppm tieffeldigere Lage als in **55** zeigt, daß keine Konjugation zu einer Doppelbindung vorliegt. Infolge der Carbonylfunktion an C-3 sind auch die Signale der Methylenkohlenstoffe C-1, C-2, und C-4 des Ringes A deutlich zu tieferem Feld verschoben.

Tabelle 12

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
58	25.8	38.1	208.5	39.1	126.9	76.2	114.2	126.9	71.9
59	25.8	38.3	208.8	38.9	127.3	76.3	114.3	126.7	71.9
14a	23.8	33.3	66.1	31.8	125.9	76.9	115.4	125.8	72.2
15a	24.4	33.7	67.5	30.9	126.8	76.7	114.5	125.9	72.2

Eine der beiden Doppelbindungen der Moleküle befindet sich zwischen C-7 und C-8 (vgl. Tabelle 2). In Gegenüberstellung mit den Endoperoxiden **14a** und **15a** hat sich die Lage der zweiten Doppelbindung ebenfalls nicht verändert, wie sich aus den chemischen Verschiebungen der quartären Kohlenstoffatome C-5 und C-10 ergibt.

6(S)-Endoperoxid **15a**



Verbindung **58**

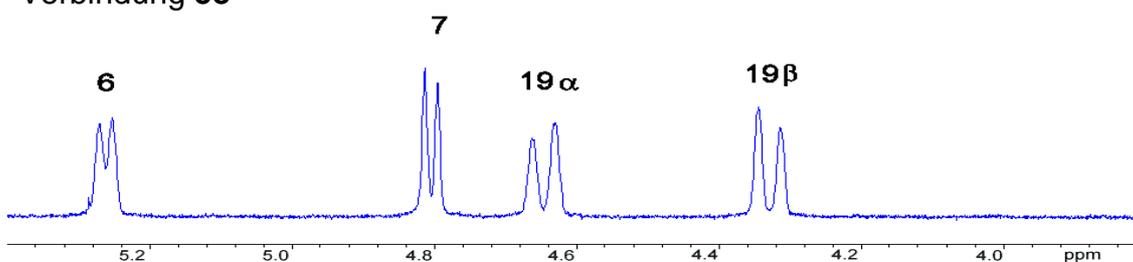


Abbildung 15: Vergleichender Ausschnitt aus den NMR-Spektren des 6(S)-Endoperoxids **15a** sowie Verbindung **58**

Wie Abbildung 15 für Verbindung **58** zeigt, treten im olefinischen Bereich der Protonenspektren noch immer die Signale von H-6 und H-7, sowie die von H-19 auf. Aufgrund der Oxidation der Alkoholfunktion in Position 3 zur Ketogruppe fehlt im Spektrum jedoch das ehemalige Methinproton von C-3. Die Lage der Carbonylgruppe wird durch die Signale der magnetisch nicht äquivalenten Protonen von C-4 zusätzlich abgesichert. Diese kommen zum

einen deutlich tieffeldiger als in **14a** und **15a** zur Resonanz und zum anderen ist die geminale Kopplung der Protonen deutlich vergrößert (vgl. Tabelle 13)

Tabelle 13

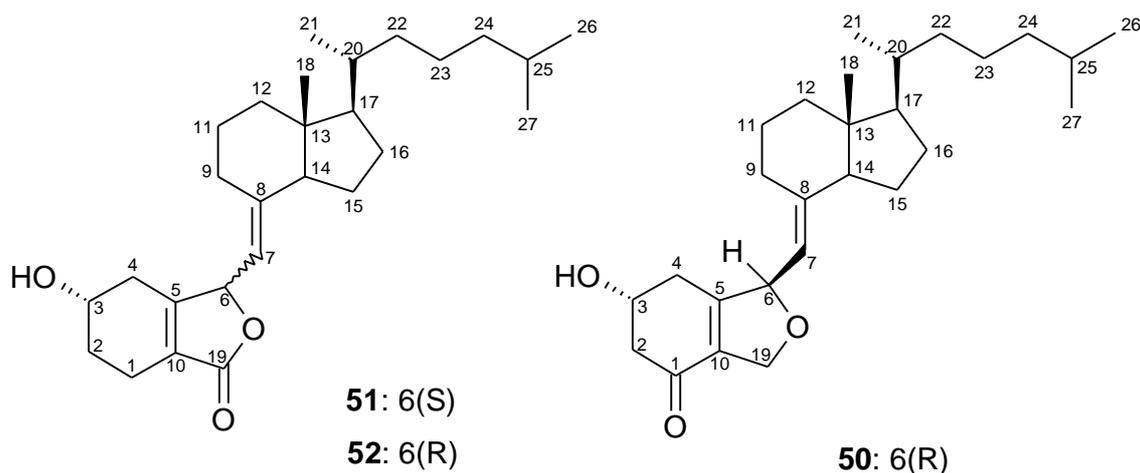
Verb.	Konf.	H-3 [ppm]	H-4a [ppm]	H-4b [ppm]	² J [Hz]	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	³ J _{6/7} [Hz]	C-18 [ppm]
58	6(S)	-	2.83	2.59	20.6	5.26	4.80	8.9	11.8
59	6(R)	-	2.90	2.61	19.1	5.23	4.84	9.3	12.2
14a	6(R)	4.10	2.32	2.0	14.4	5.19	4.92	9.3	12.1
15a	6(S)	3.95	2.1	1.9	<i>m</i>	5.27	4.76	8.9	11.7

Die Ursache für die größeren Kopplungskonstanten sind die beiden benachbarten π -Bindungen [86]. Bei **58** und **59** handelt es sich somit um Oxidationsprodukte der Endoperoxide **14a** und **15a**.

Die Zuordnung der absoluten Konfiguration an C-6 kann durch einen Vergleich der NMR-Spektren von **58** und **59** mit denen von **14a** und **15a** erfolgen (vgl. Tabelle 13). Bei den nicht oxidierten Endoperoxiden kommt der Methylkohlenstoff C-18 bei der 6(R)-Verbindung tieffeldiger als bei der 6(S)-Verbindung zur Resonanz. Das Kohlenstoffatom C-18 liegt auch im ¹³C-NMR-Spektrum von **59** tieffeldiger als in dem von **58**, womit es sich bei **59** um die 6(R)-Verbindung und bei **58** um die 6(S)-Verbindung handeln sollte. Die Zuordnung wird durch die Kopplungskonstanten von H-6 und H-7 im ¹H-NMR-Spektrum bestätigt.

8.4 Verbindungen mit zusätzlichem Fünfring

Die Verbindungen **50** bis **52** besitzen einen zusätzlichen Fünfring. Während es sich bei **51** und **52** um diastereomere Lactone handelt, ist bei **50** die Carbonylgruppe formal von C-19 nach C-1 verlagert. Alle drei Verbindungen wurden in der Literatur noch nicht beschrieben.



8.4.1 Die 6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-19-one (**51**) und (**52**)

Die Verbindungen **51** und **52** konnten durch die Trennung **SP4** aus den Fraktionen A-3.4 und A-3.5 gewonnen werden (vgl. Schema 10).

Die Summenformel der Verbindungen konnte zu $C_{27}H_{42}O_3$ bestimmt werden, weshalb das Molekülion im EI-Massenspektrum bei $m/z = 414$ auftritt. Die ungewöhnlich hohe Intensität des Signals von bis zu 45% spricht für eine hohe Stabilität der Verbindungen. Der Basispeak liegt bei $m/z = 301$ und wird durch den Verlust der Seitenkette verursacht. Es ist lediglich die Eliminierung von einem Wassermolekül zu beobachten ($m/z = 396$), weshalb sich in jedem Molekül nur eine Alkoholfunktion befinden sollte.

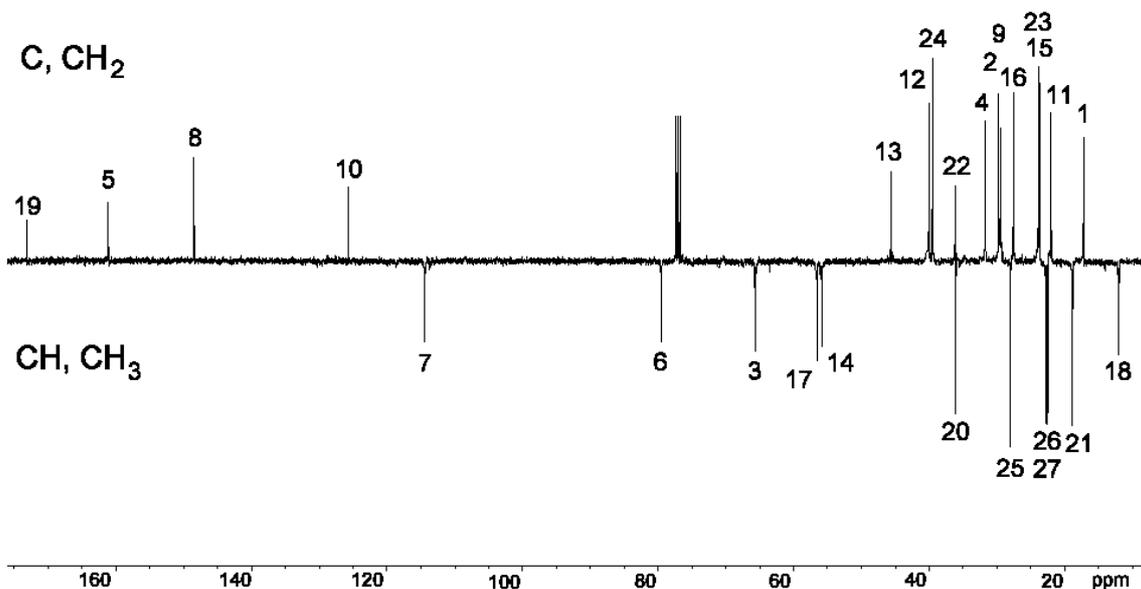
Die Protonenspektren von **51** und **52** sind bis auf minimale Unterschiede identisch. Im olefinischen Bereich treten die zwei Dubletts eines AB-Systems, sowie ein Multiplett auf. Die Signale besitzen jeweils ein Integral von eins (vgl. Tabelle 14).

Tabelle 14

Verbindung	H-3 [ppm]	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	$^3J_{6/7}$ [Hz]
51	4.20	5.60	4.68	8.9
52	4.19	5.59	4.69	8.7

Die chemische Verschiebung sowie die Kopplungskonstante des AB-Systems deutet auf die Protonen an C-6 und C-7 hin. Das Multiplett kann dem Methinproton am alkoholisch substituierten C-3 zugeordnet werden. Im Vergleich zu den Protonenspektren der Endoperoxide **14** und **15** ist jedoch das Fehlen des Methylensignals 19 am auffälligsten.

Diese Methylengruppe tritt in den ^{13}C -APT-Spektren ebenfalls nicht mehr auf. Statt dessen kommt hier ein weiteres quartäres Kohlenstoffatom zur Resonanz. Die recht hohe chemische Verschiebung deutet auf den Carbonylkohlenstoff einer Ester- bzw. Lactonfunktion hin (vgl. Abbildung 16).

Abbildung 16: ^{13}C -APT-Spektrum von **51** (125 MHz / CDCl_3)

Darüber hinaus finden sich mit drei quartären und einem tertiären Kohlenstoffatom vier weitere Signale im Doppelbindungsbereich. Wie in Kapitel 8.1 erläutert, entfallen zwei dieser Signale auf die Doppelbindung zwischen C-7 und C-8. Die chemischen Verschiebungen der verbleibenden beiden quartären Kohlenstoffsignale deuten auf eine Doppelbindung in Konjugation zu einer

Carbonylfunktion hin (vgl. Tabelle 15). Die Resonanz eines Methinkohlenstoffes (C-3) im tieffeldigen Bereich bestätigt zudem das Vorhandensein einer Hydroxylfunktion. Durch ein H,H-COSY-Spektrum konnte gezeigt werden, daß das entsprechende Methinproton mit den Protonen an C-4 koppelt. Bei der Hydroxylgruppe handelt es sich daher um die ursprüngliche Alkoholfunktion von Vitamin D₃ (**9**). Wie die Protonenspektren, so sind sich auch die ¹³C-APT-Spektren der Verbindungen **51** und **52** äußerst ähnlich. Bei genauerer Betrachtung lassen sich jedoch Unterschiede feststellen (vgl. Tabelle 15 sowie Tabelle 1 und Tabelle 2).

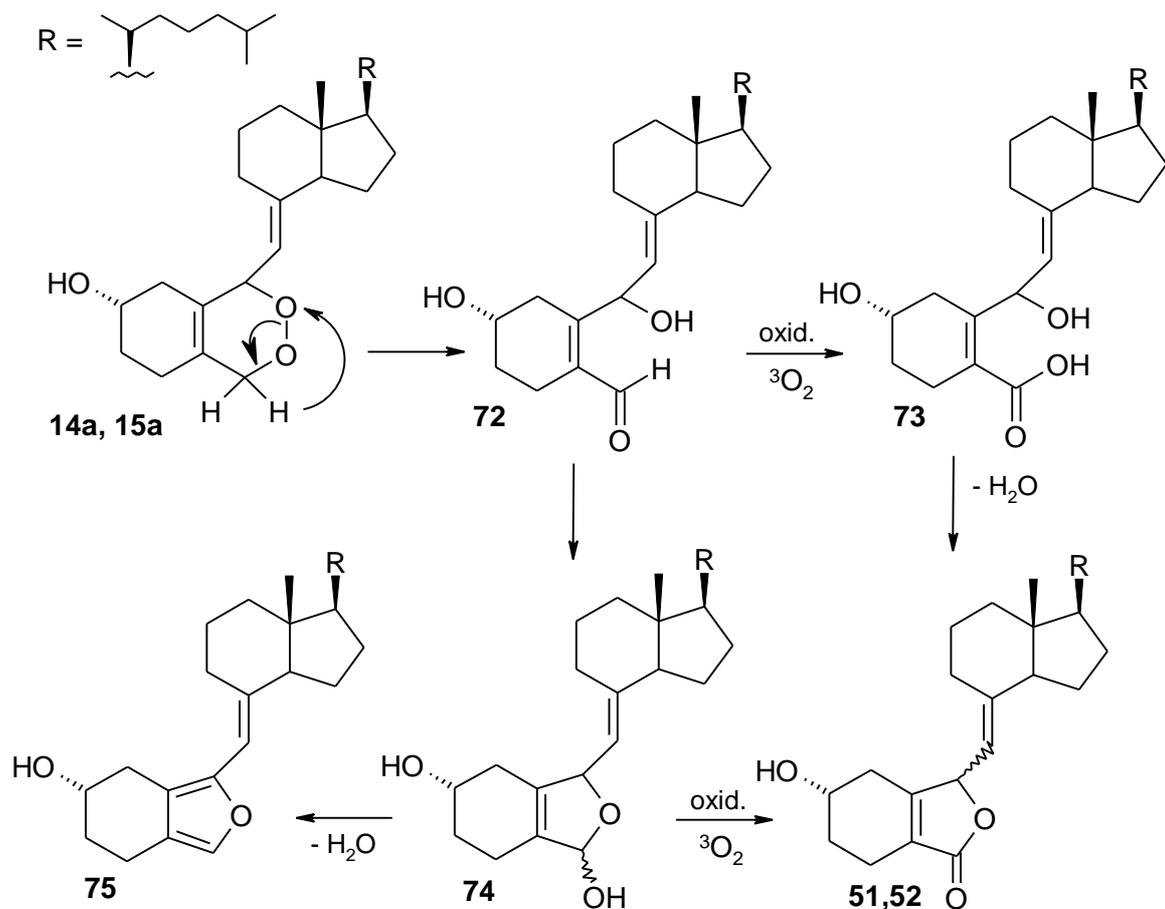
Tabelle 15

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
51	17.6	30.0	66.0	32.0	161.5	79.3	114.4	125.5	173.1
52	17.4	29.8	65.7	31.7	161.0	79.5	114.4	125.7	173.1

So kommt das Chiralitätszentrum C-6 in **52** bei 79.5 ppm zur Resonanz, während dies in **51** bei 79.3 ppm der Fall ist. Das Signal des benachbarten, quartären Kohlenstoffatoms in Position 5 liegt dagegen in **52** um 0.5 ppm hochfeldiger als in **51**. Die genannten spektroskopischen Daten können mit den gezeigten diastereomeren Strukturen in Einklang gebracht werden.

Die unterschiedliche Chiralität an C-6 drückt sich auch in den Drehwerten aus. Während **52** die Ebene des linear polarisierten Lichtes in Methanol um + 44° drehte, erzielte **51** lediglich + 29° im gleichen Lösungsmittel. Die Ermittlung der absoluten Konfiguration der Verbindungen mittels der NOE-Differenz-Spektroskopie wurde bereits in Kapitel 8.1.1 besprochen. Es ergab sich für **51** die 6(S)-Konfiguration und für **52** die 6(R)-Konfiguration. Beide Verbindungen sind aus den entsprechenden Endoperoxiden entstanden (vgl. Schema 19).

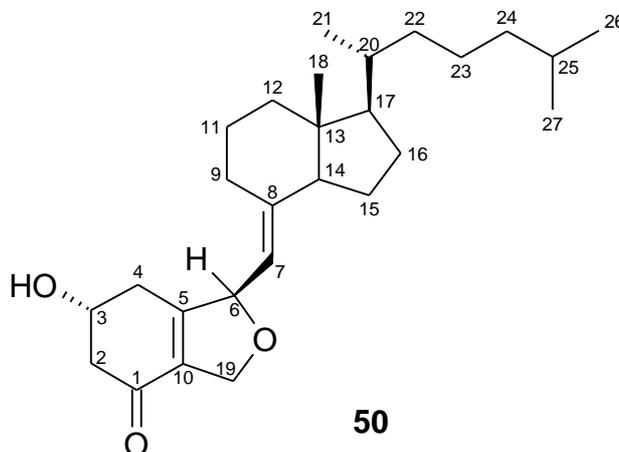
Schema 19



Durch einen 1,3-H-Shift entsteht aus den Endoperoxiden **14a** bzw. **15a** zunächst der Aldehyd **72**. Dieser kann zum einen durch nicht sensibilisierten Sauerstoff zur Carbonsäure **73** oxidiert werden, oder zum anderen in das Halbacetal **74** übergehen. Die Lactone **51** und **52** können wiederum durch Eliminierung von Wasser aus **73** oder durch Oxidation von **74** entstehen. Die Ermittlung, welcher der beiden Reaktionsverläufe vorwiegend oder gar ausschließlich stattfindet, erschien von untergeordneter Bedeutung. Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß **74** auch von *Yamada* und Mitarbeitern als Zwischenprodukt bei der Entstehung des Furans **75** aus den Endoperoxiden **14a** und **15a** genannt wird [35]. Verbindung **75** ist das im Zelldifferenzierungstest wirksame Folgeprodukt der Endoperoxide **14a** und **15a** [37].

8.4.2 (6R)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-1-on (50)

Die Hauptkomponente der Fraktion A-3.3, das (6R)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-1-on (**50**) konnte durch Trennung **SP3** erhalten werden (vgl. Schema 10).



Die hochauflösende Massenspektroskopie der isolierten Verbindung **50** lieferte eine Summenformel von $C_{27}H_{42}O_3$. Wie bei den Verbindungen **51** und **52** ist damit die Anzahl an Protonen im Vergleich zur Ausgangsverbindung Vitamin D_3 (**9**) um zwei reduziert.

Anstelle eines Methylenkohlenstoffes tritt im ^{13}C -APT-Spektrum auch hier das quartäre Kohlenstoffatom einer Carbonylgruppe auf (C-1). Im Gegensatz zu **51** und **52** ist die chemische Verschiebung des Carbonylkohlenstoffes aber deutlich größer (vgl. Tabelle 16), weshalb in diesem Molekül keine Lactonfunktion vorkommen, aber Konjugation zu einer Doppelbindung bestehen sollte.

Tabelle 16

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C-4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
50	194.5	46.2	66.2	34.3	152.3	76.2	112.5	129.6	68.0
51	17.6	30.0	66.0	32.0	161.5	79.3	114.4	125.5	173.1
52	17.4	29.8	65.7	31.7	161.0	79.5	114.4	125.7	173.1

Verbindung **50** hat mit **51** und **52** die Multiplizität der übrigen Kohlenstoffsignale im tieffeldigen Bereich des Spektrums gemeinsam. Hier kommen drei weitere quartäre Kohlenstoffatome, sowie ein Methinkohlenstoff zur

Resonanz. Ein quartäres Kohlenstoffatom sowie der Methinkohlenstoff können der Doppelbindung zwischen C-7 und C-8 zugeschrieben werden (vgl. Tabelle 2), so daß die zweite Doppelbindung allein durch quartäre Kohlenstoffatome gebildet werden muß. Deren chemische Verschiebungen ließen die Konjugation zu einer Ketogruppe annehmen, was durch eine intensive Bande bei 1674 cm^{-1} im IR-Spektrum bestätigt wird. Auffällig ist außerdem die Resonanz des Methylenkohlenstoffes C-19 (68.0 ppm).

Die Protonen von C-19 erscheinen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum als breites Singulett bei 4.76 ppm, womit eine Lactonfunktion wie bei **51** und **52** sicher ausgeschlossen werden konnte. Mit 5.40 und 4.86 ppm befinden sich die beiden Dubletts der Protonen H-6 und H-7 ebenfalls im tieffeldigen Bereich ($^3J_{6/7} = 9.2\text{ Hz}$). Die diastereotopen Protonen von C-2 treten bei 2.75 und 2.60 ppm jeweils als gut sichtbares Doppeldoublett auf ($^2J = 16.6\text{ Hz}$; $^3J_{2/3} = 3.7\text{ bzw } 6.5\text{ Hz}$), was die Nachbarschaft zu einem quartären Kohlenstoffatom beweist.

Im Vergleich zu Vitamin D_3 (**9**) wurde mit der Substitution an C-6 ein zusätzliches Chiralitätszentrum in Verbindung **50** eingeführt. Wie gezeigt wurde, kann die absolute Konfiguration an diesem leicht mittels der NOE-Differenz-Spektroskopie ermittelt werden (vgl. Kapitel 8.1.1). Es ergab sich die 6(*R*)-Konfiguration. Im späteren Zelltest konnte **50** die Sekretion des Nervenwachstumsfaktors NGF in den Extrazellulärraum fördern. Die Wirksamkeit der Verbindung liegt lediglich um einen Faktor zehn unter der von 1α -25-Dihydroxyvitamin D_3 (**8**).

Die Klärung des Bildungsmechanismus von **50** ist nicht trivial. In der Literatur finden sich keinerlei Beispiele für die Umlagerung eines Endo- oder Hydroperoxids zu einer vergleichbaren Verbindung, weshalb die Bildung des Furanrings und die Carbonylsubstitution an C-1 auf unterschiedliche Reaktionen zurückgehen sollten. Die Carbonylfunktion an C-1 kann durch Abspaltung von Wasser aus einer Hydroperoxidfunktion entstehen, was gerade bei α,β -ungesättigten Verbindungen häufig beobachtet wird [82]. Das Auftreten der Hydroperoxidfunktion an C-1 wurde bereits für Verbindung **44** erklärt und ist die Folge einer 5-En-Reaktion mit anschließender Allylumlagerung

(vgl. Schema 17). Wie in Kapitel 9.3 gezeigt wird, kann der Furanring prinzipiell durch Deoxygenation aus dem primär gebildeten Endoperoxid **14a** entstehen.

8.5 Derivate ohne zusätzliches Ringsystem

Bei allen Verbindungen in dieser Reihe ist die semicyclische Doppelbindung zwischen C-10 und C-19 am Ring A noch intakt. Im Vergleich zu den Endoperoxiden ist die in der Regel negative geminale Kopplung der Methylenprotonen von C-19 durch die sp^2 -Hybridisierung des Kohlenstoffatoms vergrößert und erreicht so einen Wert von mehr als (-)2 Hz (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17

Verb.	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]	H-19a [ppm]	H-19b [ppm]	$^2J_{19}$ [Hz]
12a	148.5	110.5	5.05	4.90	< 2
13a	148.4	110.5	5.11	4.94	< 2
12b	148.3	110.2	5.09	4.92	< 2
13b	148.3	110.5	5.10	4.93	< 2
53	150.8	103.8	5.06	4.73	< 2
54	149.5	106.0	4.99	4.79	< 2
60	145.6	115.0	5.23	5.13	< 2

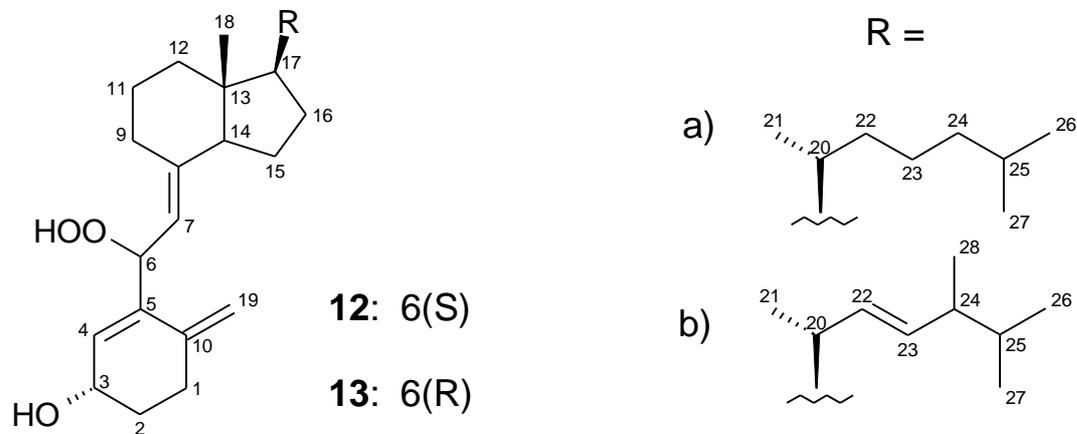
Bei den Verbindungen **53** und **54** ist die semicyclische Doppelbindung nicht konjugiert. Die chemische Verschiebung von C-19 ist daher geringer als bei den anderen Derivaten. Bei **60** (S. 83) ist die Doppelbindung mit einer Carbonylgruppe konjugiert, infolgedessen liegt C-10 hochfeldiger und C-19 tieffeldiger als bei den Hydroperoxiden **12a** und **13a**.

8.5.1. Die Vitamin-D Hydroperoxide 12 und 13

Die diastereomeren Hydroperoxide der D-Vitamine **12a+b** und **13a+b** sind bereits in der Literatur beschrieben worden [35]. Es sollen dennoch einige wichtige spektroskopischen Eigenschaften zusammengefaßt werden.

12 und **13** verfügen über ein konjugiertes Doppelbindungssystem, wodurch ihre Entstehung gegenüber anderen möglichen Hydroperoxiden begünstigt ist. Infolge der Konjugation liegt das Absorptionsmaximum bei 234 nm. Mittels Photodiodenarraydetektor (PDA)-Detektion sind sie daher bereits während der

HPLC-Trennungen gut von den genannten Verbindungen mit Endoperoxidfunktion zu unterscheiden.



Die Ei-Massenspektren zeigen die für Hydroperoxide charakteristischen Fragmentationen [87,88] bei $[M - O]^+$, $[M - H_2O]^+$ und $[M - H_2O_2]^+$. Im Gegensatz zu **12** und **13** fehlen bei allen isolierten Endoperoxiden die durch Abspaltung von Sauerstoff erzeugten Signale, sowie die nach Eliminierung von Wasserstoffperoxid. Abbildung 17 zeigt das unterschiedliche Fragmentierungsmuster am Beispiel des Hydroperoxids **13a** und des Endoperoxids **14a** im Bereich von $m/z = 350$ bis $m/z = 450$. Obwohl beide Verbindungen das gleiche Molekulargewicht haben, können sie damit leicht per (HPLC)-MS unterschieden werden.

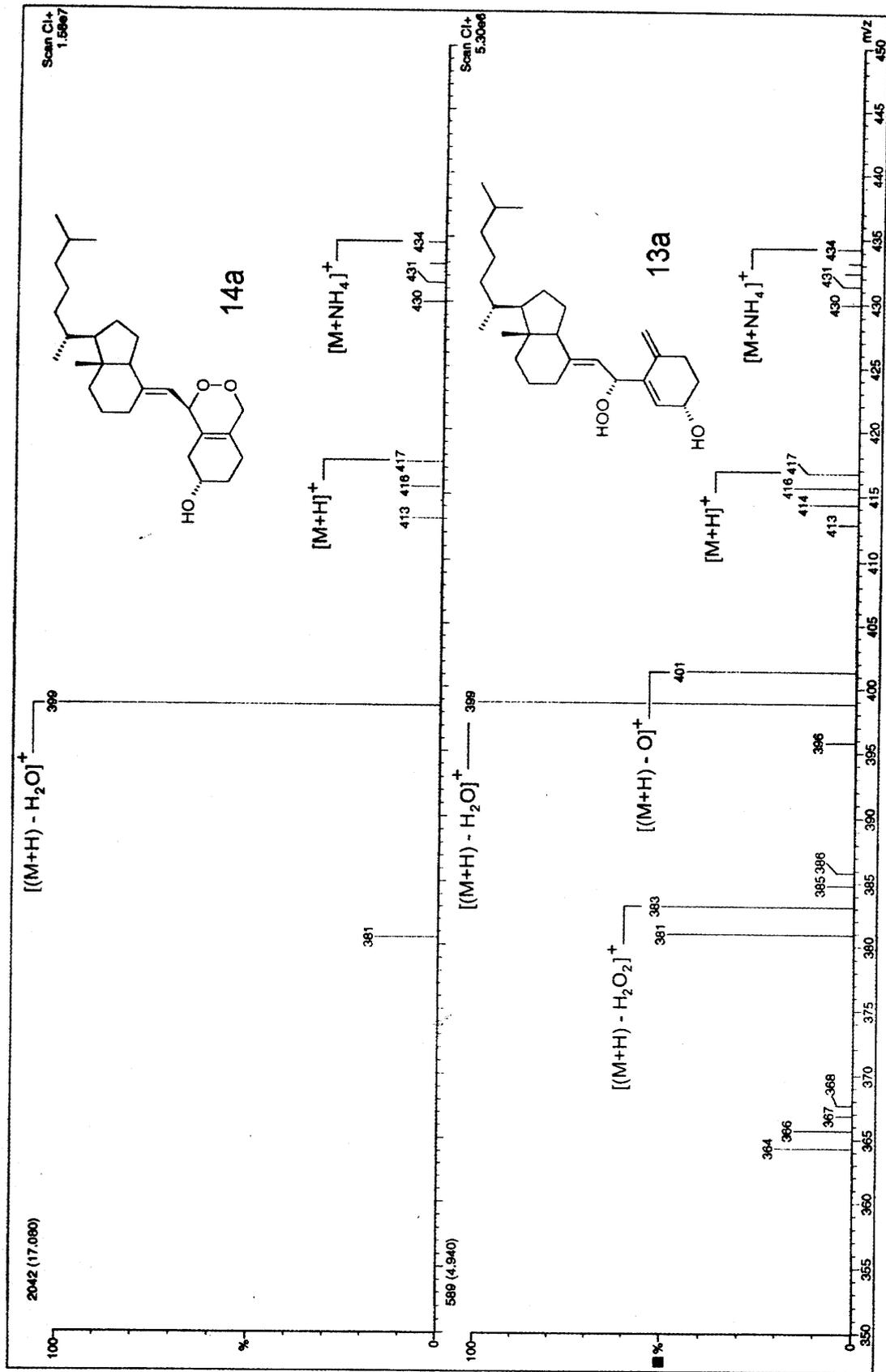


Abbildung 17: Vergleich der Cl^+ -Massenspektren von 14a und 13a

Wie bei vielen anderen organischen Peroxiden [89], so dominiert auch bei **12** und **13** die Abspaltung von Wasser. Ein Molekülpeak konnte daher erst durch chemische Ionisation mit Ammoniak als Reaktandgas erhalten werden.

Die breitbandenkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren der Vitamin D_3 - Derivate **12a** und **13a** zeigen jeweils sechs Signale im olefinischen Bereich, die den drei im Molekül befindlichen Doppelbindungen zugeordnet werden können. (vgl. Tabelle 2 und Tabelle 18).

Tabelle 18

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
12a	29.5	32.3	66.6	130.0	140.0	80.8	117.3	148.5	110.5
13a	29.8	32.5	66.8	130.4	137.8	81.1	117.4	148.4	110.5
12b	29.4	32.2	66.5	129.4	138.1	80.4	117.3	148.3	110.2
13b	29.8	31.8	66.7	130.4	137.8	81.1	117.4	148.3	110.5

Allgemein unterscheidet sich die Lage der Kohlenstoffsignale bei den einzelnen diastereomeren Paaren nur sehr geringfügig. So kommt das Kohlenstoffatom des Chiralitätszentrums C-6 in **12a** lediglich um 0.3 ppm tieffeldiger als in **13a** zur Resonanz. Für die Vitamin D_2 - Derivate **12b** und **13b** zeigt sich die gleiche Tendenz: Das Signal von C-6 tritt bei der 6(S)-Verbindung tieffeldiger als bei der 6(R)-Verbindung auf.

In den ^1H -NMR-Spektren sind deutlich die Protonen der semicyclischen Methylengruppe als Paar von breiten Singulets zu erkennen. Außerdem tritt bei allen Verbindungen das Proton an C-4 als tieffeldigstes Signal auf (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19

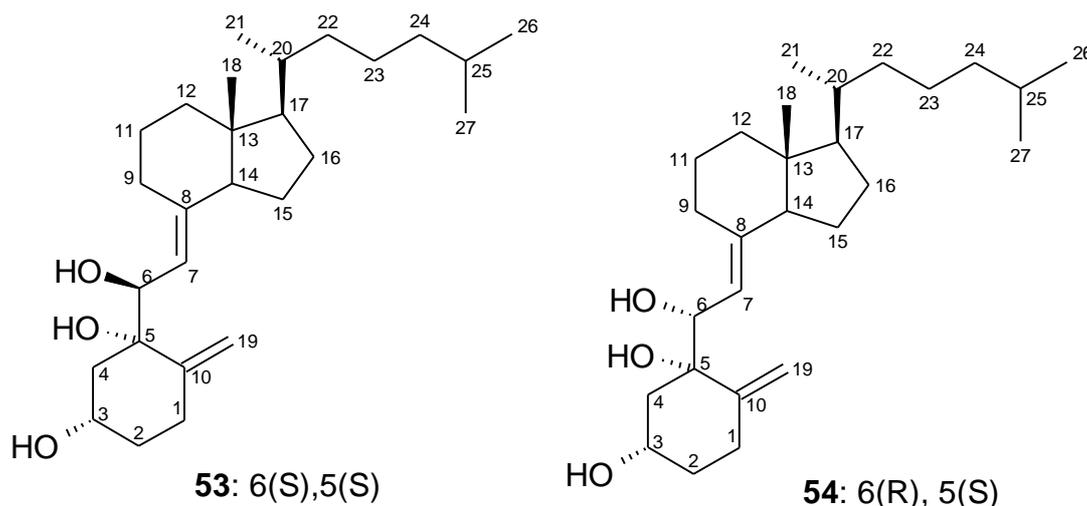
Verb.	Konf.	H-3 [ppm]	H-4 [ppm]	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	$^3J_{6/7}$ [Hz]	H-18 [ppm]
12a	6(S)	4.39	6.00	4.89	5.48	8.3	0.56
13a	6(R)	4.42	6.02	4.97	5.52	8.8	0.49
12b	6(S)	4.39	5.99	4.91	5.49	8.3	0.57
13b	6(R)	4.40	6.01	4.96	5.51	8.7	0.48

Das AB-System von H-6 und H-7 ist ebenfalls deutlich zu erkennen, wobei die Kopplungskonstanten für die 6(*S*)-Verbindungen geringer als für die 6(*R*)-Verbindungen sind. Infolge der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 ist die Resonanz des Protons am hydroxylsubstituierten C-3 im Vergleich zu Vitamin D₃ (**9**) (3.98 ppm) deutlich tieffeld verschoben.

Betrachtet man Dreidringmodelle der einzelnen Verbindungen, so stellt man fest, daß sich bei den 6(*S*)-Verbindungen die Methylgruppe in Position 13 viel stärker an die Hydroperoxidfunktion annähert kann. Die Stereochemie an C-6 sollte sich demnach durch die chemische Verschiebung der Methylprotonen im ¹H-NMR-Spektrum belegen lassen. Wie erwartet liegt deren Resonanz bei **12** tieffeldiger als bei **13** (vgl. Tabelle 19). Dieser Effekt ist aber nicht nur auf die Hydroperoxide beschränkt, sondern läßt sich auch auf entsprechende Alkohol-Verbindungen übertragen [35].

8.5.2 Die 9,10-secocholesta-7,10(19)-dien-3b,5b,6-triole (**53**) und (**54**)

Verbindung **53** konnte aus Fraktion A-4.1 isoliert werden. Verbindung **54** ist die Hauptkomponente der Fraktion A-4.2 und konnte ebenfalls durch die Trennung **SP5** erhalten werden.(vgl. Schema 11). Beide Verbindungen wurden bisher noch nicht in der Literatur erwähnt.



Für die Verbindungen **53** und **54** beträgt die Summenformel C₂₇H₄₆O₃. Im Cl⁺-Massenspektrum treten die Molekülonen mit einer hohen Intensität von bis zu

11% als $[M+H]^+$ -Addukte bei $m/z = 419$ auf. Nach Elektronenstoßionisation sind als größte Massen jedoch nur Fragmentationen bei $m/z = 400$ ($M^+ - H_2O$) erhalten worden. Die deutlichen Signale bei $m/z = 382$ ($M^+ - 2H_2O$) und $m/z = 364$ ($M^+ - 3H_2O$) lassen das Vorhandensein von drei Hydroxylfunktionen in jedem der Moleküle annehmen.

Die ^{13}C -DEPT-Spektren der isolierten Verbindungen zeigen vier olefinische Kohlenstoffsignale. Eine der Doppelbindungen befindet sich zwischen C-7 und C-8 (vgl. Tabelle 2), während es sich bei der zweiten um die semicyclische Doppelbindung des Ringes A handelt. Da die Doppelbindungen nicht konjugiert sind, liegt das Absorptionsmaximum beider Verbindungen bei 210 nm. Besonders auffällig ist, daß mit C-5 und C-6 zwei Kohlenstoffatome um 80 ppm zur Resonanz kommen (vgl. Tabelle 20).

Tabelle 20

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
53	28.2	33.0	75.6	43.9	79.5	79.8	118.5	150.8	103.7
54	28.4	32.7	75.9	45.0	80.3	81.4	114.5	149.5	106.0

Die chemischen Verschiebungen von C-5 und C-6 können durch eine Dioxetanfunktion im Molekül erklärt werden [90]. Dies stimmt jedoch nicht mit den Ergebnissen der Massenspektroskopie überein. Desweiteren sind die isolierten Verbindung farblos. Durch eine $\pi_z \rightarrow \pi_y^*$ Anregung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung besitzen die meisten Dioxetane jedoch eine gelbliche Färbung [91]. Aus der Summenformel sowie dem Fragmentierungsmuster im EI^+ -Massenspektrum läßt sich ableiten, daß drei Alkoholfunktionen im Molekül vorhanden sein müssen. Die Hydroxylsubstitution von C-5 und C-6 ist daher die einzig mögliche Erklärung für deren tieffeldige Lage im Spektrum.

In den 1H -NMR-Spektren von **53** und **54** kommen im olefinischen Bereich die Methylenprotonen von C-19 zur Resonanz (vgl. Tabelle 17). Außerdem treten dort die Dubletts von H-6 und H-7 sowie das Methinproton von C-3 auf (vgl. Tabelle 21).

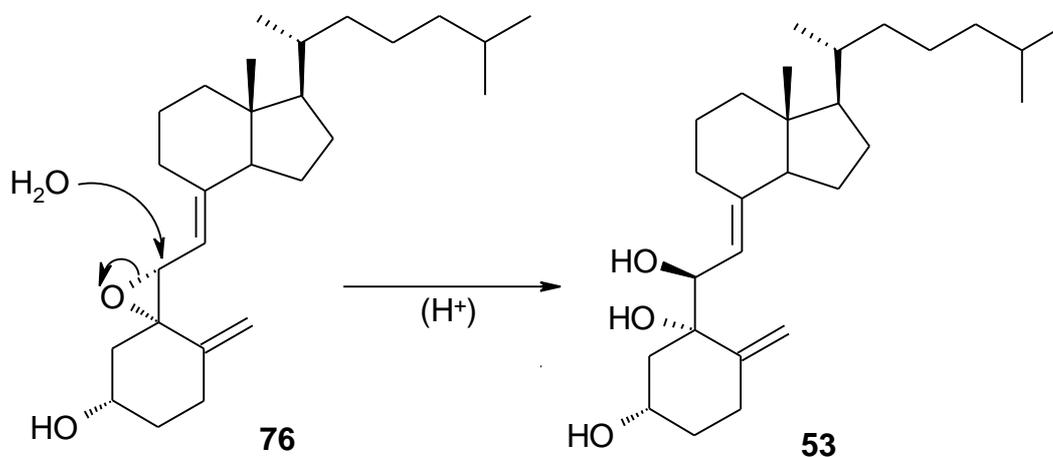
Tabelle 21

Verb.	H-3 [ppm]	H-4a [ppm]	H-4b [ppm]	$^3J_{3/4a}$ [Hz]	$^3J_{3/4b}$ [Hz]	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	$^3J_{6/7}$ [Hz]
53	4.45	2.14	1.64	6.3	0	4.68	4.97	8.8
54	4.49	2.47	1.75	6.4	0	4.67	4.99	8.9

Das HMBC-Spektrum von **53** sollte Aufschluß darüber geben, ob sich die alkoholisch substituierten Kohlenstoffatome C-5 und C-6 tatsächlich auf den gezeigten Positionen befinden. Im HMBC-Spektrum treten deutliche $^3J(\text{CH})$ -Kopplungen der Methylenprotonen von C-19 mit C-5 auf. Auch die Methylenprotonen von C-4 zeigen eine gut sichtbare $^2J(\text{CH})$ -Kopplung mit dem quartären Kohlenstoffatom C-5. Dieser muß sich daher zwangsläufig in der gezeigten Position befinden. Da H-19 auch mit C-1 koppelt und dieses wiederum gut sichtbar mit H-3 in Wechselwirkung tritt, kann auch die Position der semicyclischen Doppelbindung als gesichert gelten. Durch die $^3J(\text{CH})$ -Kopplungen des Methinprotons an C-7 mit C-9 und C-14 wird die Lage der zweiten Doppelbindung ebenfalls bestätigt. Da H-6 und H-7 im Protonenspektrum als AB-System auftreten, ist damit die Position von C-6 ebenfalls festgelegt. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung (**9**) sind die Konnektivitäten demnach erhalten geblieben.

Die Verbindungen **53** und **54** könnten durch eine säure- bzw. basenkatalysierte Ringöffnung aus dem primär gebildeten Epoxid **76** entstanden sein.

Schema 20



Die Reaktion läuft nach einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus ab und umfaßt die Inversion der Konfiguration am reagierenden Kohlenstoffatom. Die Stereochemie an den

Chiralitätszentren C-5 und C-6 ist damit nicht unabhängig voneinander, weshalb lediglich zwei Kombinationen auftreten. Obwohl die Hauptzerfallsprodukte von Dioxetanen Aldehyde bzw. Ketone sind (vgl. Schema 14), wird in der Literatur auch von Diolen berichtet, die aus einem intermediär gebildeten Dioxetan entstanden sind [92]. Das Auftreten der anderen beiden Diastereomere kann damit nicht ausgeschlossen werden.

Zur Klärung der absoluten Konfigurationen von **53** und **54** war sehr hilfreich, daß die vicinale Kopplung von H-4 β mit H-3 im Bereich von 0 Hz liegt (vgl. Tabelle 21). Das Proton H-4 β tritt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum als Pseudodublett auf. Der Diederwinkel zwischen H-3 und H-4 β muß demnach etwa 90° betragen, womit die Konformation des Ringes A in weiten Bereichen feststeht. Um einen genaueren Einblick in die Konformation des gesamten Moleküls zu gewinnen, wurden zunächst von **53** NOE-Differenz-Spektren aufgenommen. (vgl. Abbildung 18).

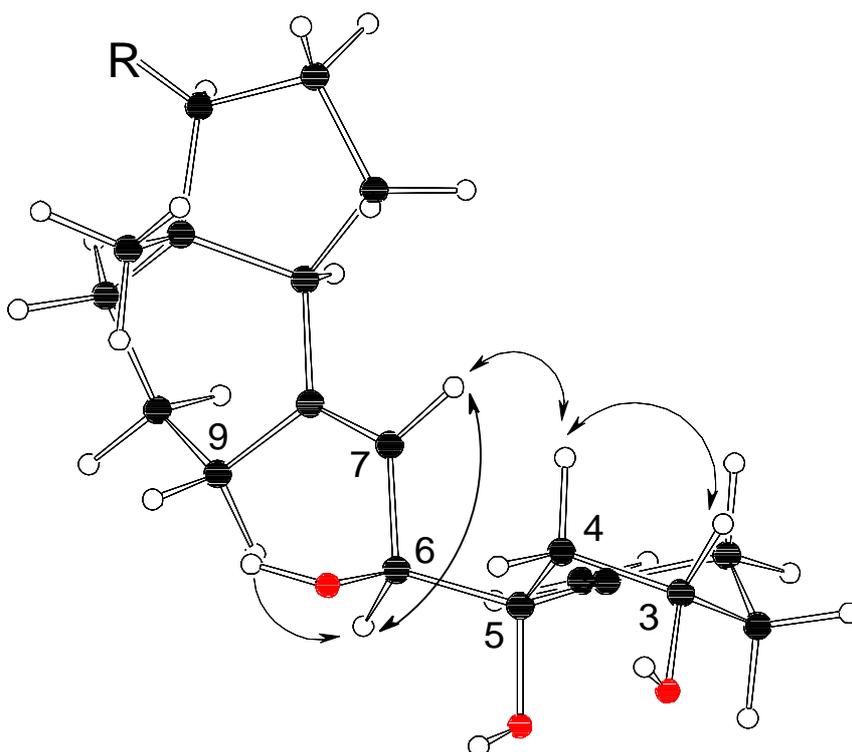


Abbildung 18: Konformation von **53** unter Berücksichtigung der gemessenen Kern-Overhauser-Effekte und ^1H -Kopplungen (Die Seitenkette (R) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet)

Da beim Einstrahlen auf H-6 Kern-Overhauser-Effekte an H-7 und H-9 α auftreten, konnte der mögliche Diederwinkel zwischen H-6 und H-7 auf 140 bis

170° eingengt werden (vgl. Kapitel 8.1.1). Durch die Sättigung der Resonanzfrequenz von H-4 α kommt es zu weiteren deutlichen Effekten bei H-7 und H-3. Bei **53** ist das Proton H-7 demnach räumlich nah an H-4 α . Die gleichen Messungen wurden auch für **54** durchgeführt (vgl. Abbildung 19).

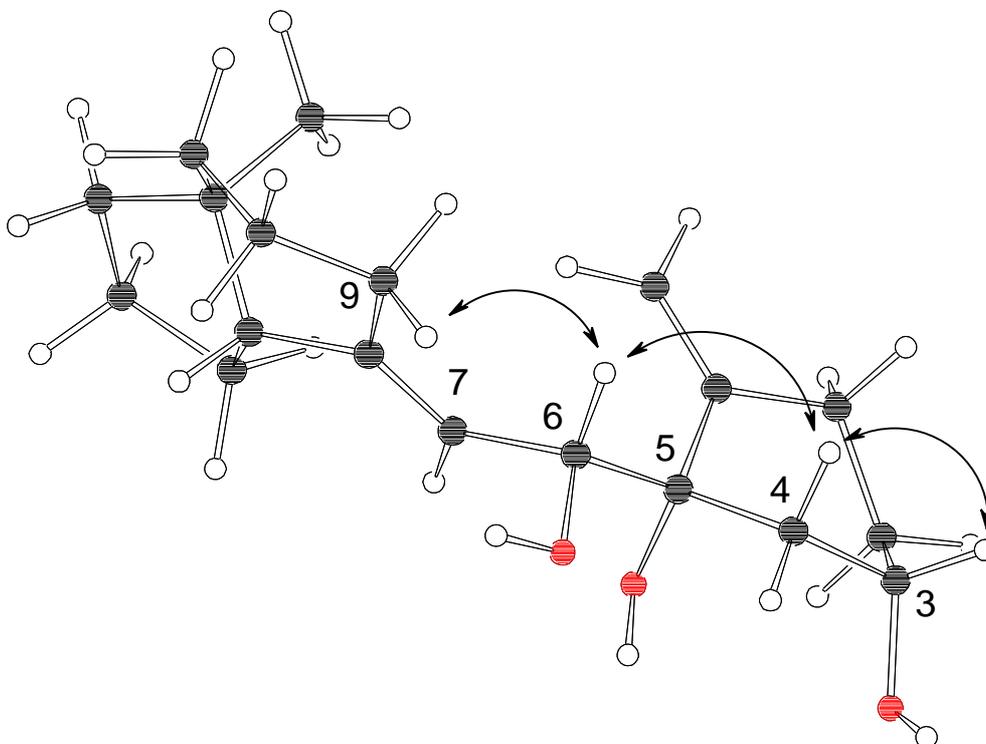


Abbildung 19: Konformation von **54** unter Berücksichtigung der gemessenen Kern-Overhauser-Effekte und ^1H -Kopplungen (Die Seitenkette ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet)

Der Diederwinkel zwischen H-6 und H-7 konnte erneut auf 140-170° eingengt werden. Bei Sättigung der Resonanzfrequenz von H-4 α ergab sich jetzt ein deutlicher Effekt bei H-6 und H-3. Wie man anhand von Dreidringmodellen nachvollziehen kann, ist es weder bei **53** noch bei **54** möglich, bei einer 5(*R*)-Konfiguration die geforderten Bedingungen zu erfüllen. Sowohl bei einer 5(*R*)-6(*R*)- als auch bei einer 5(*R*)-6(*S*)-Konfiguration lassen sich H-7 und H-6 lediglich in räumliche Nähe von H-4 β bringen (vgl. Abbildung 18). Herrscht dagegen eine 5(*S*)-Konfiguration vor, so können sich die Protonen sowohl bei einer 6(*S*)- als auch bei einer 6(*R*)-Konfiguration H-4 α annähern.

Die Verbindungen **53** und **54** liegen demzufolge in der 5(*S*)-Konfiguration vor. Als nächstes muß die absolute Konfiguration an C-6 ermittelt werden. Wie bereits bei den Hydroperoxiden **12** und **13** festgestellt wurde, hat die

Stereochemie an C-6 einen deutlichen Einfluß auf die chemische Verschiebung der C-18 Methylprotonen. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum treten diese daher bei den 6(*S*)-Verbindungen **12a** und **12b** wesentlich tieffeldiger als bei den 6(*R*)-Verbindungen **13a** und **13b** auf. Die C-18 Methylprotonen kommen bei **53** ebenfalls tieffeldiger (0.58 ppm) als bei seinem Diastereomeren **54** zur Resonanz (0.49 ppm). Dieser Befund deutet auf die 6(*S*)-Konfiguration bei **53** hin.

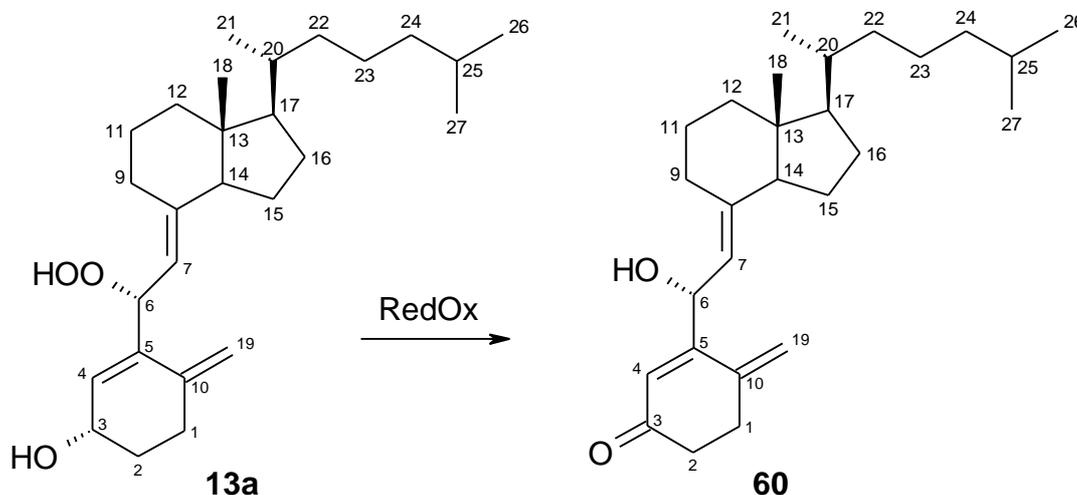
Berücksichtigt man die Nähe von H-7 zu H-4 α in **53**, so befinden sich bei der resultierenden 5(*S*)-6(*S*)-Konfiguration die Alkoholfunktionen an C-5 und C-6 zudem auf der gleichen Seite der Molekülebene, weshalb es zur Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung kommen kann (vgl. Abbildung 18). Würde **53** dagegen in der 5(*S*)-6(*R*)-Konfiguration vorliegen, so befänden sich die Alkoholfunktionen an C-5 und C-6 zwangsläufig auf entgegengesetzten Seiten der Molekülebene. Eine solche Anordnung muß als äußerst unwahrscheinlich eingestuft werden, da es unter diesen Umständen nicht zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung kommen kann. Unabhängig von der absoluten Konfiguration bedeutet eine Wasserstoffbrückenbindung aber einen Stabilitätsgewinn von bis zu 7 kcal/mol [93].

Liegt **54** dagegen in der 5(*S*)-6(*R*)-Konfiguration vor, und berücksichtigt man die gemessenen Kern-Overhauser-Effekte (vgl. Abbildung 19), so kann es ebenfalls zur Ausbildung von stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen kommen. Unter Verwendung eines MM3-Kraftfeldes konnte durch Berechnungen mit dem Computerprogramm ACCUMODEL [94] bestätigt werden, daß die Vorzugskonformationen von **53** und **54** mit einer gleichseitigen Orientierung der Alkoholfunktionen an C-5 und C-6 verbunden sind.

Die chemische Verschiebung der Methylgruppe in Position 13 und die gemessenen Kern-Overhauser-Effekte lassen in Kombination mit der Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen nur den Schluß zu, daß **53** in der 5(*S*)-6(*S*)- und **54** in der 5(*S*)-6(*R*)-Konfiguration vorliegt.

8.5.3 Das (6S)-6-Hydroxy-9,10-secocholesta-4,7,10(19)-trien-3-on (60)

Verbindung **60** konnte durch Trennung **P3** aus Fraktion C isoliert werden. Die Verbindung ist ein Folgeprodukt des Hydroperoxids **13a** und wird in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben.



Während die Hydroperoxidfunktion von **13a** reduziert wurde, ist die Alkoholfunktion in Position 3 wie bei den Endperoxiden **58** und **59** zur Keto-funktion oxidiert worden. Wie schon bei **55** kann eine intramolekulare RedOx-Reaktion mit Sicherheit ausgeschlossen werden, denn in **13a** ist die Hydroperoxidfunktion an C-6 zu weit von der Hydroxylgruppe an C-3 entfernt. **60** kann daher nur durch eine intermolekulare Reaktion entstanden sein, wobei die Oxidation der Alkoholfunktion durch die Entstehung des konjugierten Doppelbindungssystems begünstigt ist.

Mit einer Summenformel von $C_{27}H_{42}O_2$ ist auch bei **60** die Anzahl an Protonen im Vergleich zur Ausgangsverbindung (**9**) um zwei reduziert, was auf die Oxidation der Alkoholfunktion zurückgeführt werden kann. Im EI-Massenspektrum tritt das Molekülion daher bei $m/z = 398$ auf. Ein deutliches $[M-H_2O]^+$ -Signal bei $m/z = 380$ zeigt zudem das Vorkommen einer Alkoholfunktion an.

Im ^{13}C -APT-Spektrum von Verbindung **60** fehlt das Signal des vormals alkoholisch substituierten C-3. Statt dessen ist die Resonanz eines quartären Carbonylkohlenstoffes bei 199.7 ppm zu erkennen. Im tieffeldigen Bereich treten zudem sechs olefinischen Kohlenstoffatome auf. Eine der drei resultierenden Doppelbindungen befindet sich zwischen C-7 und C-8 (vgl.

Tabelle 2). Die zweite Doppelbindung liegt zwischen C-10 und C-19, wie das Signal der Methylenprotonen von C-19 im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum beweist (vgl. Tabelle 17). Aufgrund der chemischen Verschiebungen der olefinischen Kohlenstoffatome muß sich die dritte Doppelbindung in Konjugation zur semizyklischen Doppelbindung und zur Carbonylgruppe befinden. Die Signale von C-4 und C-10 liegen dadurch hochfeldiger als bei den Hydroperoxiden **12a** und **13a**, die von C-5 und C-19 dagegen tieffeldiger (vgl. Tabelle 22).

Tabelle 22

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
60	32.8	38.0	199.7	121.3	159.5	66.5	124.3	145.6	115.0
12a	29.5	32.3	66.6	130.0	140.0	80.8	117.3	148.5	110.5
13a	29.8	32.5	66.8	130.4	137.8	81.1	117.4	148.4	110.5

Das Strukturelement des $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigten Ketons wird durch eine starke Carbonylbande (1668 cm^{-1}) im IR-Spektrum bestätigt. Die Resonanz von C-6 ist im Vergleich zu **12a** und **13a** hochfeldverschoben, weshalb an diesem Kohlenstoffatom keine Hydroperoxidfunktion sondern eine Alkoholfunktion gebunden sein sollte.

Aufgrund der Oxidation der Alkoholfunktion in Position 3 zur Ketogruppe fehlt im Protonenspektrum das Multiplett des Methinprotons von C-3 (vgl. Tabelle 23). Neben den Signalen der Methylengruppe 19 tritt aber noch immer das AB-System von H-6 und H-7 auf.

Tabelle 23

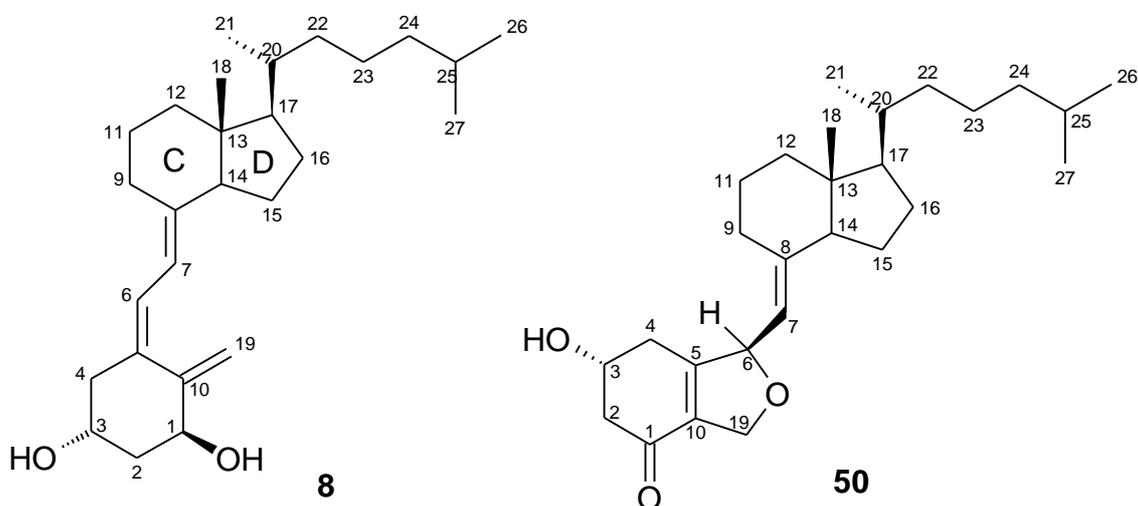
Verb.	Konf.	H-3 [ppm]	H-4 [ppm]	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	$^3J_{6/7}$ [Hz]	H-18 [ppm]
60	6(R)	-	6.32	4.96	5.42	8.9	0.46
12a	6(S)	4.39	6.00	4.89	5.48	8.3	0.56
13a	6(R)	4.42	6.02	4.97	5.52	8.8	0.49
12b	6(S)	4.39	5.99	4.91	5.49	8.3	0.57
13b	6(R)	4.40	6.01	4.96	5.51	8.7	0.48

Mit einer chemischen Verschiebung von 0.46 ppm zeigt sich die Methylgruppe in Position 13 bei sehr hohem Feld. Dies tritt nur dann auf, wenn

Hydroxylfunktion und Methylgruppe im Molekül zu unterschiedlichen Seiten gerichtet sind. Es resultiert die 6(*R*)-Konfiguration. Ein Vergleich der Kopplungskonstante von H-6 und H-7 mit der entsprechenden Kopplungskonstante der Hydroperoxide **12** und **13** bestätigt die 6(*R*)-Konfiguration von **60**.

9. Gezielte Derivatisierungen

Das NGF-induzierende Calcitriol (**8**) besitzt neben der 3 β -Hydroxylgruppe am Ring A zusätzlich eine 1 α -Hydroxylgruppe. Die ebenfalls wirksame Verbindung **50** besitzt neben der 3 β -Hydroxylgruppe zusätzlich an C-1 aber eine Ketofunktion.

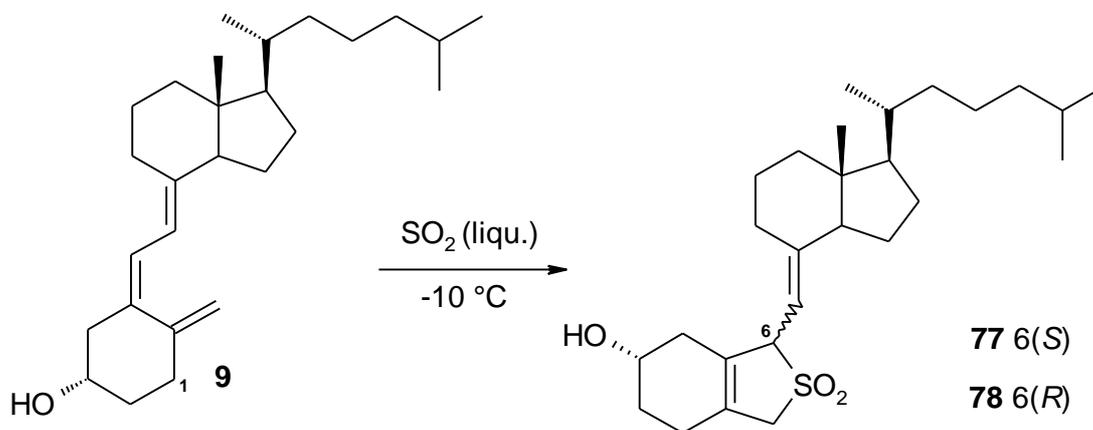


Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte daher überprüft werden, ob ein Sauerstoffsubstituent an C-1 für die Wirksamkeit der Verbindungen tatsächlich notwendig ist. Hierzu wurden zunächst 1 α - und 1 β -Hydroxyvitamin D₃ synthetisiert. Um die entsprechenden Endo- und Hydroperoxidverbindungen zu erhalten, wurde das gewonnene 1 α -Hydroxyvitamin D₃ anschließend mit Singulett-Sauerstoff umgesetzt. Parallel dazu konnte aus den Endoperoxiden **14a** und **15a** durch Deoxygenation mit Triphenylphosphin eine der Verbindung **50** entsprechende Verbindung gewonnen werden, die jedoch keine Carbonylfunktion besaß. Durch die Testung der erhaltenen Derivate konnten weitere Hinweise auf die für eine NGF-Induktion notwendigen Funktionalisierungen von Vitamin D₃ (**9**) erhalten werden.

9.1 Hydroxylierung von Vitamin D₃ in 1-Position

Die regioselektive Hydroxylierung von Vitamin D₃ (**9**) in 1-Position erfolgte in Anlehnung an die Methode von *Hesse* und Mitarbeitern [95] mit Selendioxid. Sowohl bei Vitamin D₃ (**9**) als auch bei seinem 5*E*-Isomer führt die Oxidation mit Selendioxid jedoch zu einer Vielzahl von zum Teil selenhaltigen Produkten. Dafür verantwortlich ist die ungewollte Oxidation der Alkoholfunktion, so daß sich die Verwendung einer Schutzgruppe empfiehlt. Sterisch anspruchsvolle Schutzgruppen verhindern zudem eine *E-Z*-Isomerisierung um die 5,6-Doppelbindung, die sonst bei den Hydroxylierungsreaktionen auftreten. So konnten *Hesse* und Mitarbeiter zeigen, daß **9** nach Einführung einer solchen Schutzgruppe nur sehr langsam reagiert und sowohl die 5*Z*- als auch die 5*E*-Produkte in geringen Ausbeuten gebildet werden. Das geschützte 5*E*-Isomer wurde hingegen sehr schnell hydroxyliert, wobei ausschließlich 5*E*-Produkte in wesentlich höheren Ausbeuten entstanden [95]. Die Isomerisierung der Doppelbindung kann nach *S. Yamada* quantitativ durch eine cheletrope Reaktion von Vitamin D mit Schwefeldioxid erreicht werden [96] (vgl. Schema 21).

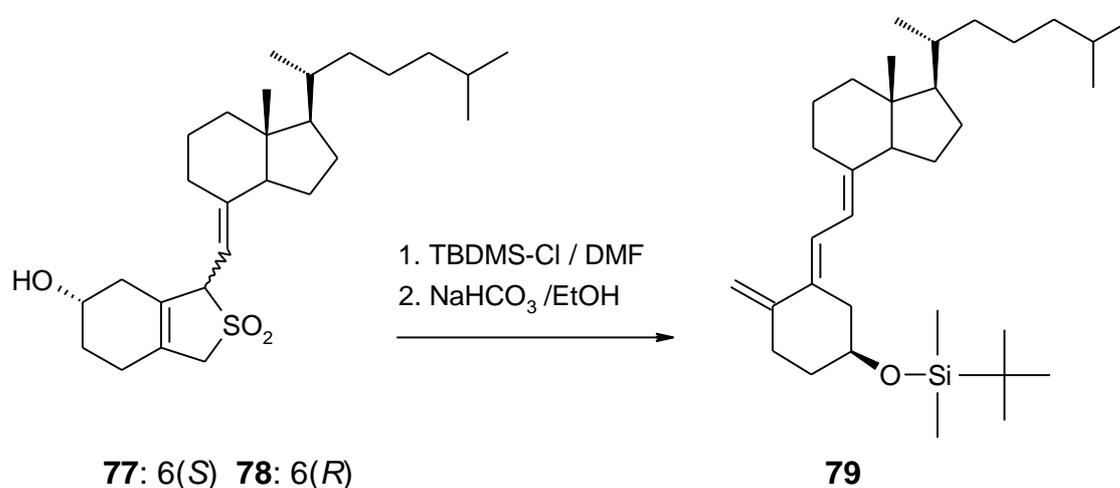
Schema 21



Dazu wurde **9** in flüssigem SO₂ gelöst und bei -10 °C für 30 min refluxiert. Nach Entfernen des überschüssigen Schwefeldioxids durch Destillation und Trocknen im Rotationsverdampfer konnte das Gemisch der diastereomeren SO₂-Addukte **77** und **78** ohne weitere Aufarbeitung dem nächsten Reaktionsschritt zugeführt werden.

An dieser Stelle der Synthese kann sowohl die Einführung der Schutzgruppe, als auch die Eliminierung von Schwefeldioxid erfolgen. Es erschien sinnvoll, zunächst die Alkoholfunktion zu schützen, da diese Strategie bereits während der Synthese von MC-903 (**10**) mit Erfolg eingesetzt wurde [97]. Als Reagenz kam *tert*-Butyldimethylchlorsilan (TBDMS-Cl) in Dimethylformamid zum Einsatz. Das Fortschreiten der Reaktion wurde mit HPLC auf einer RP-Phase (**A2**) verfolgt. Die anschließende thermische Eliminierung von SO₂ erfolgte in siedendem Ethanol unter Zusatz von Natriumhydrogencarbonat (vgl. Schema 22).

Schema 22

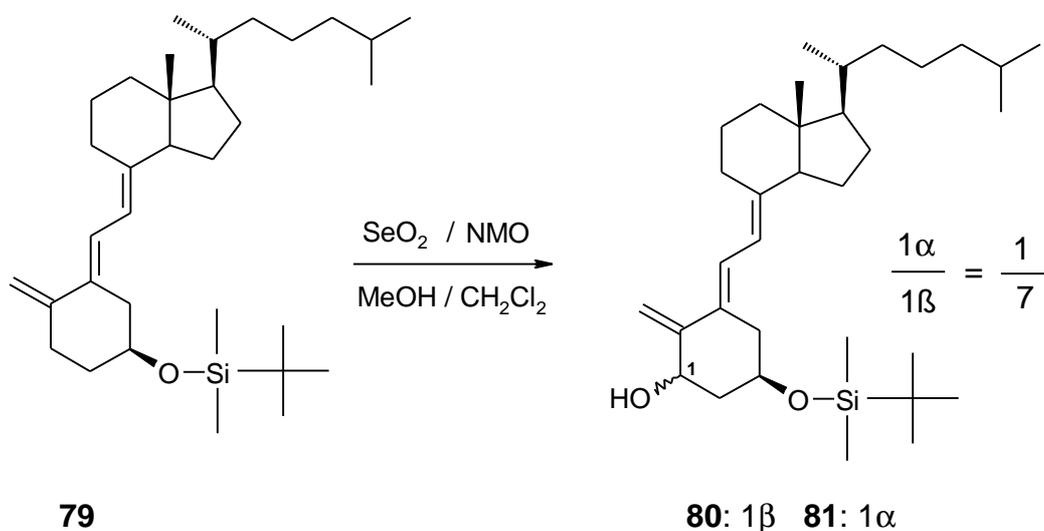


Die gewonnene *5E*-Verbindung **79** wurde durch Flashchromatographie auf Kieselgel mit Hexan/TBME 90:10 als mobiler Phase gereinigt. Während die Verunreinigungen auf der Säule zurückblieben, eluierte das sehr lipophile Vitamin D-Derivat **79** bereits kurz nach dem Totvolumen.

Im Protonenspektrum von **79** ist bei 0.86 ppm deutlich das Singulett der *tert*-Butylgruppe am Silicium zu erkennen. Das Integral von 9 gibt das korrekte Verhältnis von Schutzgruppe zu Ausgangsverbindung wieder. Die zusätzlichen Methylgruppen treten ebenfalls als Singulets bei 0.04 bzw. 0.05 ppm auf. Im breitbandentkoppelten ¹³C-NMR ist deren chemische Verschiebung sogar negativ (-4.7 und -4.6 ppm). Die Spektren geben den hohen Reinheitsgrad von Verbindung **79** wieder, welche in einer Gesamtausbeute von 70% erhalten werden konnte.

Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte die Oxidation mit Selendioxid. Als Oxidationsmittel kam N-Methylmorpholin-N-oxid (NMO) zum Einsatz. Die Reaktionskontrolle wurde auch hier durch HPLC auf einer RP-Phase durchgeführt (System **A3**). Dabei stellte sich heraus, daß während der Umsetzung zahlreiche Nebenprodukte gebildet werden. Durch Integration der Hauptpeaks wurde das Bildungsverhältnis zwischen dem 1 α - und dem 1 β -Hydroxylierungsprodukt zu 1:7 bestimmt.

Schema 23

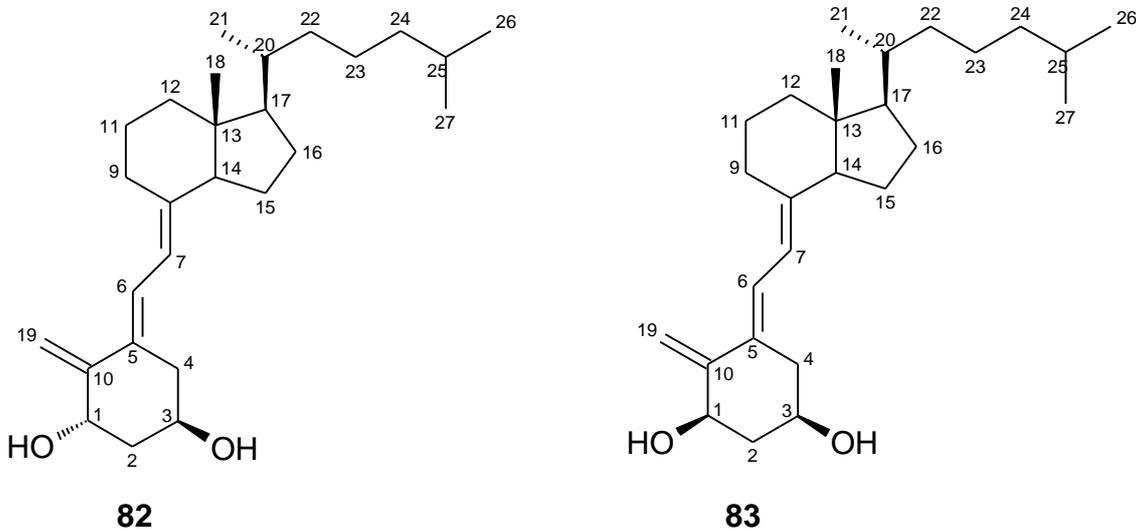


Die deutliche Enantioselektivität zugunsten des 1 β -Produktes **80** resultiert aus der stark bevorzugten equatorialen Anordnung der sperrigen Silyloxy-Gruppe [98]. Die Schutzgruppe erfüllt damit noch eine weitere, wichtige Funktion während der Synthese von 1 α -Hydroxyvitamin D₃.

Der erhaltene orange Feststoff wurde durch Chromatographie auf Kieselgel (Trennung **P3**) gereinigt. Es konnte ein Gemisch der beiden diastereomeren Silylether **80** und **81** gewonnen werden. Mit lediglich 45% war die Ausbeute bedeutend niedriger als bei den vorhergegangenen Reaktionsschritten.

Die anschließende Abspaltung der Schutzgruppe ist eine Standardreaktion und konnte unter milden Bedingungen mit Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran erfolgen. Zur Trennung der Stereoisomere **82** und **83** wurde aus Ethylacetat umkristallisiert. Die 1 β -Verbindung **82** erweist sich hier als bedeutend schlechter löslich und kristallisiert daher zuerst. Durch Chromato-

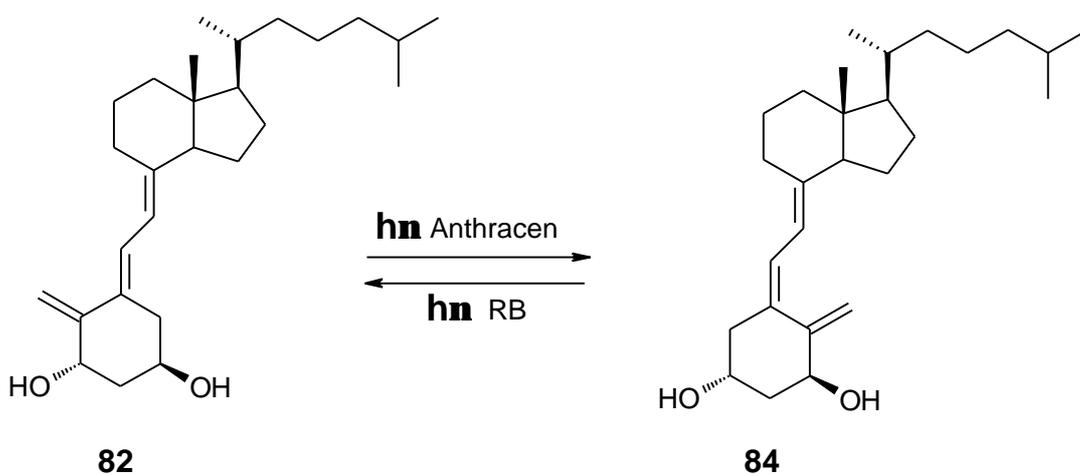
graphie auf einer Umkehrphase (Trennung **P1**) konnte das 1α -Produkt **83** aus dem Konzentrat der Mutterlauge gewonnen werden.



Nach diesen letzten Reinigungsschritten waren die Gesamtausbeuten 28% für das bevorzugte 1β -Produkt **82** und 4% für das weniger bevorzugte 1α -Produkt **83**.

Um $(5E)$ - 1β -Hydroxyvitamin D_3 (**82**) in 1α -Hydroxyvitamin D_3 (**84**) zu überführen mußte lediglich die Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 isomerisiert werden. Dies konnte nach *Gielen* und Mitarbeitern photochemisch geschehen [34] (vgl. Schema 24)

Schema 24



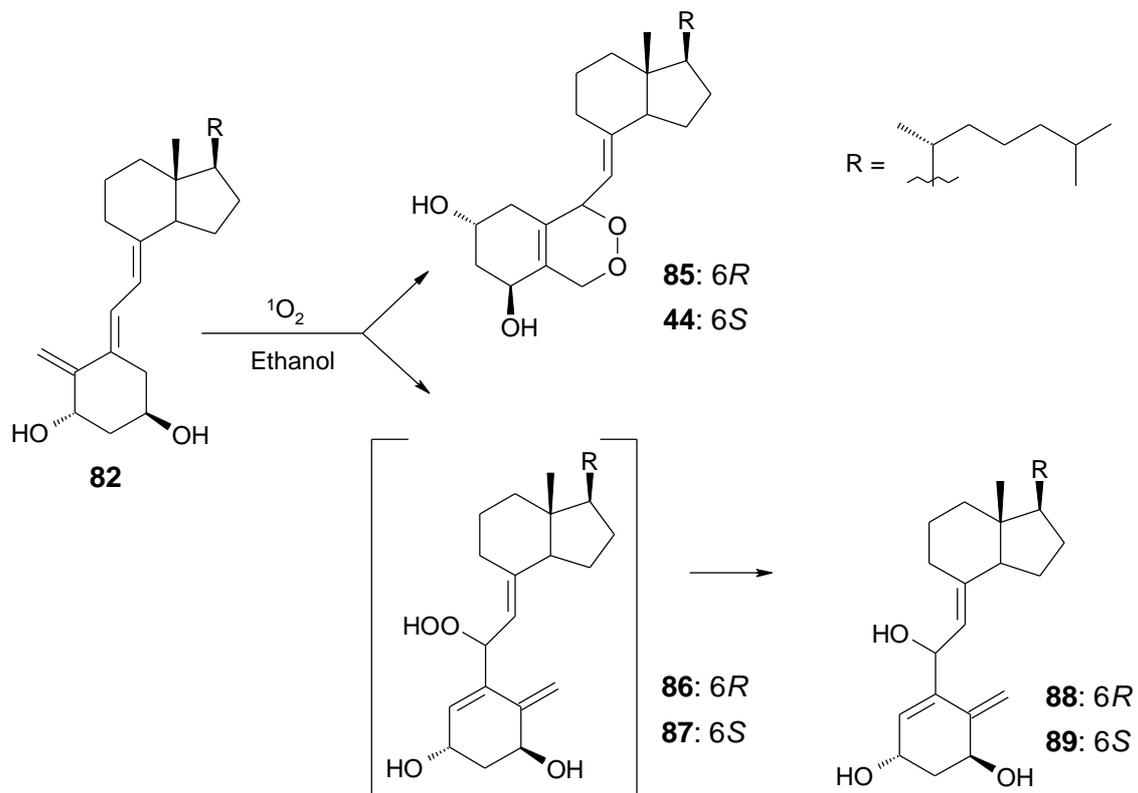
Als Sensibilisator ist prinzipiell auch das bereits während der photo-sensibilisierten Oxidation von Vitamin D_3 eingesetzte Bengalrosa denkbar. Bei

dessen Verwendung liegt das Gleichgewicht der Reaktion aber weit auf der Seite der 5*E*-Verbindung. Sehr viel geeigneter ist hingegen Anthracen. Unter Verwendung dieses Sensibilisators betrug das Verhältnis 2:98 zugunsten der 5*Z*-Verbindung.

9.2 Umsetzung von 1*a*-Hydroxyvitamin D₃ (**84**) mit Singulett-Sauerstoff

Im folgenden Reaktionsschritt geht die Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 verloren (vgl. Schema 25). Eine vorhergehende Isomerisierung zur 5*Z*-Verbindung war daher nicht notwendig, so daß das erhaltene (5*E*)-1*β*-Hydroxyvitamin D₃ (**82**) direkt mit Singulett-Sauerstoff umgesetzt werden konnte. Dies geschah nach der bereits bewährten Methode in Ethanol und mit Bengalrosa als Sensibilisator. Als Lichtquelle kam eine Natriumdampflampe zum Einsatz.

Schema 25

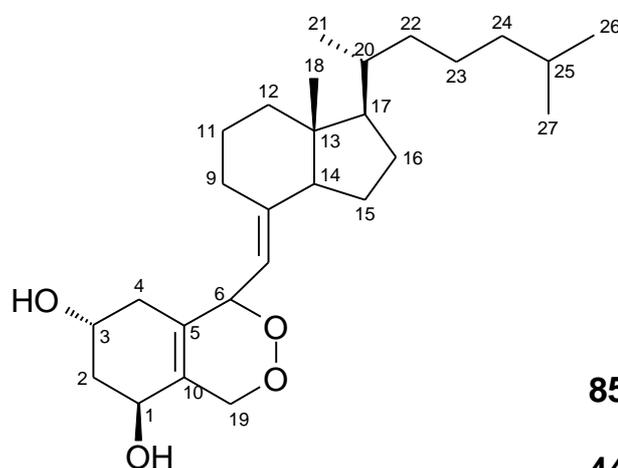


Nach 35 Minuten war im Chromatogramm kein Edukt mehr zu erkennen (System **A3**), so daß die Reaktion abgebrochen wurde, um eine Folgereaktion der Produkte zu verhindern.

Die Endoperoxide **85** und **44** wurden durch Flashchromatographie auf Kieselgel mit reinem Chloroform als mobiler Phase von den übrigen Produkten abgetrennt. Die anschließende HPLC-Trennung mit System **P3** führte in Ausbeuten von 33% (**85**) und 29% (**44**) zu den gewünschten Einzelverbindungen. Die Hydroperoxide **86** und **87** konnten nicht erhalten werden. Stattdessen wurden die entsprechenden, bisher noch nicht beschriebenen, Alkoholverbindungen in vergleichbaren Ausbeuten von 7% (**88**) bzw. 6% (**89**) isoliert.

9.2.1 Die 1a-Hydroxy-Endoperoxide (**85**) und (**44**)

Wie bereits erwähnt, sind in der Literatur von den Endoperoxide **85** und **44** bisher nur wenige Daten aus den Protonenspektren beschrieben worden [37]. Darüber hinaus wurde die absolute Konfiguration an C-6 nicht ermittelt.



Im Rahmen dieser Arbeit konnten genügend große Mengen beider Verbindungen gewonnen werden. Neben ^{13}C -NMR-Spektren konnten jetzt auch zahlreiche der modernen Meßverfahren angewandt werden. Durch NOE-Experimente (vgl. Kapitel 8.1.1) konnte für **85** zweifelsfrei die 6(*R*)-Konfiguration und für **44** die 6(*S*)-Konfiguration ermittelt werden.

Im Vergleich zu den nicht hydroxylierten Endoperoxiden **14a** und **15a** fällt in den ^{13}C -APT-Spektren von **44** und **85** besonders das deutlich tieffeldigere Signal von C-1 auf. Infolge der zusätzlichen Alkoholfunktion am Ring A ist auch die chemische Verschiebung der Methylenkohlenstoffe C-2 und C-4, sowie die der quartären Kohlenstoffatome C-5 und C-10 deutlich größer. Die chemische Verschiebung des Methylkohlenstoffes C-18 reflektiert erneut die unterschiedliche Chiralität an C-6. Bei den 6(R)-Verbindungen **85** und **15a** kommt dieser tieffeldiger als bei den entsprechenden 6(S)-Verbindungen **44** und **14a** zur Resonanz (vgl. Tabelle 24).

Tabelle 24

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C-4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-10 [ppm]	C-18 [ppm]	C-19 [ppm]
85	65.8	40.1	64.3	33.9	130.0	128.3	12.1	70.7
44	65.4	40.9	63.9	34.3	131.2	128.0	11.8	70.3
14a	23.8	33.3	66.1	31.8	125.9	125.8	12.1	72.2
15a	24.4	33.7	67.5	30.9	126.8	125.9	11.7	72.2

Der Gleiche Unterschied in der Signallage von C-18 wurde bereits bei den oxidierten Endoperoxiden **58** und **59** festgestellt.

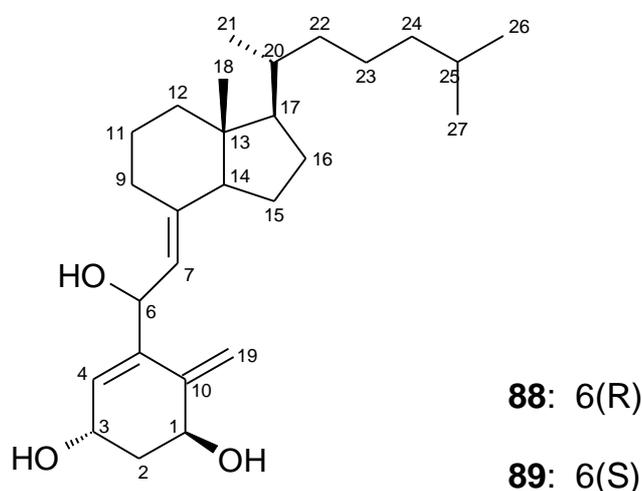
Wie durch ein HMQC-Spektrum und die NOE-Messungen gezeigt werden konnte, tritt auch in den ^1H -NMR-Spektren von **44** und **85** H-6 tieffeldiger als H-7 auf. Die chemischen Verschiebungen der Protonen sind im Vergleich zu den Endoperoxiden **14a** und **15a** nur geringfügig verändert. Die Kopplungskonstante von H-6 und H-7 ist bei **44** und **85** jedoch annähernd gleich (vgl. Tabelle 25).

Tabelle 25

Verb.	Konf.	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	$^3J_{6/7}$ [Hz]	H-18 [ppm]	H-19a [ppm]	H-19b [ppm]	2J [Hz]
85	6(R)	5.13	4.95	9.3	0.53	4.77	4.48	16.1
44	6(S)	5.31	4.69	9.1	0.53	4.68	4.59	15.8
14a	6(R)	5.19	4.92	9.3	0.56	4.48	4.31	15.6
15a	6(S)	5.27	4.76	8.9	0.56	4.60	4.17	15.6

9.2.2 Die 9,10-Secocholesta-4, 7,10(19) -trien-1a,3b,6-triole (88) und (89)

In den EI-Massenspektren zeigt sich der Molekülpeak von **88** und **89** bei $m/z = 416$. Unter diesen Bedingungen erhält man für Hydroperoxide jedoch sehr oft keinen M^+ -Peak, weshalb zur Sicherheit auch Massenspektren nach chemischer Ionisation mit Ammoniak als Reaktandgas aufgenommen wurden. Das höchste Signal ist bei beiden Verbindungen der $[M + H]^+$ -Peak, der bei $m/z = 417$ liegt. Da sich drei Hydroxylfunktionen im Molekül befinden, treten bei beiden Ionisationsarten Fragmentationen bei $m/z = 398$ ($M^+ - H_2O$), $m/z = 380$ ($M^+ - 2H_2O$) und $m/z = 362$ ($M^+ - 3H_2O$) auf. Die hochauflösende Massenspektroskopie lieferte eine Summenformel von $C_{27}H_{44}O_3$.



In den ^{13}C -APT-Spektren von **88** und **89** tritt das Kohlenstoffatom C-6 um über 10 ppm hochfeldiger als bei den Hydroperoxiden **12a** und **13a** auf. Eine Hydroperoxidfunktion an C-6 konnte daher mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Infolge der Hydroxylsubstitution an C-1 liegen die Signale der Kohlenstoffatome des Ringes A tieffeldiger als bei **12a** und **13a**. Die chemischen Verschiebungen der olefinischen Kohlenstoffatome C-4, C-5, C-10 und C-19 lassen zudem keinen Zweifel daran, daß sich die Doppelbindungen von **88** und **89** noch auf den gleichen Positionen wie bei **12a** und **13a** befinden (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 26

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-10 [ppm]	C-19 [ppm]
88	70.0	40.3	64.6	127.7	138.7	66.6	122.3	144.4	111.5
89	70.0	41.8	65.4	128.6	140.3	67.8	124.4	145.0	111.4
12a	29.5	32.3	66.6	130.0	140.0	80.8	117.3	148.5	110.5
13a	29.8	32.5	66.8	130.4	137.8	81.1	117.4	148.4	110.5

In den Protonenspektren von **88** und **89** fällt zunächst das Multipllett des Methinprotons von C-1 auf (4.58 ppm für **88**, 4.36 ppm für **89**). Im olefinischen Bereich des Spektrums treten neben dem Dublett von H-4 und dem AB-System von H-6 und H-7 die Methylenprotonen von C-19 auf. Die 6(S)-Verbindungen **89** und **12a** zeigen die kleineren Kopplungskonstanten von H-6 und H-7, sowie die tieffeldigere chemische Verschiebung der Methylgruppe 18 (vgl. Tabelle 27).

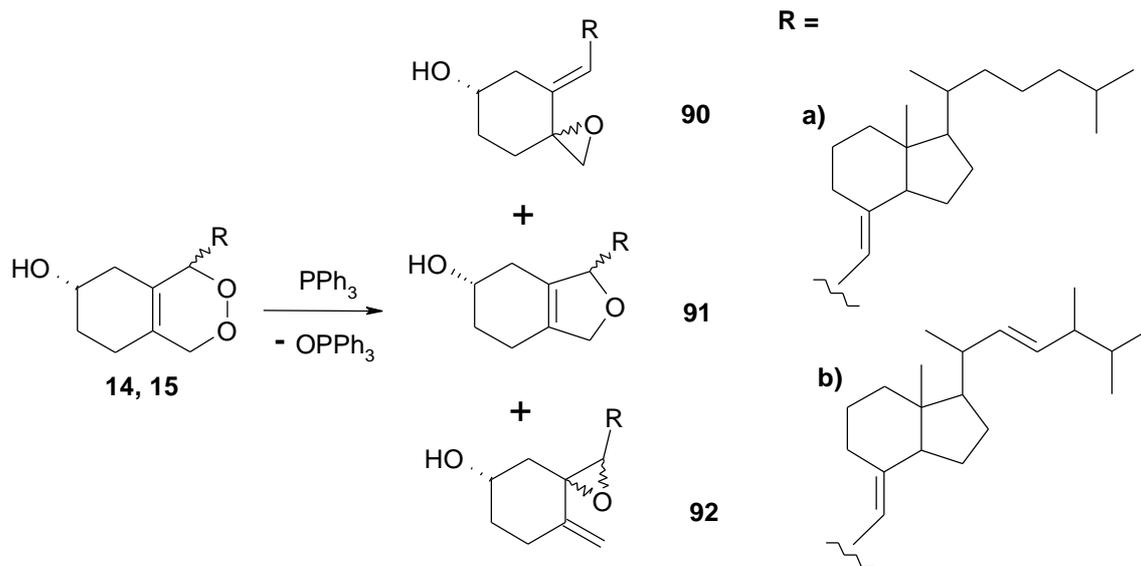
Tabelle 27

Verb.	Konf.	H-4 [ppm]	H-6 [ppm]	H-7 [ppm]	³ J _{6/7} [Hz]	H-18 [ppm]	H-19a [ppm]	H-19b [ppm]	* ² J ₁₉ [Hz]
88	6(R)	6.14	5.01	5.25	8.9	0.47	5.22	5.18	<2
89	6(S)	5.99	4.95	5.08	8.4	0.56	5.12	5.07	<2
12a	6(S)	6.00	4.89	5.48	8.3	0.56	5.05	4.90	<2
13a	6(R)	6.02	4.97	5.52	8.8	0.49	5.11	4.94	<2

9.3 Umsetzung der Vitamin D-Endoperoxide 14 und 15 mit Triphenylphosphin

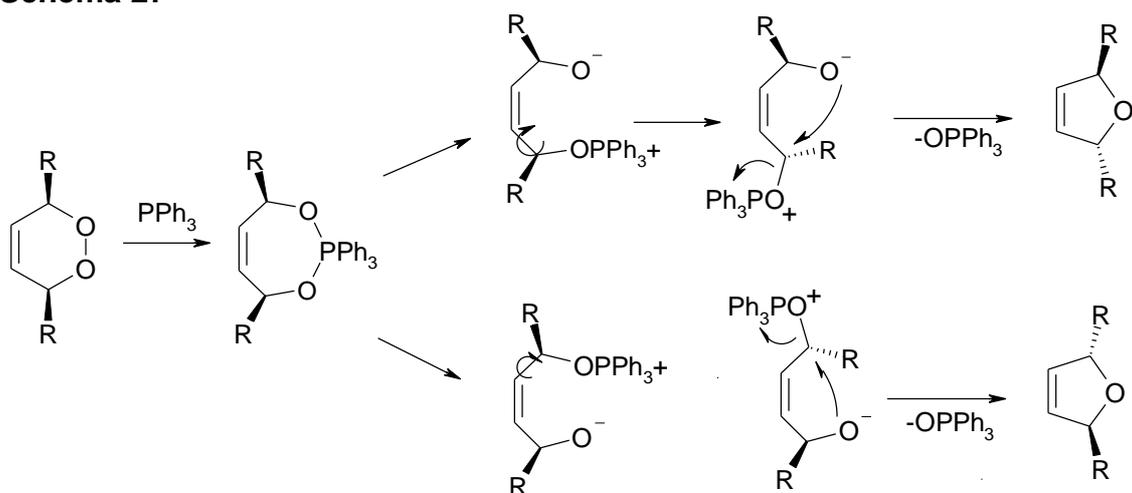
Verbindung **50** induziert die Bildung von NGF. Um festzustellen, ob die Carbonylfunktion an C-1 für die Wirkung notwendig ist, wurde versucht, eine identische Substanz ohne Carbonylfunktion zu synthetisieren. Als eine aussichtsreiche Möglichkeit zu dieser Verbindung zu gelangen erschien die Deoxygenierung der dargestellten Vitamin D-Endoperoxide mit Triphenylphosphin (vgl. Schema 26).

Schema 26



Neben der erwünschten Verbindung **91** können dabei auch Epoxide des Typs **90** und **92** entstehen. Im Verlauf der Reaktion bilden sich zunächst Phosphorane, die anschließend einem thermischen Zerfall unterliegen [99]. Für die Eliminierung des Triphenylphosphinoxids ist dabei eine trans-Konfiguration erforderlich, so daß die Reaktion bei Verbindungen mit gleichen Resten sogar stereospezifisch verläuft [100]. Wie Schema 27 zeigt, ist sie jedoch keinesfalls enantioselektiv.

Schema 27



Für die Endoperoxide von Vitamin D₃ und Vitamin D₂ erhält man daher jeweils Paare von Diastereomeren, die sich in ihrer absoluten Konfiguration an C-6

unterscheiden, weshalb bereits mit sechs Hauptprodukten zu rechnen war. Aufgrund der zu erwartenden Racemisierung war aber eine Trennung der diastereomeren Endoperoxide vor der Umsetzung nicht notwendig.

Ein Gemisch der Verbindungen **14a** und **15a** wurde mit einem Äquivalent Triphenylphosphin in verschiedenen Lösungsmitteln refluxiert. Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC verfolgt. (System **A3**). Während der chromatographischen Kontrollen deutete sich bereits an, daß die Reaktion sehr unselektiv verläuft und es infolgedessen zu einer großen Anzahl an verschiedenen Produkten kommt. Für eine vollständige Umsetzung war je nach Lösungsmittel eine Reaktionszeit von 24h (Toluol) bis 72h (Hexan) notwendig, was für die unerwartet hohe Stabilität der Edukte spricht. Das Auffinden des gewünschten Produkts im Reaktionsgemisch konnte durch die Methode der HPLC-MS-Kopplung sehr vereinfacht werden. Abbildung 20 zeigt eine Gegenüberstellung der Chromatogramme wie sie unter Verwendung der oben genannten Trennbedingungen und anschließender Elektronenstoßionisation erhalten werden konnten.

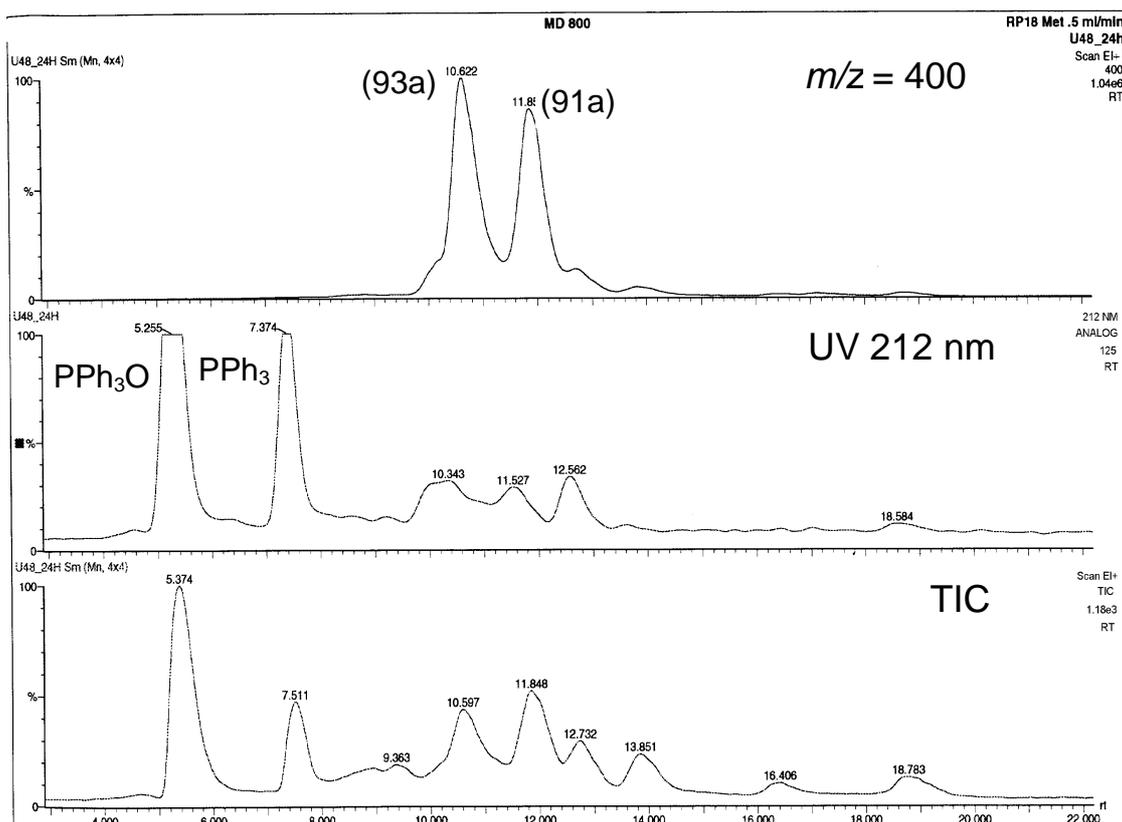


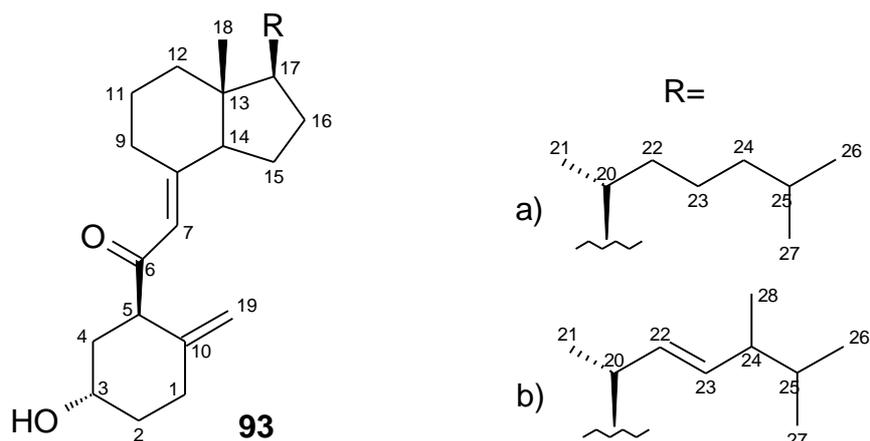
Abbildung 20: Gegenüberstellung von Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC), analog Signal des UV-Detektors bei 212 nm und des Verlaufs der Masse 400.

Die untere Spur zeigt das Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC), welches bei vergleichbarer Ionisierbarkeit der Einzelverbindungen auch Hinweise auf die quantitative Zusammensetzung der Probenlösung gibt. Das UV-Signal, wie es der Detektor der HPLC-Anlage liefert, findet sich in der mittleren Spur. Die großen Signale bei kleinen Retentionszeiten werden durch das gebildete Triphenylphosphinoxid (PPh_3O) und Reste von Triphenylphosphin (PPh_3) verursacht. Dahinter folgen die zahlreichen Signale der Produkte. Es fällt auf, daß im Totalionenstrom-Chromatogramm wesentlich mehr Signale sichtbar sind. Dies ist ein weiterer Vorteil der HPLC-MS-Technik, da Substanzen unabhängig von ihren chromophoren Systemen detektiert werden können. Die obere Spur stellt das Auftreten der Masse 400 dar, die in den Hauptprodukten der Umsetzung von **14a** und **15a** (vgl. Schema 26) vorkommt. Es ist deutlich zu erkennen, daß nur zwei Reaktionsprodukte die geforderte Masse besitzen. Diese Verbindungen, **93a** und **91a** wurden im Anschluß durch eine präparative HPLC-Trennung isoliert (System **P5**).

9.3.1 Das 3 β -Hydroxy-9,10-secocholesta 7,10(19)-dien-6-on (93a)

Die Molekülmasse von der hier erstmals beschriebenen Verbindung **93a** war bereits seit den ersten HPLC-MS Untersuchungen bekannt und wurde durch die hochauflösende Massenspektroskopie zu 400.3329 g/mol bestimmt. Die einzig mögliche Summenformel, die sich daraus konstruieren läßt, ist C₂₇H₄₄O₂. Der Basispeak im EI-Massenspektrum wird durch ein Fragmentation der Masse 289 verursacht, das durch Abspaltung des Ringes A aus dem Molekül entsteht. Anschließend wird aus diesem Fragment Kohlenmonoxid eliminiert, wodurch es ebenfalls zu einem deutlichen Peak bei $m/z = 261$ kommt. Die Abspaltung von Kohlenmonoxid deutet auf ein Keton hin, ein $[M - CO]^+$ - Signal tritt jedoch nicht auf. Nach chemischer Ionisation mit Ammoniak als Reaktandgas bildet das Molekülion den Basispeak als $[M+H]^+$ - Addukt ($m/z = 401$).

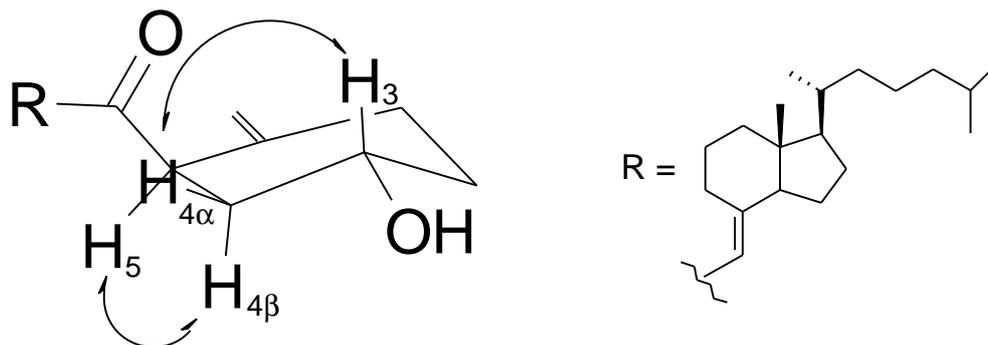
Im ¹³C-APT-Spektrum von Verbindung **93a** fällt bei 201.1 ppm das Signal eines Carbonylkohlenstoffes auf. Im olefinischen Bereich treten zudem vier weitere Signale auf, die von zwei quartären sowie je einem tertiären und einem sekundären Kohlenstoffatom verursacht werden. Durch einen Spektrenvergleich mit Vitamin D₃ (**9**) konnte gezeigt werden, daß sich eine der resultierenden Doppelbindungen zwischen C-7 und C-8 befindet. Wie das Paar von breiten Singulett bei 4.90 und 4.78 ppm im ¹H-NMR-Spektrum unterstreicht, ist die Lage der zweiten Doppelbindung zwischen C-10 und C-19 ebenfalls unverändert zu **9**. Im Gegensatz zu **9** kommt H-7 in **93a** als Singulett bei 6.0 ppm zur Resonanz, womit dessen Nachbarschaft zu dem quartären Kohlenstoffatom C-6 belegt ist. Die sehr tiefe Lage von H-9 α (3.74 ppm) kann mit dem Eintreten des Protons in den negativen Bereich des Anisotropiefeldes der Carbonylfunktion an C-6 erklärt werden. Die genannte spektroskopischen Daten können mit der folgenden Struktur in Einklang gebracht werden.



Aufgrund der Nachbarschaft zu den magnetisch nicht äquivalenten Protonen an C-4 und der Carbonylgruppe sollte H-5 als X-Teil eines ABX-Systems bei recht tiefem Feld auftreten. Wie durch die Aufnahme eines HMQC-Spektrums gezeigt werden konnte, liegt dessen Resonanz mit 3.42 ppm tatsächlich tieffeldig. Da die beiden Dubletts eine ähnliche chemische Verschiebung haben, ergibt sich aber das Bild eines Pseudotripletts.

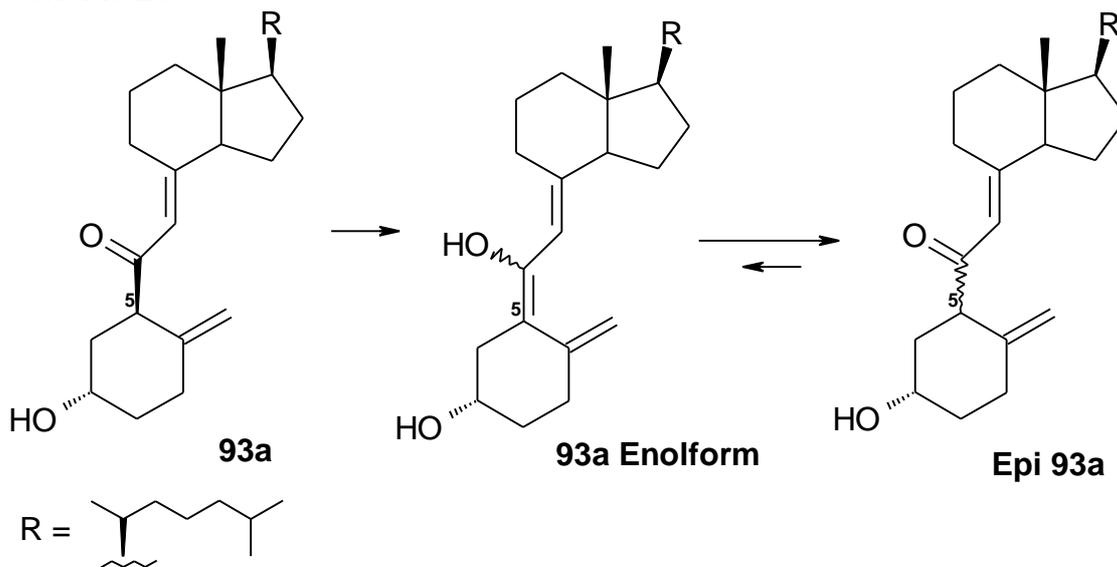
Zur Beantwortung der Frage nach der absoluten Konfiguration an C-5 wurde erneut die NOE-Differenz-Spektroskopie herangezogen. Es wurde die Resonanz von H-3 und H-5 mit selektivem Puls kontinuierlich gesättigt. Da im Bereich von 1.0 bis 2.4 ppm insgesamt 26 Protonen zur Resonanz kommen, mußte eine genaue Zuordnung der NOE-Effekte auch hier unter Einbeziehung der zweidimensionalen Spektren erfolgen.

Durch Einstrahlen auf H-5 erfährt H-4 β einen deutlich positiveren Kern-Overhauser-Effekt als H-4 α . Sättigt man dagegen die Resonanzfrequenz von H-3, so sind die Kern-Overhauser-Effekte genau umgekehrt. Damit ist die räumliche Nähe von H-5 zu H-4 β sichergestellt. H-4 β seinerseits ist aber weiter von H-3 entfernt als sein geminaler Kopplungspartner H-4 α . Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen ergibt sich zwangsläufig die 5(*R*)-Konfiguration (vgl. Abbildung 21).

Abbildung 21: Gemessene Kern-Overhauser-Effekte bei **93a**

Die bisher noch nicht beschriebene Verbindung **93a** ist vermutlich durch Umlagerung aus dem primär gebildeten Epoxid **92** entstanden. Auffällig ist außerdem, daß die Verbindung in ihrer Enol-Form über ein energetisch günstiges, konjugiertes Triensystem verfügt. (Vgl. Schema 28)

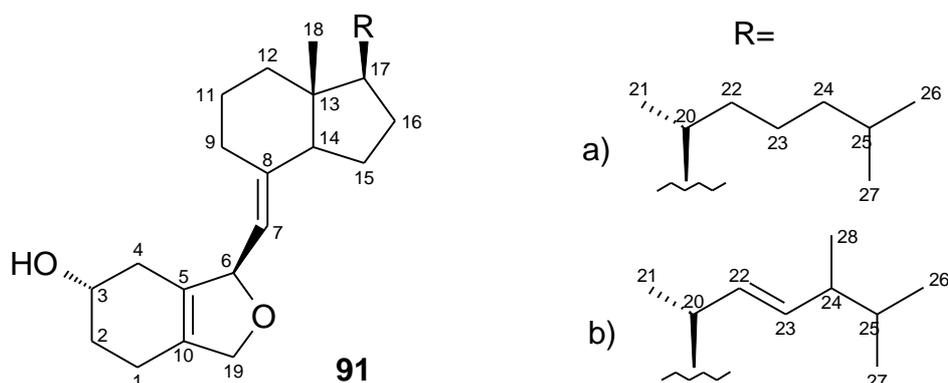
Schema 28



Durch die Keto-Enol-Tautomerie racemisiert das Asymmetriezentrum C-5. Läßt man eine NMR-Probe der Verbindung in Deuteriochloroform stehen, so findet man daher bereits nach wenigen Stunden erste Signale des anderen Diastereomeren im Protonenspektrum.

9.3.2 Das (6R)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien (91a)

Durch hochauflösende Massenspektroskopie erhält man für **91a**, wie für **93a** die Summenformel $C_{27}H_{44}O_2$. In Gegenüberstellung mit **9** befindet sich ein Sauerstoffatom zusätzlich im Molekül. Auch Verbindung **91a** ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden.



Im ^{13}C -APT-Spektrum treten vier olefinische Kohlenstoffatome auf. Die Resonanz eines Carbonylkohlenstoffes kann nicht beobachtet werden. Durch Spektrenvergleich mit Vitamin D_3 (**9**) konnte auch hier eine Veränderung der Ringe C und D sowie der Seitenkette ausgeschlossen werden. Zwei der vier olefinischen Kohlenstoffsignale entfallen demnach auf die Doppelbindung zwischen C-7 und C-8. Wie die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe des Ringes A beweisen, wird die zweite Doppelbindung durch die quartären Kohlenstoffatome C-5 und C-10 gebildet (vgl. Tabelle 28). Im Vergleich zu der an C-1 Carbonylsubstituierten Verbindung **50** ist die chemische Verschiebung von C-5 deutlich geringer. Die Resonanz von C-6 und C-19 liegt dagegen deutlich tieffeldiger, was auf das Fehlen der Carbonylfunktion zurückgeführt werden kann.

Tabelle 28

Verb.	C-1 [ppm]	C-2 [ppm]	C-3 [ppm]	C-4 [ppm]	C-5 [ppm]	C-6 [ppm]	C-7 [ppm]	C-19 [ppm]
91a	19.4.	30.8	67.2	29.1	131.3	83.4	130.9	76.0
50	194.5	46.2	66.2	34.3	152.3	76.2	129.6	68.0

Mit 4.14 ppm treten die Methylenprotonen von C-19 im tieffeldigen Bereich des ^1H -NMR-Spektrums auf. Die geminale Kopplungskonstante von 11.1 Hz beweist die sp^3 -Hybridisierung des Kohlenstoffatoms C-19. Durch den gespannten Fünfring ist der Betrag der Kopplungskonstante geringer als bei den Endoperoxiden (ca. 15 Hz). Die Dubletts von H-6 und H-7 treten mit 5.43 (H-6) und 4.82 ppm (H-7) im gleichen Bereich wie bei **50** auf (H-6: 5.40 ppm; H-7: 4.86 ppm). Die Kopplungskonstante von H-6 und H-7 ist bei beiden Verbindungen ebenfalls identisch. Bei **91a** handelt es sich um die gesuchte Verbindung aus Schema 26.

Durch NOE-Experimente wurde die 6(R)-Konfiguration ermittelt (vgl Kapitel 8.1.1) Die wirksame Verbindung **50** liegt ebenfalls in der 6(R)-Konfiguration vor. Bis auf die zusätzliche Carbonylfunktion an C-1 entspricht **50** damit **91a**. Im Gegensatz zu **50** führte die Gabe von **91a** im Zelltest zu keiner vermehrten Ausschüttung von NGF. Die Carbonylfunktion an C-1 ist daher für die Wirksamkeit von **50** unbedingt erforderlich.

Auf gleichem Wege ließen sich auch die entsprechenden Verbindungen aus den Endoperoxiden des Ergocalciferols **14b** und **15b** gewinnen. Die NMR-Spektren von **93b** und **91b** unterscheiden sich kaum von denen der Verbindungen **93a** und **91a**. Differenzen treten nur durch die zusätzliche Doppelbindung sowie die weitere Methylgruppe in Position 24 auf.

10. Untersuchungen zur NGF-induzierenden Wirkung von Vitamin D-Derivaten

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (**8**) ist in der Lage, die endogene Produktion von NGF im Gehirn zu erhöhen. Von *Neveau* und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, daß durch die Gabe von **8** zu Astrozytenkulturen die NGF-Konzentration im Extrazellularraum um einen Faktor 4-5 gesteigert werden kann [101]. Diese dramatische Steigerung erzielten sie vorwiegend bei Zellen, die mit niedrigen Konzentrationen von **8** vorbehandelt worden waren (Boost-Effekt). Astrozyten sind demnach Zielzellen für dieses Vitamin D-Derivat [102]. Durch Versuche an Astrozytenkulturen von neugeborenen Fischer 344-Ratten sollten die Ergebnisse der französischen Forschergruppe zunächst bestätigt werden und für **8** diejenige Konzentration und Inkubationszeit ermittelt werden, die zu einer maximalen Ausschüttung von NGF führt. Mit diesen Parametern wurden dann die Tests durchgeführt.

10.1 Präparation und Kultivierung von Astrozyten

Die Astrozyten wurden in Anlehnung an die Methode von *McCarthy* und *De Vellis* kultiviert [103]. Nach Narkotisierung in Eis wurden die Ratten unter sterilen Bedingungen dekapitiert und die Cortices separiert. Nach sorgfältiger Befreiung von den Meningen wurden die Cortices im Anschluß durch ein Stahlsieb passiert und zentrifugiert. Nach Trituration wurde die Zellsuspension dann auf Kulturflaschen mit vorgewärmter Standardnährlösung verteilt und im Brutschrank angezüchtet.

Um abgestorbene Zellen zu beseitigen, erfolgte am nächsten Tag ein Medienwechsel. Das Wachstum von Oligodendrozyten wurde dabei durch Spülen mit kaltem PBS verhindert. Bei Verwendung von 2-3 Tieren pro Flasche erhielt man nach ca. 10 Tagen einen konfluenten Zellrasen. Während dieser Zeit wurde alle drei Tage ein Medienwechsel durchgeführt.

Zur späteren Behandlung wurden die Zellen auf 24-well-plates gesplittet. Bis zum Erreichen der Konfluenz mußte auch hier alle drei Tage ein Medienwechsel erfolgen. Nachdem die Zellen konfluent waren, konnte die Behandlung

mit **8** oder den zu testenden Verbindungen erfolgen. Die Bestimmung der NGF-Konzentration im Extrazellularraum erfolgte per Fluoreszenz-NGF-ELISA.

10.2 Fluoreszenz-NGF-ELISA

In 96-well Flachboden-ELISA-Platten wurde im ersten Schritt ein monoklonaler NGF-Antikörper adsorptiv gebunden (vgl. Abbildung 22). Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierungslösung abgesättigt.

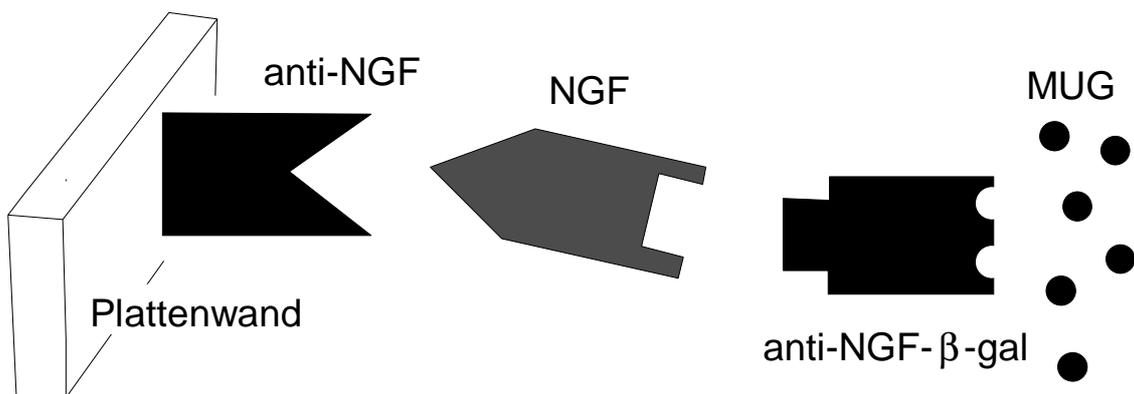


Abbildung 22: Prinzip des Sandwich-ELISAs am Beispiel der NGF-Bestimmung

Im zweiten Schritt erfolgte die Inkubation mit der Proben- bzw. Standardlösung, wobei der darin enthaltene NGF an den immobilisierten Antikörper (anti-NGF) bindet. Es folgte im dritten Schritt die Markierung des gebundenen NGF mit einem β -Galaktosidase-konjugierten zweiten Antikörper (anti-NGF- β -gal). Die im Immunkomplex gebundene β -Galaktosidase wurde im Anschluß mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactosid (MUG) bestimmt. Die ELISA-Platte wurde im Fluoreszenzphotometer vermessen (Exzitationswellenlänge = 360 nm, Emissionswellenlänge = 450nm).

10.3 Optimierung der Testbedingungen

Durch die Behandlung der Astrozytenkulturen mit $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (**8**) sollten zunächst die optimalen Bedingungen für die Testung der erhaltenen Vitamin-D-Derivate ermittelt werden.

In Anlehnung an *Neveu* und Mitarbeiter wurde das Standardmedium der konfluenten Zellen gegen eine 1:1-Mischung der Medien DMEM und F12 ausgetauscht [101] (Abkürzungen S. 127). Dieses Behandlungsmedium war zusätzlich mit Glukose, HEPES-Puffer und N2-Supplement versetzt worden (vgl. S. 127). Es enthielt kein fötales Rinderserum. Nach drei Tagen erfolgte ein Medienwechsel. Um den „Boost-Effekt“ auszutesten, wurde dem Behandlungsmedium bei einem Teil der Zellen **8** in Konzentrationen von 10^{-10} M und 10^{-9} M zugesetzt. Nach weiteren drei Tagen wurde die Behandlung mit $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt und durch 400 μ l frisches ersetzt, in welchem **8** in Konzentrationen von 10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-6} M vorlag. Jeweils vier Wells wurden mit derselben Konzentration behandelt. Als Kontrollen dienten nicht behandelte Zellen bzw. Zellen, zu denen **8** in der Konzentration der Vorbehandlung gegeben worden war (10^{-9} M und 10^{-10} M).

Nach 24h und 48h wurden aus jedem Well 150 μ l des überstehenden Mediums abgenommen und mit Trypsin-Inhibitor (Aprotinin) versetzt (Endkonzentration 20 μ g/ml). Der Zusatz von Aprotinin war notwendig, um einem vorzeitigen Abbau des NGF vorzubeugen. Die Proben wurden bis zur Durchführung des Fluoreszenz-NGF-ELISAs bei -20 °C eingefroren.

Die Zellen befanden sich damit insgesamt acht Tage in einem serumfreien Medium. Unter diesen Umständen kann es erfahrungsgemäß leicht zur Ablösung der Zellen vom Boden der Plates kommen. Da dies jedoch nur sehr vereinzelt auftrat, wurde auf eine Beschichtung der Plates mit Polyornithin verzichtet.

10.3.1 Verwendung von vorbehandelten Zellen

Die Astrozytenkulturen wurden zunächst drei Tage mit 10^{-9} M $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (**8**) vorbehandelt. Abbildung 23 zeigt die nach einer Inkubationszeit von 24h im Zellüberstand gemessenen Konzentrationen an NGF.

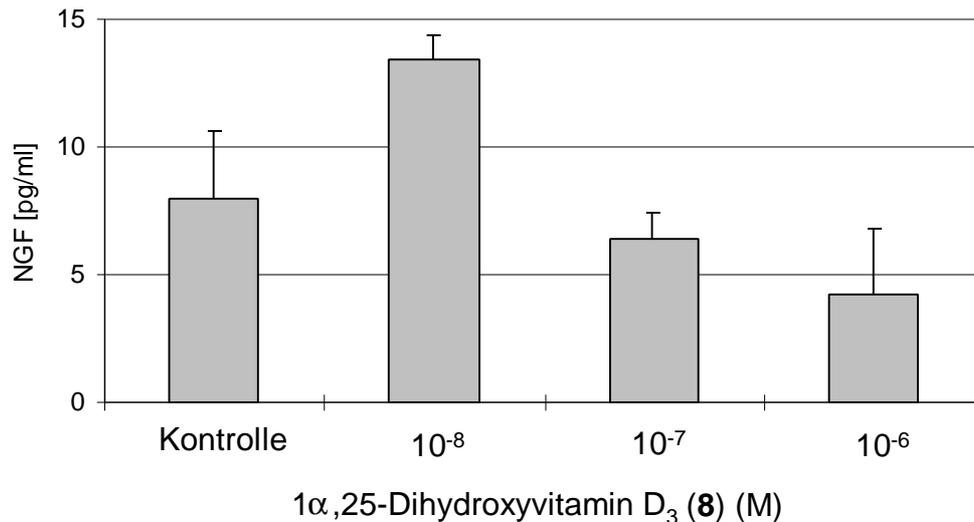


Abbildung 23: Konzentration von NGF im Zellüberstand nach 3 tägiger Vorbehandlung mit 10^{-9} M **8**. Probenentnahme 24h nach Zugabe der höheren Dosis.

Die gemessenen Werte sind mit einer recht hohen Standardabweichung behaftet. Dennoch läßt sich aussagen, daß es durch die Gabe von 10^{-8} M **8** innerhalb von 24h zu einem leichten Anstieg von NGF im Extrazellularraum kommt. Bei höheren Konzentrationen scheint dagegen weniger NGF als in der Kontrolle vorhanden zu sein, was wie folgt erklärt werden könnte: 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (**8**) induziert nicht nur die Expression von NGF, sondern ebenfalls die des 25-(OH)D₃-24-hydroxylase Gens und damit die Expression von 24-Hydroxylase [102,104]. Dieses Enzym metabolisiert **8** in das weit weniger wirksame 1 α ,24,25-Trihydroxyvitamin D₃. So konnten *Pols* und Mitarbeiter an Osteosarcom-Zellen von Ratten zeigen, daß die selbstinduzierte Metabolisierung von **8** die Hochregulation seines eigenen Rezeptors limitiert [105]. Eine verstärkte Bildung der 24-Hydroxylase bei höheren Konzentrationen an **8** würde die vergleichsweise geringere Menge an NGF nach 24h erklären.

Nach einer dreitägigen Vorbehandlung mit 10^{-10} M **8** wurden die ersten Proben ebenfalls 24h nach der Zugabe einer höheren Konzentration entnommen. Es zeigt sich der gleiche Trend wie bei den mit 10^{-9} M **8** vorbehandelten Zellen. Bei Gabe von 10^{-7} M und 10^{-6} M **8** ist auch hier der NGF-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle niedriger. Bei der Gabe einer geringeren Konzentration von 10^{-8} M **8** wird dagegen in etwa der Wert der Kontrolle erreicht. (vgl. Abbildung 24).

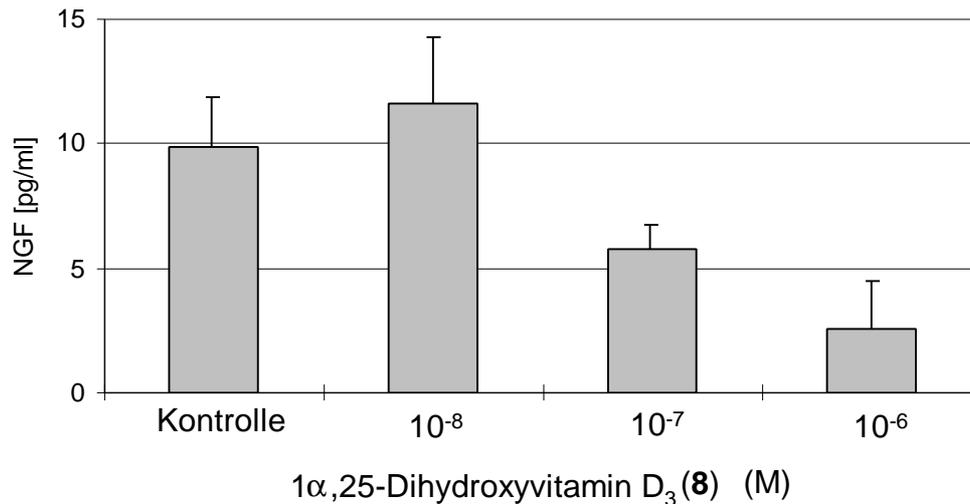


Abbildung 24: Konzentration von NGF im Zellüberstand nach 3 tägiger Vorbehandlung mit 10^{-10} M **8**. Probenentnahme 24h nach Zugabe der höheren Dosis.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den von *Neveu* und Mitarbeitern publizierten [101]. Durch die Vorbehandlung mit 10^{-9} M **8** und die spätere Gabe von 10^{-7} M **8** erreichte die Forschergruppe ein Ansteigen der NGF-Konzentration um den Faktor 4-5. Die abweichenden Ergebnisse können durch die Verwendung einer anderen Rattenart oder Präparationstechnik erklärt werden.

Aus den gleichen Wells wurden auch 48h nach Zugabe der höheren Konzentrationen Proben entnommen. Bei den mit 10^{-10} M **8** vorbehandelten Zellen konnte keine Induktion festgestellt werden. Bei den mit 10^{-9} M **8** vorbehandelten Zellen war jedoch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Konzentration an NGF im Extrazellularraum und der Menge an zugesetztem **8** ersichtlich (vgl. Abbildung 25).

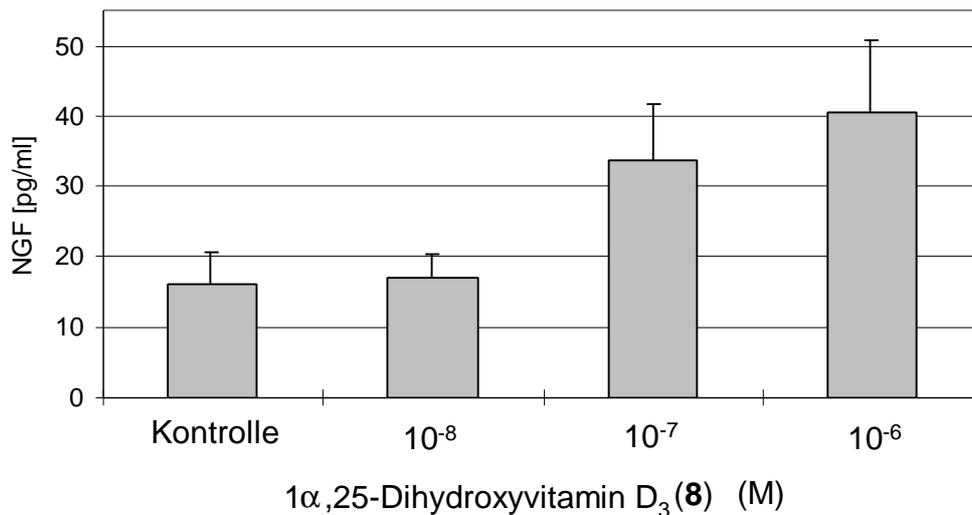


Abbildung 25: Konzentration von NGF im Zellüberstand nach 3 tägiger Vorbehandlung mit 10^{-9} M **8**. Probenentnahme 48h nach Zugabe der höheren Dosis.

Nach einer Inkubationszeit von 48h führte eine erhöhte Dosis von **8** auch zu einer vermehrten Ausschüttung von NGF. Durch die Gabe von 10^{-6} M **8** ließ sich die NGF-Konzentration mehr als verdoppeln. Das prinzipielle Vermögen von **8**, die NGF-Sekretion zu induzieren, wurde damit nachvollzogen. Der Effekt fällt jedoch geringer als erwartet aus. Um eventuell zu besseren Ergebnissen zu gelangen, wurde in einem weiteren Versuch auf eine Vorbehandlung der Zellen mit $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (**8**) verzichtet.

10.3.2 Verwendung von nicht vorbehandelten Zellen

Anstatt die Zellen nach drei Tagen mit einer geringen Konzentration von **8** vorzubehandeln, wurde bei diesem Versuch nur ein Medienwechsel durchgeführt. Mit einem erneuten Medienwechsel nach weiteren drei Tagen wurde den Zellen **8** in Konzentrationen von 10^{-8} M, 10^{-7} M und 10^{-10} M zugeführt. Die Probenentnahme erfolgte 24h und 48h später. Es wurden jeweils 150 μ l des Behandlungsmediums abgenommen. Abbildung 26 zeigt die nach einer Inkubationszeit von 24h im Behandlungsmedium gemessenen Konzentrationen von NGF.

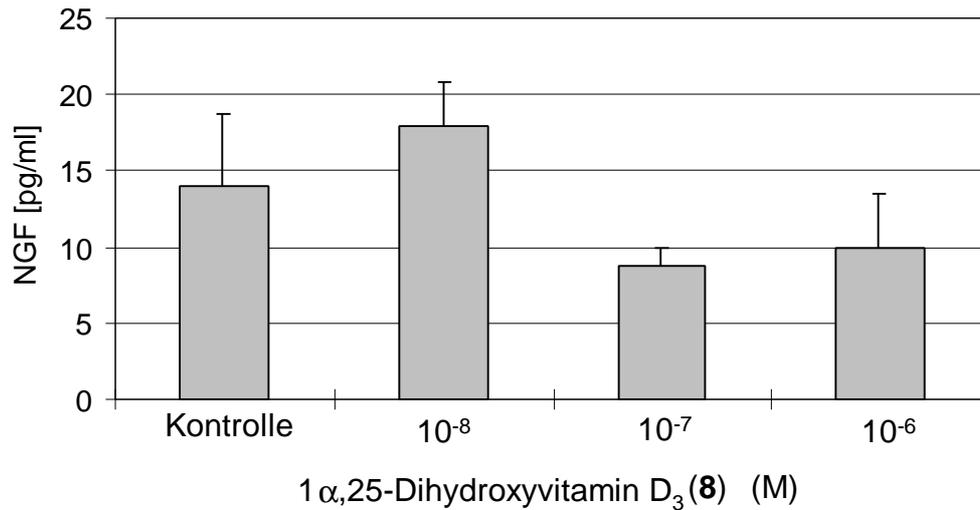


Abbildung 26: Konzentration von NGF im Zellüberstand. Probenentnahme 24h nach Zugabe von **8**.

Es fällt sofort die deutliche Ähnlichkeit zu den mit 10^{-9} M und 10^{-10} M **8** vorbehandelten Zellen auf (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Auch hier ist nach 24h der Gehalt an NGF lediglich bei einer Konzentration von 10^{-8} M **8** minimal erhöht. Bei gesteigerten Konzentrationen fällt er wieder unter den Wert der Kontrolle ab. Alle gemessenen Konzentrationen liegen aber über denen der vorbehandelten Zellen.

Ein vollkommen anderes Bild zeigt sich nach einer Inkubationszeit von 48h. Wie bei den mit 10^{-9} M vorbehandelten Zellen, so steigt auch hier die Menge an NGF im Behandlungsmedium mit der Konzentration des verabreichten **8** an (vgl. Abbildung 27). Durch die Gabe von **8** in einer Konzentration von 10^{-6} M konnte die Ausschüttung von NGF um mehr als das Dreifache gesteigert werden. Die gemessenen Konzentrationen liegen erneut über denen der mit **8** vorbehandelten Zellen.

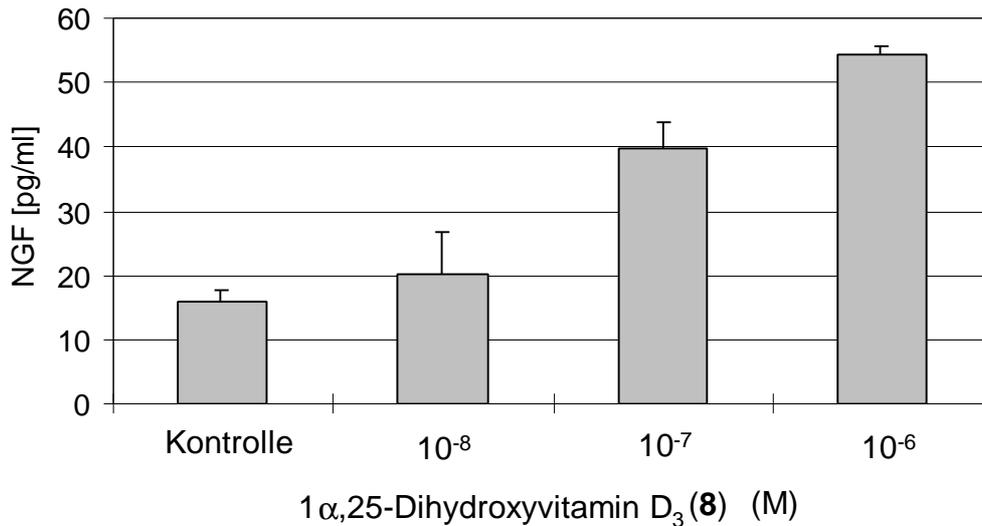


Abbildung 27: Konzentration von NGF im Zellüberstand. Probenentnahme 48h nach Zugabe von **8**.

Die Bedingungen für die anschließende Testung der Reinsubstanzen standen damit fest: Es wurden nicht vorbehandelte Zellen eingesetzt, die vor der Zugabe der zu testenden Verbindungen sechs Tage serumfrei waren. Die Probenentnahme erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48h.

10.4 Testung von isolierten Reinsubstanzen

Die erhaltenen Verbindungen auf Vitamin D-Basis wurden nach oben genannten Bedingungen getestet. Um jeden Test zu verifizieren, wurden neben den unbehandelten Kontrollen immer vier Wells mit **8** in einer Konzentration von 10^{-6} M versetzt.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß es sich bei dem vorgestellten Testsystem nicht um ein Screening-System handelte. Die Testung der Einzelsubstanzen war daher mit erheblichem Mühen verbunden. Auch lieferten die ELISAs oftmals keine eindeutigen Ergebnisse, was leicht an den negativen NGF-Kontrollen bzw. Proben von mit **8** behandelten Zellen abgelesen werden konnte. Da der ELISA erst im Anschluß an die Anzucht und Behandlung der Astrozyten durchgeführt werden konnte, war ein gescheiterter Test mit einem erheblichen Zeitverlust verbunden. Trotz aller Schwierigkeiten konnten jedoch

mit Hilfe dieses Testsystems 18 Einzelverbindungen auf ihre Fähigkeit der NGF-Induktion getestet werden.

10.5 Testergebnisse

Abbildung 28 zeigt eine Aufstellung der Verbindungen, von denen ein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die NGF-Konzentration zu erhöhen, erhalten werden konnte.

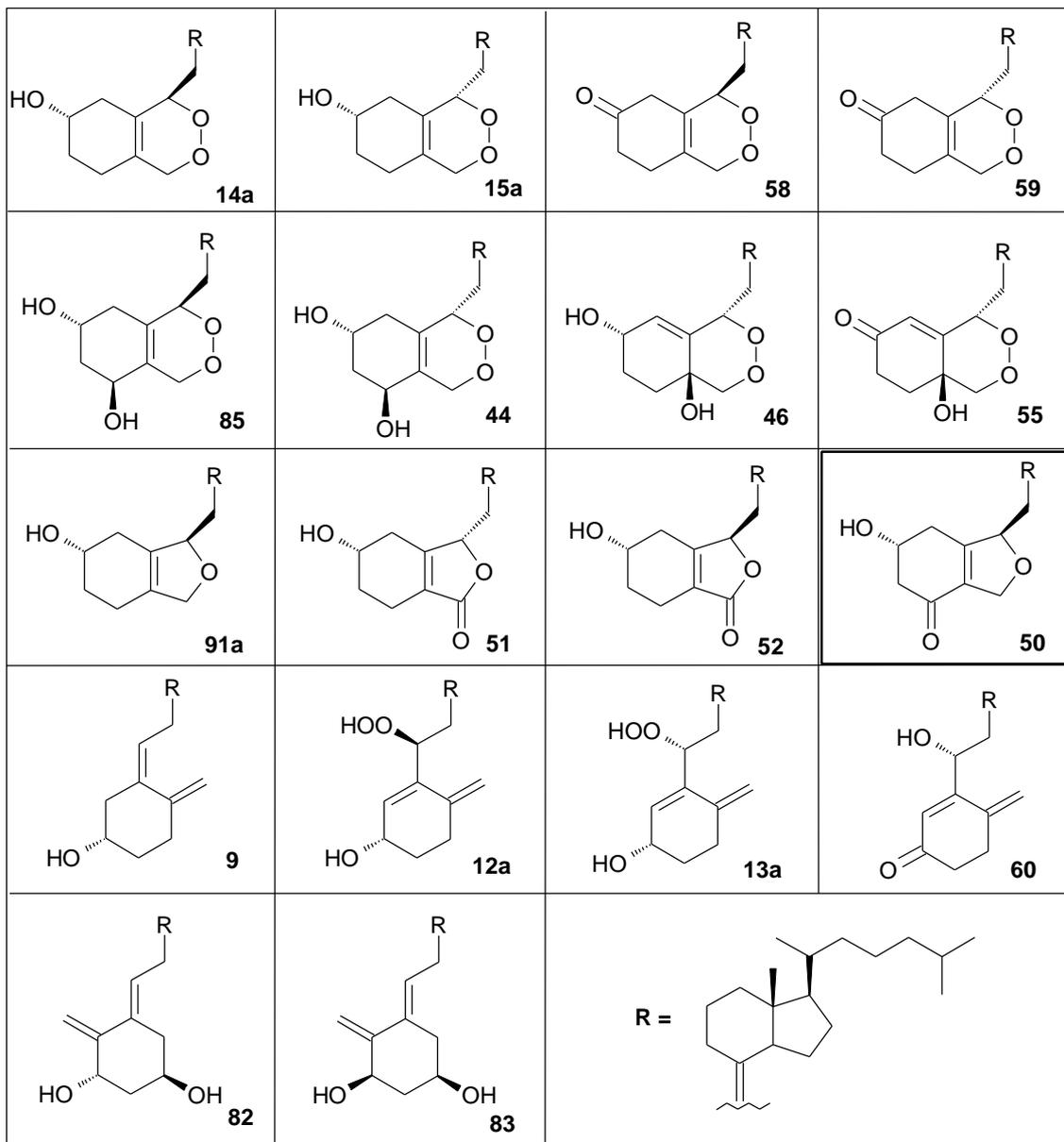


Abbildung 28: Aufstellung der getesteten Substanzen

Als unwirksam erwiesen sich die Endoperoxide **14a** und **15a**. Die Oxidation der Alkoholfunktion in Position 3 zur Ketogruppe wie in **58** und **59** führt ebensowenig zu einer Wirksamkeit wie die Einführung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe in 1 α -Position bei **85** und **44**. Auch die in Position 10 hydroxylierten Endoperoxidderivate **46** und **55** waren im Zelltest nicht in der Lage, die Ausschüttung von NGF in den Extrazellularraum zu steigern. Die Hydroperoxide **12a** und **13a** sowie das Hydroperoxidderivat **60** führten ebenfalls zu keiner meßbaren Induktion. Die Verbindungen mit Furanring **91a**, **51** und **52** waren ebenso wirkungslos wie die (5E)-Derivate des Vitamin D₃ **82** und **83**.

Das in Position 1 mit einer Ketofunktion versehene Vitamin D₃-Derivat **50** verursachte jedoch einen meßbaren Anstieg der NGF-Konzentration im Extrazellularraum (vgl. Abbildung 29).

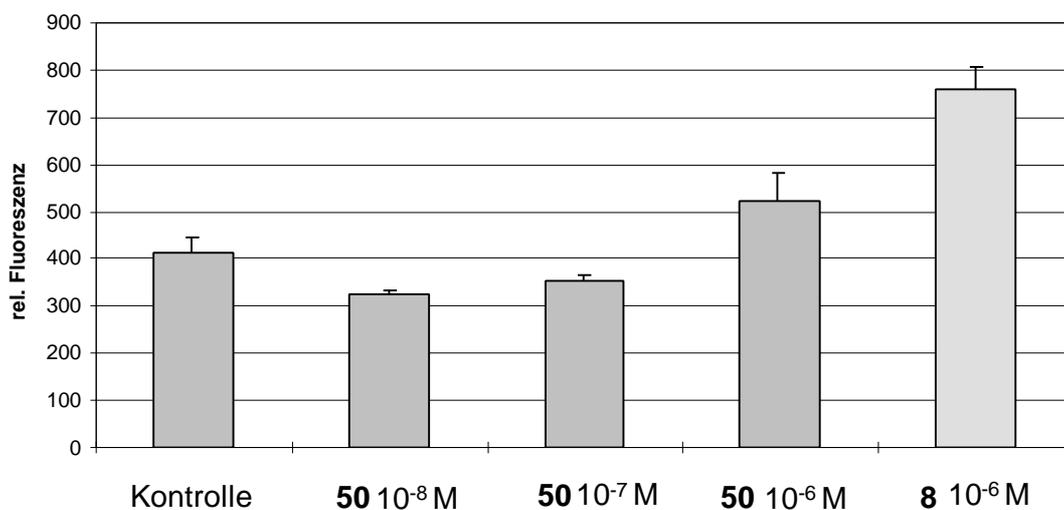


Abbildung 29: Vergleich der NGF-Induktion von Verbindung **50** mit 1 α -25-Dihydroxyvitamin D₃ (**8**)

Da bei diesem ELISA die Standards nicht auswertbar waren, kann kein Absolutwert für die Induktion angegeben werden. Die relative Fluoreszenz der Probe ist aber direkt proportional zur Konzentration an NGF. Im Vergleich zur Gabe von 10⁻⁶ M **8** fällt der gemessene Effekt geringer aus, liegt aber trotz allem jenseits der Standardabweichungen. Es erschien daher sinnvoll, die

Substanz ein weiteres Mal zu testen. Da abzusehen war, daß **50** eine geringere Wirksamkeit als **8** besitzt, wurde es zudem in einer höheren Konzentration von 10^{-5} M zugegeben (vgl. Abbildung 30).

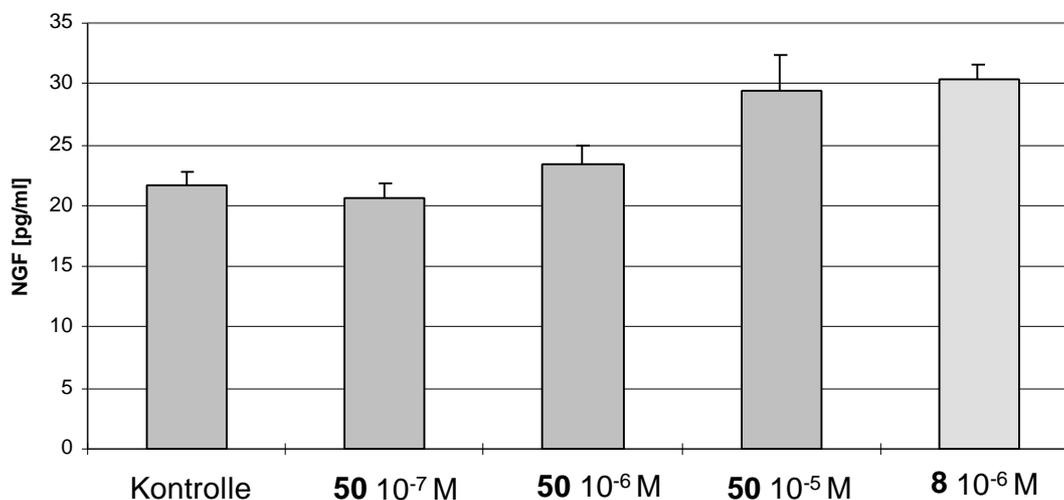


Abbildung 30: Vergleich der NGF-Induktion von Verbindung **50** mit 1α -25-Dihydroxyvitamin D_3 (**8**)

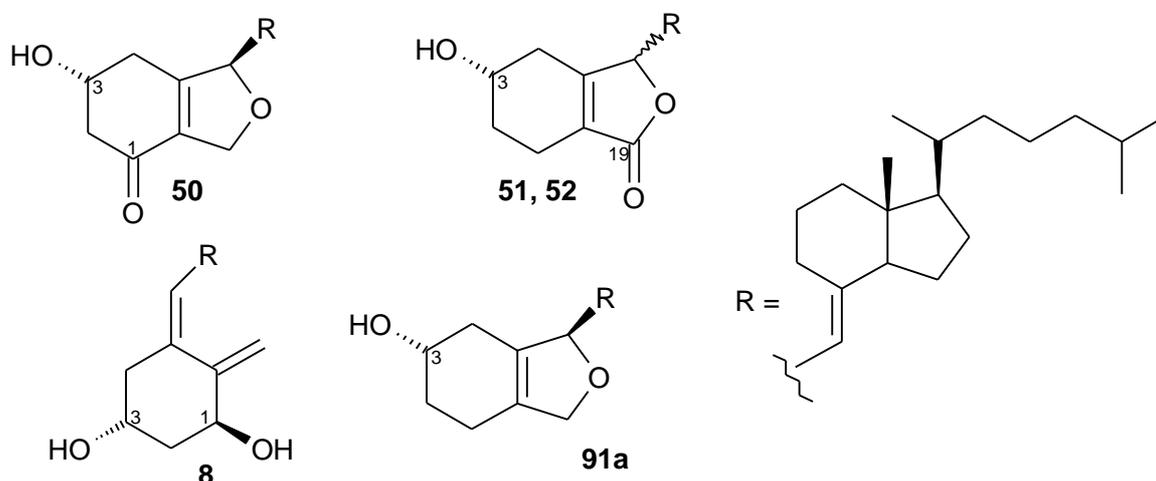
Wie aus Abbildung 30 ersichtlich, konnte die Fähigkeit zur NGF-Induktion von Verbindung **50** bestätigt werden. Die Wirkung von **50** ist konzentrationsabhängig und in einer Konzentration von 10^{-5} M mit der von Calcitriol (**8**) in einer Konzentration von 10^{-6} M vergleichbar. Sollte sich herausstellen, daß Verbindung **50** keine oder um einen Faktor 100 geringere Wirkung auf die Calcium Homöostase hat, so wäre sie dennoch eine wertvolle Substanz. Mit diesem Befund, daß sich die Calcium Homöostatische Wirkung von der NGF-induzierenden trennen läßt, könnte eine Neuentwicklung von NGF-Induktoren starten.

Verbindung **50** konnte aus einer Substanzbibliothek isoliert werden, die durch die Reaktion von Vitamin D_3 mit Singulett-Sauerstoff erhalten worden war. Hätte man die eingangs diskutierte gezielte Derivatisierung von Vitamin D_3 der Erzeugung einer Substanzbibliothek vorgezogen, so wäre eine derartige Strukturvariation sicher nicht in Betracht gezogen worden.

10.5.1 Diskussion der Ergebnisse

Im Gegensatz zu $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (**8**), das eine Alkoholfunktion in Position 25 der Seitenkette besitzt, ist Verbindung **50** nicht mit einer Hydroxylgruppe in der Seitenkette ausgestattet. Aus positiven Testergebnissen für **50** folgt, daß für eine NGF-Induktion die Hydroxylgruppe in Position 25 nicht zwingend notwendig ist. Umgekehrt bedeutet die Anwesenheit der Hydroxylgruppe in Position 25 nicht unbedingt Wirksamkeit, wie durch die von *Neveu* und Mitarbeitern festgestellte Unwirksamkeit von $24,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 [101] bestätigt wurde. Vitamin D_3 (**9**) führte im Zelltest ebenfalls zu keiner Steigerung der NGF-Konzentration. Die Unwirksamkeit von Vitamin D_3 (**9**) im Vergleich zu $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (**8**) wird daher nicht durch das Fehlen der Hydroxylgruppe in Position 25, sondern durch das Fehlen der Hydroxylgruppe in 1α -Position verursacht.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß bei sehr vielen NGF-Induktoren zwei Sauerstoff-Funktionen auftreten, die sich relativ nah beieinander befinden. Mit den Sauerstoff-Funktionen an C-1 und C-3 besitzen auch Calcitriol (**8**) sowie Verbindung **50** dieses Strukturelement.



Daß die Wirkung von **50** tatsächlich mit der Carbonylgruppe an C-1 verknüpft ist, konnte durch die Synthese und Testung von Verbindung **91a** bestätigt werden. Verbindung **91a** ist mit Verbindung **50** bis auf die Carbonylsubstitution in Position 1 identisch. Das Strukturelement der zwei benachbarten Sauerstoffe fehlt damit in **91a**, weshalb diese Substanz im Zelltest die Produktion von NGF

nicht steigern konnte. Die mit **50** strukturverwandten Substanzen **51** und **52** zeigen ebenfalls keinerlei Wirksamkeit, da sich der Carbonylsauerstoff bei diesen Verbindungen an C-19 befindet und damit weiter von der Alkoholfunktion an C-3 entfernt ist.

Zur genaueren Erfassung der räumlichen Anforderung wurden von einigen Modellsubstanzen die Geometrien mit Hilfe des MM3-Kraftfeldes berechnet [106]. Als Mimikri für **8** diente Verbindung **A**, die durch Substitution des Restes R durch Wasserstoff entsteht. Theoretisch sind für **A** 144 Konformere denkbar. Die Geometrieoptimierung ergab aber lediglich 31 unterschiedliche Konformere in einem Energiebereich von 42 kJ/mol. Das energetisch niedrigste Konformer ist in Abbildung 31 wiedergegeben.

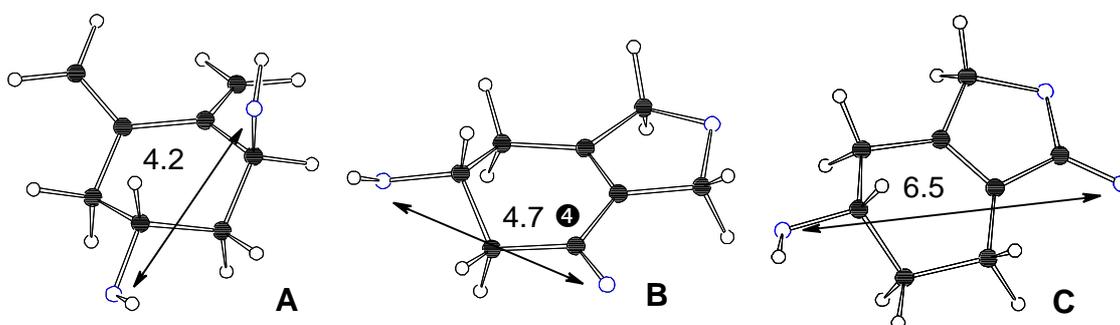


Abbildung 31: Abstände der Sauerstoffatome in den Teilstrukturen von **8** (A), **50** (B) sowie **51** und **52** (C)

Das Modell für Verbindung **50** weist wesentlich weniger strukturelle Freiheitsgrade auf. Von den 6 möglichen Konformeren erwies sich die Geometrie **B** in Abbildung 31 als globales Minimum.

Verbindung **C** wurde ebenfalls durch Substitution des Restes R mit Wasserstoff modelliert. Hier sind prinzipiell 12 verschiedene Konformere vorstellbar. Die Anzahl reduziert sich aber wiederum, da den MM3-Rechnungen zufolge nur eine Geometrie für den Fünfring stabil ist.

Die durchgeführten Rechnungen berücksichtigen keine Lösungsmittel. In erster Näherung kann man die Geometrien jedoch als solvatunabhängig betrachten. Die Stellung der Hydroxylgruppen ist aber sicherlich Lösungsmittelleffekten unterworfen, weshalb ebenfalls Rechnungen unter Einbeziehung des im

Macromodel Programmpaket implementierten BG/SA Solvation Model [107] angefertigt wurden. Es ergaben sich nur minimale geometrische Änderungen. Als Vergleich wurden ebenso die energetischen Minima der NGF-induzierenden Verbindungen Brenzcatechin (**1**) und Hydrochinon (**5**) berechnet. Wie Abbildung 31 zeigt, ist der Sauerstoff-Sauerstoff-Abstand in der Teilstruktur von **8** (A) mit dem in der Teilstruktur von **50** (B) vergleichbar. Bei den strukturverwandten, aber unwirksamen Verbindungen **51** und **52** (C) ist der Abstand hingegen deutlich vergrößert. Im Brenzcatechin (**1**) beträgt der Abstand der Sauerstoffatome ca. 2.8 Å. Im Hydrochinon (**5**) liegt er dagegen bei 5.5 Å. Offensichtlich wird eine Variation der Abstände in diesem Bereich noch toleriert. Wie die Unwirksamkeit der Vitamin D₃-Derivate **82** und **83** sowie der Endoperoxide **85** und **44** zeigt, ist die genannte Bedingung für eine Wirkung zwar notwendig, aber nicht hinreichend.

11. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zwei Ziele, die sinnvoll verknüpft werden mußten. Zum einen sollten aus einer Verbindung mit einem Reagenz möglichst viele Produkte hergestellt werden. Es war zu überprüfen, ob die Synthese und Auftrennung einer solchen Substanzbibliothek eine neue Quelle zur Deckung des schier unermesslichen Substanzbedarfs für das Hochdurchsatz-Screening darstellt und damit neben der kombinatorischen Chemie eine Chance hat. Zum anderen sollten auf diesem Wege neue, biologisch aktive Substanzen gefunden werden.

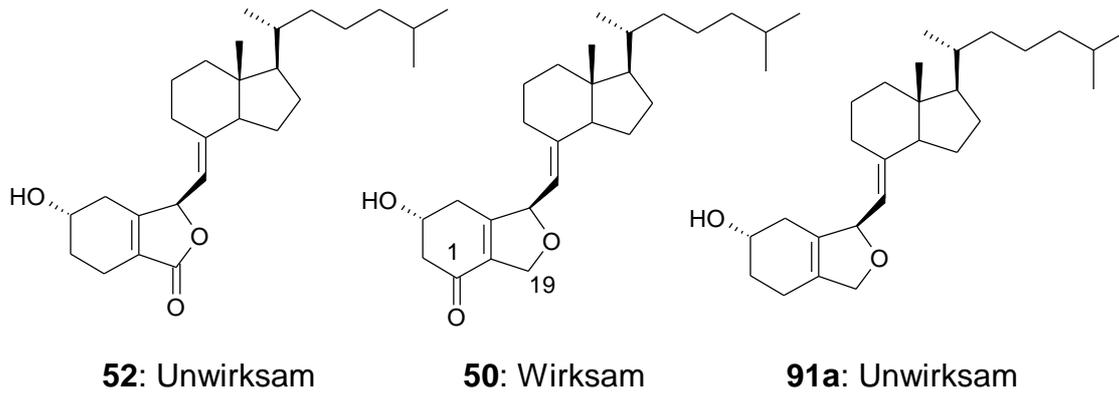
Der Aufbau einer Substanzbibliothek gelang durch die Reaktion von Vitamin D₃ mit Singulett-Sauerstoff. Durch diese Reaktion wurde eine enorme Anzahl von Verbindungen gebildet, so daß selbst die Hauptkomponenten der Unterfraktionen nur in Ausbeuten von 3-4 mg isoliert werden konnten. Lediglich bei drei Substanzen handelte es sich um Fragmentierungsprodukte des Vitamin D₃. Bei allen anderen war nicht nur das Grundgerüst, sondern ebenfalls die Ringe C und D sowie die Seitenkette erhalten geblieben. Das Vorhaben, vorwiegend Derivate mit Veränderungen am Ringsystem A zu erhalten, war damit erfolgreich durchgeführt worden. Die Endoperoxide machten die größte Gruppe der erhaltenen Vitamin D₃-Derivate aus. Neben diesen wurden auch Verbindungen mit einem Fünfring, sowie Derivate ohne ein zusätzliches Ringsystem isoliert. Bei vielen der Verbindungen war zudem die Hydroxylgruppe an C-3 zur Ketogruppe oxidiert worden. Im Gegensatz zu den Produkten einer kombinatorischen Synthese war damit auch die strukturelle Diversität der Verbindungen hoch.

Für die Aufklärung der Stereochemie war die Methylgruppe 18 von entscheidender Bedeutung. Bei allen Verbindungen mit zusätzlichem Ringsystem konnte die absolute Konfiguration an C-6 durch NOE-Experimente bestimmt werden, wobei die räumliche Orientierung dieser Methylgruppe in Abhängigkeit zur Chiralität an C-6 ermittelt wurde. Bei Verbindungen mit semizyklischer Doppelbindung reflektierte die chemische Verschiebung der Methylprotonen von C-18 die Stereochemie an C-6.

Durch die Testung der erhaltenen Derivate im Hinblick auf die Induktion der NGF-Produktion in Zellkulturen wurde mit Verbindung **50** eine neue, biologisch aktive Verbindung gefunden. Neben $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (**8**) und dessen Seitenkettenmodifikationen MC-903 (**10**) und 22-Oxa-Calcitriol (**11**) steht mit **50** nun ein weiterer NGF-Induktor auf Vitamin D-Basis bereit. Bei einer geplanten Synthese wäre eine derartige Strukturvariation sicher nicht in Betracht gezogen worden. Die unkonventionelle Methode der Erzeugung und Auftrennung einer Substanzbibliothek kann demnach durchaus eine Ergänzung der kombinatorischen Chemie sein. Durch die geschickte Auswahl der Reaktionsbedingungen kann zudem die Position im Ausgangsmolekül, an der Veränderungen gewünscht sind, bestimmt werden.

Allen als NGF-Induktoren wirksamen Verbindungen auf Vitamin D-Basis ist gemeinsam, daß sie am Kohlenstoffatom C-1 eine Sauerstoff-Funktion tragen. Durch gezielte chemische Veränderungen sollte daher geklärt werden, ob die Funktionalisierung an C-1 für eine NGF-Induktion notwendig ist. Dazu wurden zum einen Verbindungen mit einer Alkoholfunktion an C-1 synthetisiert und zum anderen konnte aus den Endoperoxiden **14a** und **15a** Verbindung **91a** erhalten werden, die bis auf die Carbonylfunktion an C-1 mit **50** identisch ist.

Für die Testung der Substanzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur NGF-Induktion wurden Astrozytenkulturen verwendet. Die optimalen Testbedingungen konnten durch Versuche mit $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (**8**) ermittelt werden. Während Verbindung **50** eine deutliche Wirkung zeigte, war Verbindung **91a** unwirksam. Die bei **52** formal nach C-19 verlagerte Ketogruppe führte ebenfalls zum Wirkungsverlust, was durch veränderte Abstände der Sauerstoffatome erklärt werden konnte.



Damit wurde eindeutig bewiesen, daß die Wirksamkeit von **50** an die Anwesenheit der Carbonylfunktion an C-1 geknüpft ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues und leistungsfähiges Verfahren vorgestellt, erfolgreich zu biologisch aktiven Verbindungen zu gelangen. Durch die Testung der erhaltenen Vitamin D-Derivate konnten zudem wichtige Rückschlüsse auf die für eine Wirksamkeit notwendigen strukturellen Voraussetzungen erhalten werden. Auf der Grundlage dieser Arbeit ist es nun möglich, gezieltere Derivatisierungen vorzunehmen, um so schneller zu noch wirksameren NGF-Induktoren auf Vitamin D-Basis zu gelangen.

Experimenteller Teil

Allgemeine Methoden

Die **Kernresonanzspektren** (NMR) wurden mit den Geräten FX-90, GX-400-Delta bzw. LA-500-Delta der Firma Jeol aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die δ -Skala. Als interner Standard diente das Signal des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels oder TMS. Um die Multiplizität der erhaltenen Signale zu beschreiben, wurde die folgenden Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, dd = Doppeldublett (usw.). Die Kopplungskonstanten sind in Hertz angegeben und wie beschrieben bezeichnet: 2J = geminale Kopplung, 3J = vicinale Kopplung.

Es kamen die folgenden Aufnahmetechniken zur Anwendung:

- COM **C**omplete Decoupling = ^1H -Breitbandentkopplung
- DEPT **D**istorsionless **E**nhancement by **P**olarisation **T**ransfer
- APT **A**ttached **P**roton **T**est
- NOE **N**uclear **O**verhauser **E**ffect = Gated-Decoupling
- COSY **C**orrelation **S**pectroscopy
- COLOC **C**orrelation **S**pectroscopy via **L**ong-Range **C**ouplings

Außerdem wurden die den letzten beiden Methoden entsprechenden inversen H,C-Korrelations-Techniken verwendet:

- HMQC **H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence
- HMBC **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation

Die Bearbeitung der erhaltenen Rohdaten (FID) erfolgte mit dem Programm NUTS (Vers. 5.108) der Firma Acorn-NMR auf einem Windows-PC. Die Datenbank SPECINFO der Firma Chemical Concepts, Weinheim wurde zur Abschätzung der chemischen Verschiebungen herangezogen. Der Zugang erfolgte durch die Software STN-Express (Vers. 3.2) ebenfalls über einen PC.

Infrarotspektren wurden mit einem FT-IR-Gerät der Firma Nicolet (Modell 510-P) aufgenommen. Die Banden werden mit w (schwach), m (mittel) und s (stark)

gekennzeichnet Die Bandenlage wird in cm^{-1} angegeben. Die Proben wurden als KBr-Preßling oder als Film auf NaCl vermessen.

Die **Massenspektren** und hochaufgelöste Massenspektren wurden mit dem doppelfokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer VG 7070H der Firma Vakuum Generators durchgeführt. Die Ionisation erfolgte mittels Elektronenstoß (70eV). Angegeben sind die Intensitätsstärksten Fragmente und gegebenenfalls weitere charakteristische Fragmentationen. In Klammern ist die relative Intensität der Signale in Prozent bezogen auf den Basispeak angegeben.

Die **HPLC-MS** Messungen wurden mit dem Quadrupol Gerät MD-800 der Firma Fisons und angeschlossenem Waters LC-Modul-1-plus durchgeführt. Die Auswertung geschah mit dem PC-Programm Masslab in der Version 1.3. Die Ionisation erfolgte mittels Elektronenstoß (70 eV) oder chemisch (positive oder negative Ionen), wobei Ammoniak als Reaktandgas eingesetzt wurde.

Die spezifischen **Drehwerte** konnten mit einem Polarimeter Modell DP-370 der Firma Jasco bestimmt werden. Das Gerät ist mit einer Natriumdampflampe sowie einem Diodenlaser ($\lambda = 670 \text{ nm}$) ausgerüstet.

Trennungen und Trennsysteme

Als stationäre Phase für die **Flash-Chromatographie** wurde Kieselgel der Firma Merck verwendet (70-230 mesh, Korngröße 0.063-0.2 mm oder 230-400 mesh, Korngröße 0.04-0.064 mm). Es wurde eine spezielle Stufensäule eingesetzt.

Die **HPLC**-Trennungen wurden an den folgenden Geräten durchgeführt:

Analytische Trennungen:

Merck-Hitachi:	Detektor:	L-4000 UV-Detektor
	Pumpe:	L-6200 Intelligent Pump
	Autosampler:	655A-40

Waters:	Auswertung:	D-2000 Chromato Integrator
	Detektor:	990, 991 Photodiodenarraydetektor
	Pumpe:	MSDS 600, MSDS 600 E
	Autosampller:	700, 712 Satellite WISP
	Auswertung:	PC mit Waters Software 991 Vers. 6.22

Präparative Trennungen:

Waters:	Detektor:	990 Photodiodenarraydetektor
	Pumpe	MSDS 600 E
	Auswertung:	PC mit Waters Software 991 Vers. 5.11

Wenn kein Autosampller zum Einsatz kam, wurden an allen Anlagen Injektionsventile der Firma Rheodyne verwendet. Die eingesetzten Lösungsmittel hatten die Qualität Lichrosolv[®] oder Präpsolv[®] der Firma Merck. Hexan wurde vor der Verwendung über eine Kolonne destilliert. Alle anderen Lösungsmittel kamen wie bezogen zum Einsatz. Das Wasser wurde über eine Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 der Firma Seral gewonnen.

Übersicht über verwendete analytische (A), semipräparative (SP) und präparative (P) Trennsysteme:

Nr.	stationäre Phase	Fließmittel und Fließbedingungen
A1	Lichrospher [®] 100 RP-18; 5 µm 250 x 4 mm (Fa. Merck))	Fluß 1.0 ml/min Acetonitril - Wasser Gradient: 0-180 min linear von 5 : 95 auf 100 : 0
A2	wie A2	Fluß 1 ml/min Methanol
A3	wie A2	Fluß 1 ml/min Methanol - Wasser (95 : 5)
SP1	Lichrosorb [®] SI 100; 5 µm 250 x 10 (eigene Füllung)	Fluß 6.0 ml/min n-Hexan - Isopropanol (95 : 5)
SP2	wie SP1	Fluß 4.5 ml/min n-Hexan - Isopropanol (96 : 4)
SP3	Lichrospher [®] 100 RP-18; 10 µm 250 x 10 (Fa. Merck)	Fluß 3.25 ml /min Methanol - Wasser (85 : 15)
SP4	wie SP3	Fluß 3.25 ml /min Methanol - Wasser (80 : 20)
SP5	wie SP3	Fluß 3.25 ml /min Methanol - Wasser (90 : 10)
SP6	wie SP1	Fluß 6.0 ml/min n-Hexan - Isopropanol (97 : 3)

Nr.	stationäre Phase	Fließmittel und Fließbedingungen
SP7	wie SP3	Fluß 3.25 ml /min Methanol - Wasser (95 : 5)
SP8	wie SP1	Fluß 6.0 ml/min n-Hexan - TBME (90 : 10)
P1	Lichrospher [®] 100 RP-18; 5 µm 250 x 25 (Fa. Merck)	Fluß 39 ml/min Methanol
P2	TLC-Kieselgel 15 µm (Fa. Merck) in 250 x 25 Edelstahl-Kartusche	Fluß 15 ml/min n-Hexan - Isopropanol (98 : 2)
P3	wie P2	Fluß 15 ml/min n-Hexan - TBME (80 : 20)
P4	Lichrospher [®] 100 RP-18; 7 µm 250 x 48 (Fa. Merck)	Fluß 110 ml/min Methanol
P5	Lichrospher [®] 100 RP-18; 5 µm 250 x 25 (Fa. Merck)	Fluß 39 ml/min Methanol - Wasser (90 : 10)
P6	wie P1	Fluß 39 ml/min Methanol - Wasser (5 : 95)
P7	wie P2	Fluß 15 ml/min n-Hexan - Isopropanol (95 : 5)
P8	wie P2	Fluß 15 ml/min n-Hexan - Isopropanol (96 : 4)
P9	wie P2	Fluß 15 ml/min n-Hexan - Isopropanol (97 : 3)

Zum **Packen der analytischen Chromatographiesäulen** wurde die Slurry-Technik angewendet. Es kam eine Packapparatur der Firma Shandon (Modell 628X51) sowie eine Füllrohr der Firma Knauer zum Einsatz. 2.2 g des jeweiligen Kieselgels wurden zunächst in 50 ml Aceton suspendiert und mehrere Minuten im Ultraschallbad entgast. Anschließend erfolgte die Befüllung der Chromatographiesäule. Dazu wurde die Suspension in das Füllrohr gegeben und mit 350-400 bar entgegen der Schwerkraft in die Säule gepreßt. Nach einem Durchflußvolumen von etwa 200 ml Aceton wurde die Säule verschraubt und über Nacht mit 0.2 ml/min Hexan dest. eingespült. Durch ein Testchromatogramm mit Toluol/Nitrobenzol wurde sichergestellt, daß die Säule über eine ausreichende Anzahl an theoretischen Böden verfügt und eine symmetrische Peakform produziert.

Zur **Herstellung der präparativen Chromatographiesäulen** kam eine Pumpe der Firma Du Pont zum Einsatz (Modell 930931-902). Auch hier wurde die oben beschriebene Technik angewendet. Für die Befüllung einer

Chromatographiesäule der Dimension 250x25 mm wurden ca. 80g Kieselgel benötigt. Mit der Pumpe konnte ein maximaler Druck von 310 bar erzeugt werden.

Umsetzung von Vitamin D mit Singulett-Sauerstoff

In einer Photobelichtungsapparatur werden 500 mg Vitamin D und 50 mg Bengalrosa in absolutem Ethanol gelöst. Man leitet Sauerstoff in die Lösung ein und bestrahlt mit einer Natriumdampflampe (Typ: Osram® Vialon NAV-TS 250 W). Nach ca. 35 Minuten ist die Reaktion abgeschlossen und man entfernt das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer.

Zur Aufarbeitung wird das Rohprodukt in 200 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit jeweils 150 ml Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Es wird erneut im Rotationsverdampfer eingengt. Die diastereomeren Hydroperoxide werden durch Chromatographie auf einer Normalphase (System **P2**) von dem Gemisch der Endoperoxide getrennt. Die Endoperoxide können im Anschluß durch erneute Chromatographie auf einer Normalphase mit System **P3** in Reinform gewonnen werden.

Hydroxylierung von Vitamin D₃ in 1a-Position

3(S)-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-9,10-secocholesta-5(E),7,10(19)-trien (79)

2 g Vitamin D₃ (5.2 mmol) werden bei -20 °C in 8 ml flüssigem Schwefeldioxid gelöst und für 30 min refluxiert. Das Schwefeldioxid wird durch Destillation entfernt und das Rohprodukt im Rotationsverdampfer getrocknet.

Die diastereomeren SO₂-Addukte werden in 15 ml trockenem DMF gelöst und mit 690 mg Imidazol (10.1 mmol) und 770 mg *tert*-Butyldimethylchlorsilan versetzt. Man rührt für 2h bei Raumtemperatur. Zur Aufarbeitung verdünnt man die Reaktionslösung mit 150 ml Ethylacetat und 60 ml Wasser. Die organische Schicht wird abgetrennt und je zweimal mit Wasser sowie gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Das Rohprodukt wird im Rotationsverdampfer getrocknet.

Man löst in 50 ml Ethanol und versetzt mit 4g Natriumhydrogencarbonat (48 mmol). Der Ansatz wird für 90 min refluxiert. Anschließend wird das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung des

gewonnenen 3(*S*)-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-9,10-secocholesta-5,7(*E*),10(19)-triens erfolgt durch Flashchromatographie auf Kieselgel (Hexan /TBME 90:10). Die Ausbeute beträgt 1.81 g (70%).

9,10-secocholesta-5(*E*),7,10(19) -trien-1,3 α -diole (**82**) und (**83**)

1.20 g N-Methylmorpholin-N-oxidmonohydrat (8.9 mmol) werden in 15 ml Dichlormethan 30 min über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird filtriert. Zu dem Filtrat gibt man 1.00 g 3(*S*)-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-9,10-seco-cholesta-5,7(*E*),10(19)-trien (2.0 mmol) und schnell 222 mg Selendioxid (2.0 mmol) in 15 ml Methanol. Der Ansatz wird für 50 min refluxiert. Anschließend verdünnt man mit 50 ml Dichlormethan und wäscht jeweils zweimal mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung. Nach Trocknung im Rotationsverdampfer wird das erhaltene orangene Rohprodukt durch Chromatographie auf Kieselgel gereinigt. (Hexan/TBME 80:20). Die Ausbeute beträgt 463 mg (45 %).

463 mg des Gemisches der diastereomeren 3(*R*)-(tert-Butyldimethylsilyloxy)-9,10-secocholesta-5,7(*E*),10(19)-trien-1-ole (0.9 mmol) werden in 50 ml THF gelöst und mit 850 mg Tetrabutylammoniumfluoridtrihydrat (2.7 mmol) versetzt. Man rührt 1h bei 60 °C. Nachdem die Reaktionsmischung abgekühlt ist, wird sie zwischen 30 ml Ethylacetat und 20 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2%) separiert. Die organische Phase wird je zweimal mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Die 1 β -Verbindung wird durch fraktionierte Kristallisation aus Ethylacetat gewonnen. Die Ausbeute beträgt 272 mg (76 %). Durch Chromatographie auf einer Umkehrphase (System **P1**) kann die 1 α -Verbindung aus dem Konzentrat der Mutterlauge erhalten werden. Die Ausbeute beträgt 44 mg (12 %).

1 α -Hydroxyvitamin D₃ (**84**)

100 mg 9,10-secocholesta-5(*E*),7,10(19)-trien-1 β ,3 α -diol (0.25 mmol) und 10 mg Antracen (0.06 mmol) werden in 10 ml Toluol gelöst. Die Reaktionslösung wird mit dem Quecksilberdampf-Hochdruckstrahler TQ 150 Z2 (Firma Hanau) für 75 min bestrahlt. Nach Trocknung im Rotationsverdampfer und

Flashchromatographie auf Kieselgel (TBME) können 83 mg (83 %) 1α -Hydroxyvitamin D₃ erhalten werden.

Umsetzung von Vitamin D-Endoperoxiden 14 und 15 mit Triphenylphosphin

100 mg 6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien (0.24 mmol) werden in 30 ml Toluol gelöst und mit 63 mg Triphenylphosphin versetzt. Man refluxiert für 24 h und entfernt anschließend das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer. Man nimmt in Ethylacetat auf und wäscht jeweils dreimal mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung.

Testung der Substanzen

Materialien, die in der Zellkultur verwendet wurden:

DMEM (Dulbecco's mod. Eagle Medium)	Gibco, Eggenstein
PBS (Dulbecco's phosphate-buffered salt)	Gibco, Eggenstein
PSN Antibiotic Mixture (100x, Penicillin, Streptomycin, Neomycin)	Gibco, Eggenstein
F12 Medium	Gibco, Eggenstein
N2-Supplement	Gibco, Eggenstein
Nunclon Zellkulturflasche (175 cm ² / 800 ml, mit Filterkappe)	Nunc, Wiesbaden
Nunclon Delta Si (Multidish 24 well)	Nunc, Wiesbaden
Foetales Kälberserum (FCS)	PAA, Marburg
Entkeimungsfilter Seletron M 0.2 µm	Schleicher und Schüll, München
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Trypsin 1:250	USB/Amersham Buchler Braunschweig

Materialien, die beim ELISA verwendet wurden:

Maxisorb™ (U96 immunoplate)	Becton Dickinson, Heidelberg
--------------------------------	------------------------------

Anti- β (2,5(S), 7(S)) nerve growth factor	Boehringer, Mannheim
Anti-nerve growth factor- β -gal	Boehringer, Mannheim
Nerve growth factor- β mouse std.	Boehringer, Mannheim
Serumalbumin vom Rind (reinst)	Boehringer, Mannheim
Trypsin inhibitor (from bovine lung, 228 U/mg)	Serva, Heidelberg
HEPES(free acid) (N-(2Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid))	Sigma, Deisenhofen
4-Methylumbelliferyl- β -D-galactoside (MUG)	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Triton ^R X-100	Sigma, Deisenhofen

Präparation und Anzucht von Astrozyten

Postnatale (P1) Fisher 344-Ratten werden in Eis narkotisiert und unter sterilen Bedingungen dekapitiert. Die dorsale Kopfhaut wird aufgeschnitten und zur Seite gezogen. Durch einen Schnitt vom Foramen magnum entlang der Sutura sagittalis bis zum Bregma können die beiden Hälften des Schädeldaches zur Seite gebogen werden. Das Gehirn wird herausgelöst und die Cortices separiert. Diese werden von den Meningen befreit und in 20 ml der folgenden Nährlösung gesammelt:

Nährlösung:

500 ml DMEM

50 ml FCS

5 ml PSN

Nach Isolierung von 3-4 Cortices werden diese mit einem Glasstab durch ein Stahlsieb (190 μ m) in ein Zentrifugenröhrchen passiert. Die Suspension wird 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wird dem Pellet ca. 2ml Nährlösung zugefügt. Man trituiert und überführt die Suspension in Kulturflaschen mit zuvor äquilibrierter Nährlösung. Am ersten Tag nach der Präparation werden die Zellen mit kaltem PBS gespült. Es wird ein Medienwechsel durchgeführt. Bis zur Konfluenz erfolgt alle drei Tage ein weiterer Medienwechsel.

Nach erreichter Konfluenz werden die Zellen auf 24-well-plates gesplittet. Dazu werden die Zellen mit der folgenden Lösung vom Boden der Kulturflaschen abgelöst:

Splitting-Lösung:

200 mg Trypsin	100 mg EDTA
100 ml PBS	0.1 ml Phenolrot

Die abgelösten Zellen werden in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt, mehrmals zentrifugiert und mit Nährlösung resuspendiert. Anschließend werden sie in einer Dichte von ungefähr 10^5 Zellen pro Well ausgesät. Nach einem Tag wird mit PBS gespült und ein Medienwechsel durchgeführt. Bis zur Konfluenz erfolgt alle drei Tage ein weiterer Medienwechsel.

Behandlung der Kulturen

Sechs Tage vor Behandlung der konfluenten Zellen wird das Nährmedium gegen das folgende Behandlungsmedium ausgetauscht:

50 ml DMEM	50 ml F12 Medium
5 mM HEPES (pH 7.2)	33 mM Glucose
1 ml	N2-Supplement

Nach drei Tagen muß auch hier ein Medienwechsel erfolgen. Nach sechs Tagen wird das Behandlungsmedium durch frisches ersetzt, in welchem die zu testenden Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen gelöst sind. Das Behandlungsmedium wird nach 24 bzw. 48h abgenommen und in ein Mikroreaktionsgefäß gefüllt. Vor dem Einfrieren der Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gibt man Aprotinin hinzu (Endkonzentration $20\text{ }\mu\text{g/ml}$).

Bestimmung des NGF mittels ELISA

In 96 well Plates werden in jede Vertiefung $50\text{ }\mu\text{l}$ Beladungspuffer mit einem Zusatz von $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ Anti- β -NGF pipettiert.

Beladungspuffer:

Natriumcarbonat /	1.59g Na_2CO_3 (0.015M)
Na-bicarbonat	2.93g NaHCO_3 (0.035M)
pH 9.5	H_2O ad 1l

Die Platte wird mit Parafilm abgedeckt und für 2h bei RT auf einen Schüttler gestellt. Im Anschluß werden die Platten sorgfältig mit Waschpuffer gespült. Nach jedem Waschgang klopft man sorgfältig auf saugfähigem Papier aus.

Waschpuffer (pH 7):

50 mM Tris-HCl	0.3 M NaCl
0.5% BSA	0.1 % Natriumazid
1 mM Magnesiumchlorid	

Im nächsten Schritt werden in jedes Well 100 µl der folgenden Blockierungslösung pipettiert.

Blockierungslösung:

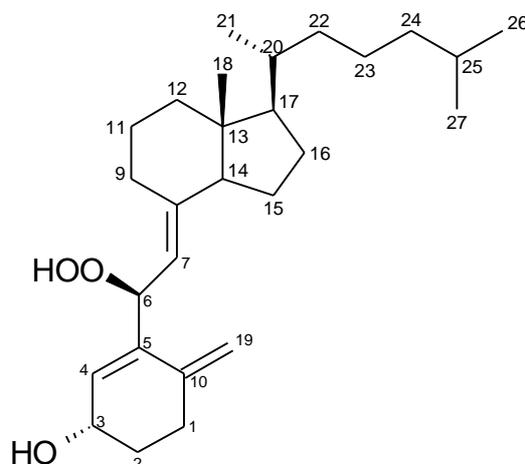
Waschlösung	1% BSA
-------------	--------

Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgt die Inkubation mit den Proben bzw. Standards. Die Standards werden durch Verdünnen der Stammlösung (3ng/ml) mit aprotininhaltigem Behandlungsmedium hergestellt (150 pg NGF - 12.5 pg NGF). Für die Standardkurve werden 6 Eichpunkte gewählt. Als Nullpunkt dient das Medium. Mindestens drei wells werden mit der gleichen Probe bzw. Standard (50 µl) beschickt. Es erfolgt eine fünfstündige Inkubation bei RT. Im Anschluß wird erneut dreimal gewaschen und mit je 50 µl 40-fach verdünnter Anti-NGF-β-Gal Stammlösung (4U/ml) über Nacht bei 8 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden in jedes Well 100 µl Substratlösung pipettiert und 5h bei RT im Dunkeln inkubiert.

Substratlösung:

100 ml Waschpuffer	2 mg MUG
--------------------	----------

Die ELISA-Platte wird im Fluoreszenzphotometer vermessen. Dazu stellt man als Exzitationswellenlänge 360 nm und als Emissionswellenlänge 450 nm ein.

(4E,7E)-(6S)-6-Hydroperoxy-9,10-secocholesta-4,7,10(19)-trien-3b-ol (12a)

C₂₇H₄₄O₃ (MG = 416.65), farbloses Öl

[α]_D²³ = + 46° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

6.00 (brs, 1H, H ₄)	5.48 (d, ³ J _{6/7} = 8.3 Hz, 1H, H ₇)
5.05 (brs, 1H, H _{19α})	4.89 (d, ³ J _{6/7} = 8.3 Hz, 1H, H ₆)
4.90 (brs, 1H, H _{19β})	4.39 (m, 1H, H ₃)
2.76 (m, 1H, H _{9α})	2.49 (m, 1H, H _{1α})
2.30 (m, 1H, H _{1β})	2.04-1.76 (m, 4H, H ₂ , H _{12α} , H ₁₄)
1.73-1.56 (m, 3H, H _{9β} , H _{15α} , H _{16α})	1.54-1.40 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)
1.39-1.21 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} , H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})	1.18-1.03 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)
0.98 (m, 1H, H _{22β})	0.91 (d, ³ J _{21/20} = 6.5 Hz, 3H, H ₂₁)
0.85 (d, ³ J _{25/27} = 6.8 Hz, 3H, H ₂₇)	0.84 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)
0.56 (s, 3H, H ₁₈)	

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

148.5 (s, C ₁₀)	140.3 (s, C ₈)	138.0 (s, C ₅)
130.0 (d, C ₄)	117.3 (d, C ₇)	110.5(t, C ₁₉)
80.8 (d, C ₆)	66.6 (d, C ₃)	56.7 (d, C ₁₇)
56.00 (d, C ₁₄)	45.7 (s, C ₁₃)	40.3 (t, C ₁₂)

39.5 (t, C ₂₄)	36.2 (t, C ₂₂)	36.1 (d, C ₂₀)
32.3 (t, C ₂)	29.6 (t, C ₉)	29.5 (t, C ₁)
28.0 (d, C ₂₅)	27.6 (t, C ₁₆)	23.9 (t, C ₁₅)
23.7 (t, C ₂₃)	22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.2 (t, C ₁₁)	18.9 (q, C ₂₁)	12.0 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

134 (100), 147 (59), 105 (53), 107 (51), 109 (51), 149 (41), 119 (40), 165 (40), 247 (37), 117 (32), 131 (32), 175 (22), 398 (16), 382 (10),
kein M⁺-Signal

MS (CI⁺, Ammoniak):

381 (100), 398 (52), 383 (47), 400 (42), 308 (12), 417 ([M+H]⁺, 11)

IR (KBr, cm⁻¹):

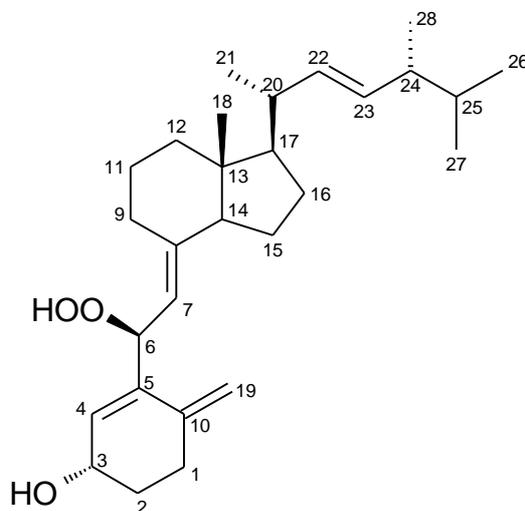
$\nu =$ 3393 (s, OH), 2951 (s; CH), 2869 (s, CH₂), 1668 (m, C=C), 1466 (m, CH₂, CH₃), 1381 (m, CH₃), 1051 (m), 734 (w)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₃]⁺: 416.3290

gefunden: 416.3272

(4E,7E,22E)-(6S)-6-Hydroperoxy-9,10-secoergosta-4,7,10(19),22-tetraen-3b-ol (12b)



$C_{28}H_{44}O_3$ (MG = 428.66), farbloses Öl

$[a]_D^{25} = +43^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

5.99 (brs, 1H, H_4)	5.49 (d, $^3J_{6/7} = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H_7)
5.17 (m, 2H, H_{22} und H_{23})	5.09 (brs, 1H, $H_{19\alpha}$)
4.92 (brs, 1H, $H_{19\beta}$)	4.91 (d, $^3J_{6/7} = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H_6)
4.39 (m, 1H, H_3)	2.76 (m, 1H, $H_{9\alpha}$)
2.47 (m, 1H, $H_{1\alpha}$)	2.30 (m, 1H, $H_{1\beta}$)
2.06-1.90 (m, 4H, H_2 , $H_{12\alpha}$, H_{14})	1.86-1.77 (m, 2H, H_{20} , H_{24})
1.73-1.61 (m, 3H, $H_{9\beta}$, $H_{15\alpha}$, $H_{16\alpha}$)	1.50-1.37 (m, 3H, H_{11} , H_{25})
1.36-1.18 (m, 4H, $H_{12\beta}$, $H_{16\beta}$, H_{17} , $H_{15\beta}$)	1.00 (d, $^3J_{20/21} = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, H_{21})
0.89 (d, $^3J_{24/28} = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, H_{28})	0.81 (d, $^3J_{25/27} = 6.4 \text{ Hz}$, 3H, H_{27})
0.80 (d, $^3J_{25/26} = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, H_{26})	0.57 (s, 3H, H_{18})

$^{13}\text{C-NMR}$ (22.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

148.2 (s, C ₁₀)	140.4 (s, C ₈)	138.2 (s, C ₅)
135.5 (d, C ₂₃)	132.0 (d, C ₂₂)	129.4 (d, C ₄)
117.3 (d, C ₇)	110.2 (t, C ₁₉)	80.4 (d, C ₆)
66.5 (d, C ₃)	56.4 (d, C ₁₇)	55.9 (d, C ₁₄)
45.9 (s, C ₁₃)	42.8 (d, C ₂₄)	40.1 (d, C ₂₀)
40.0 (t, C ₁₂)	33.0 (d, C ₂₅)	32.2 (t, C ₂)
29.4 (t, C ₉)	29.4 (t, C ₁)	27.6 (t, C ₁₆)
23.6 (t, C ₁₅)	22.1 (t, C ₁₁)	21.0 (q, C ₂₁)
19.9 (q, C ₂₆)	19.6 (q, C ₂₇)	17.6 (q, C ₂₈)
12.1 (q, C ₁₈)		

MS (Cl⁺, Ammoniak):

412 (100), 393 (92), 427 (83), 409 (56), 411 (45), 395 (28), 429
([M+H]⁺, 24), 376 (20) 446 ([M+NH₄]⁺, 18)

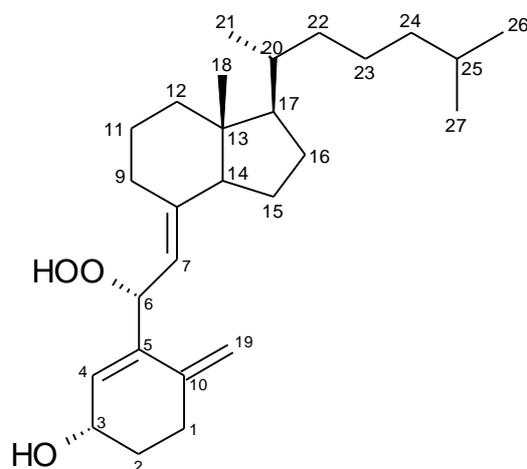
IR (KBr, cm⁻¹):

ν = 3403 (s, OH), 2957 (s; CH), 2870 (s, CH₂), 1659 (w, C=C), 1456 (m,
CH₂/CH₃), 1372 (m, CH₃), 1049 (w), 972 (m, trans Ethylene),

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₈H₄₄O₂₃]⁺: 428.3290

gefunden: 428.3260

(4E,7E)-(6R)-6-Hydroperoxy-9,10-secocholesta-4,7,10(19)-trien-3 β -ol (13a)

C₂₇H₄₄O₃ (MG = 416.65), farbloses Öl

[α]_D²³ = + 24° (*c* = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

6.02 (brs, 1H, H ₄)	5.52 (d, ³ J _{6/7} = 8.8 Hz, 1H, H ₇)
5.11 (brs, 1H, H _{19α})	4.97 (d, ³ J _{6/7} = 8.8 Hz, 1H, H ₆)
4.94 (brs, 1H, H _{19β})	4.42 (m, 1H, H ₃)
2.74 (m, 1H, H _{9α})	2.48 (m, 1H, H _{1α})
2.37 (m, 1H, H _{1β})	2.09-1.73 (m, 4H, H ₂ , H _{12α} , H ₁₄)
1.73-1.54 (m, 3H, H _{9β} , H _{15α} , H _{16α})	1.53-1.40 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)
1.39-1.20 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} , H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})	1.19-1.03 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)
1.01 (m, 1H, H _{22β})	0.90 (d, ³ J _{21/20} = 6.3 Hz, 3H, H ₂₁)
0.86 (d, ³ J _{25/27} = 6.7 Hz, 3H, H ₂₇)	0.85 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)
0.49 (s, 3H, H ₁₈)	

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

148.4 (s, C ₁₀)	140.3 (s, C ₈)	137.7 (s, C ₅)
130.4 (d, C ₄)	117.4 (d, C ₇)	110.5 (t, C ₁₉)
81.1 (d, C ₆)	66.7 (d, C ₃)	57.7 (d, C ₁₇)

56.0 (d, C ₁₄)	46.2 (s, C ₁₃)	40.3 (t, C ₁₂)
39.6 (t, C ₂₄)	36.2 (t, C ₂₂)	36.1 (d, C ₂₀)
32.5 (t, C ₂)	30.0 (t, C ₉)	29.8 (t, C ₁)
28.1 (d, C ₂₅)	27.6 (t, C ₁₆)	23.9 (t, C ₁₅)
23.5 (t, C ₂₃)	22.9 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.2 (t, C ₁₁)	18.9 (q, C ₂₁)	12.0 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

135 (100), 109 (79), 105 (77), 107 (76), 121 (62), 111 (51), 247 (50), 123 (49), 117 (38), 159 (37), 165 (36), 177 (23), 173 (20), 398 (11), 382 (10),
kein M⁺-Signal

MS (CI⁺, Ammoniak):

399 (100), 381 (56), 401 (47), 383 (40), 417 ([M+H]⁺, 18), 308 (10),
434 ([M+NH₄]⁺, 6)

IR (KBr, cm⁻¹):

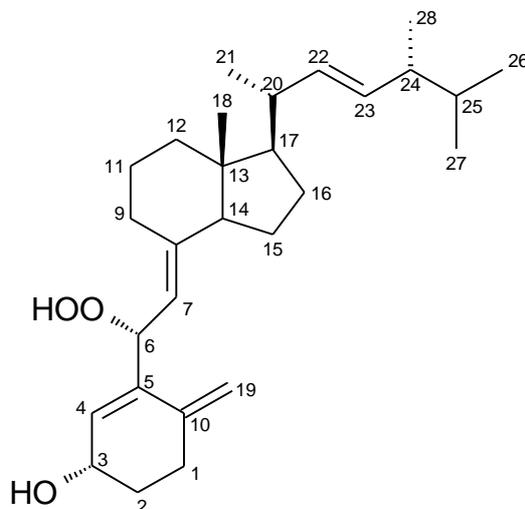
$\nu =$ 3393 (s, OH), 2950 (s; CH), 2869 (s, CH₂), 1668 (m, C=C), 1466 (m, CH₂,
CH₃), 1381 (m, CH₃), 1052 (m)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₃]⁺: 416.3290

gefunden: 416.3298

(4E,7E,22E)-(6R)-6-Hydroperoxy-9,10-secoergosta-4,7,10(19),22-tetraen-3b-ol (13b)



$C_{28}H_{44}O_3$ (MG = 428.66), farbloses Öl

$[a]_D^{23} = +09^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

6.01 (brs, 1H, H_4)	5.51 (d, $^3J_{6/7} = 8.7 \text{ Hz}$, 1H, H_7)
5.17 (m, 2H, H_{22} und H_{23})	5.10 (brs, 1H, $H_{19\alpha}$)
4.96 (d, $^3J_{6/7} = 8.7 \text{ Hz}$, 1H, H_6)	4.93 (brs, 1H, $H_{19\beta}$)
4.40 (m, 1H, H_3)	2.74 (m, 1H, $H_{9\alpha}$)
2.45 (m, 1H, $H_{1\alpha}$)	2.35 (m, 1H, $H_{1\beta}$)
2.07-1.89 (m, 4H, H_2 , $H_{12\alpha}$, H_{14})	1.86-1.78 (m, 2H, H_{20} , H_{24})
1.73-1.62 (m, 3H, $H_{9\beta}$, $H_{15\alpha}$, $H_{16\alpha}$)	1.51-1.37 (m, 3H, H_{11} , H_{25})
1.34-1.19 (m, 4H, $H_{12\beta}$, $H_{16\beta}$, H_{17} , $H_{15\beta}$)	0.98 (d, $^3J_{20/21} = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, H_{21})
0.89 (d, $^3J_{24/28} = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, H_{28})	0.82 (d, $^3J_{25/27} = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, H_{27})
0.80 (d, $^3J_{25/26} = 6.3 \text{ Hz}$, 3H, H_{26})	0.48 (s, 3H, H_{18})

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

148.2 (s, C_{10})	140.3 (s, C_8)	137.8 (s, C_5)
135.5 (d, C_{23})	132.2 (d, C_{22})	130.4 (d, C_4)
117.4 (d, C_7)	110.5 (t, C_{19})	81.1 (d, C_6)

66.7 (d, C ₃)	56.5 (d, C ₁₇)	56.0 (d, C ₁₄)
46.0 (s, C ₁₃)	42.9 (d, C ₂₄)	40.3 (d, C ₂₀)
39.8 (t, C ₁₂)	33.1 (d, C ₂₅)	31.8 (t, C ₂)
29.9 (t, C ₉)	29.8 (t, C ₁)	27.7 (t, C ₁₆)
23.4 (t, C ₁₅)	22.1 (t, C ₁₁)	21.1 (q, C ₂₁)
20.0 (q, C ₂₆)	19.7 (q, C ₂₇)	17.6 (q, C ₂₈)
12.2 (q, C ₁₈)		

MS (Cl⁺, Ammoniak):

411 (100), 393 (42), 413 (41), 396 (31), 395 (29), 376 (23)
429 ([M+H]⁺, 11)

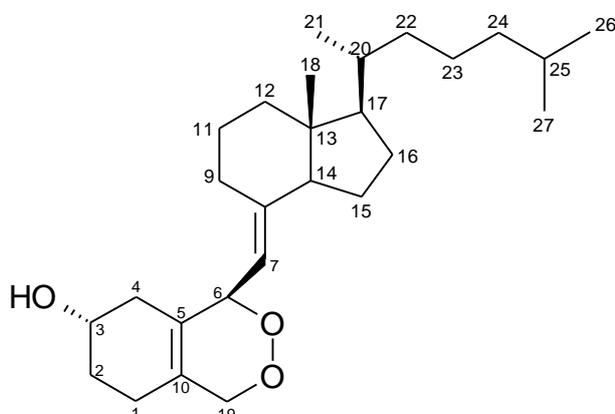
IR (KBr, cm⁻¹):

ν = 3358 (s, OH), 2955 (s; CH), 2870 (s, CH₂), 1659 (m, C=C), 1456 (m, CH₂/CH₃), 1371 (m, CH₃), 1049 (m), 972 (s, trans Ethylene),

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₈H₄₄O₃]⁺: 428.3290

gefunden: 428.3260

(5Z,7E)-(6R)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3b-ol (14a)

C₂₇H₄₄O₃ (MG = 416.65), farbloses Öl

[α]_D²⁵ = + 82° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.19 (d, ³ J _{6/7} = 9.3 Hz, 1H, H ₆)	4.92 (d, ³ J _{6/7} = 9.3 Hz, 1H, H ₇)
4.48 (d, ² J = 15.6 Hz, 1H, H _{19α})	4.31 (d, ² J = 15.6 Hz, 1H, H _{19β})
4.10 (m, 1H, H ₃)	2.67 (m, 1H, H _{9α})
2.32 (brd, 1H, ² J = 14.4 Hz, H _{4α})	2.10 (m, 1H, H _{1α})
2.07-1.95 (m, 3H, H _{4β} , H _{12α} , H ₁₄)	1.92-1.81 (m, 2H, H _{1β} , H _{2α})
1.80-1.56 (m, 4H, H _{2β} , H _{9β} , H _{15α} , H _{16α})	1.55-1.40 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)
1.39-1.20 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} , H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})	1.18-1.06 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)
1.00 (m, 1H, H _{22β})	0.92 (d, ³ J _{21/20} = 6.3 Hz, 3H, H ₂₁)
0.87 (d, ³ J _{25/27} = 6.7 Hz, 3H, H ₂₇)	0.86 (d, ³ J _{25/26} = 6.5 Hz, 3H, H ₂₆)
0.56 (s, 3H, H ₁₈)	

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

148.6 (s, C ₈)	125.9 (s, C ₅)	125.8 (s, C ₁₀)
115.4 (s, C ₇)	76.9 (d, C ₆)	72.2 (t, C ₁₉)
66.1 (d, C ₃)	56.5 (d, C ₁₇)	56.0 (d, C ₁₄)
45.6 (s, C ₁₃)	40.2 (t, C ₁₂)	39.5 (t, C ₂₄)
36.0 (t, C ₂₂)	36.0 (t, C ₂₀)	33.3 (t, C ₂)
31.8 (t, C ₄)	29.6 (t, C ₉)	27.9 (d, C ₂₅)
27.5 (t, C ₁₆)	23.8 (t, C ₁)	23.7 (t, C ₁₅)
23.6 (t, C ₂₃)	22.7 (q, C ₂₇)	22.5 (q, C ₂₆)
22.0 (t, C ₁₁)	18.8 (q, C ₂₁)	12.0 (q, C ₁₈)

MS (Cl⁺, Ammoniak):

399 (100), 382 (14), 380 (10), 434 ([M+NH₄]⁺, 4), 417 ([M+H]⁺, 3)

IR (KBr, cm⁻¹):

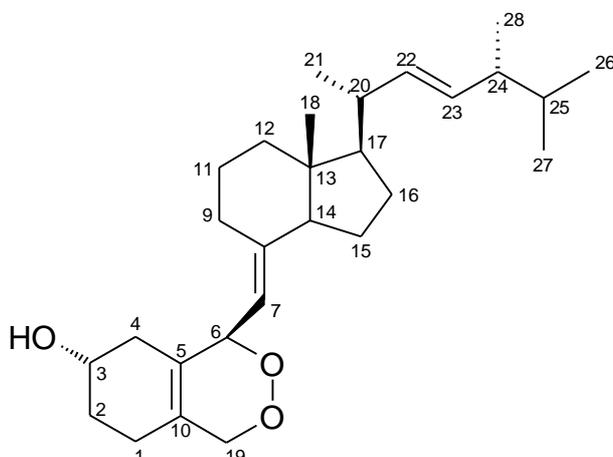
$\nu =$ 3410 (s, OH), 2930 (s; CH), 2870 (s, CH₂), 1661 (w, C=C), 1468 (m, CH₂/CH₃), 1377 (m, CH₃), 1044 (m)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₃]⁺: 416.3290

gefunden: 416.3292

(5Z,7E,22E)-(6R)-6,19-Epidioxy-9,10-secoergosta-5(10),7,22-trien-3b-ol (14b)



C₂₈H₄₄O₃ (MG = 428.66), farbloses Öl

[α]_D²⁵ = + 60° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.18 (m, 3H, H ₆ , H ₂₂ , H ₂₃)	4.87 (d, ³ J _{6/7} = 9.2 Hz, 1H, H ₇)
4.47 (d, ² J = 15.4 Hz, 1H, H _{19α})	4.29 (d, ² J = 15.4 Hz, 1H, H _{19β})
4.09 (m, 1H, H ₃)	2.66 (m, 1H, H _{9α})
2.31 (m, 1H, H _{4α})	2.10 (m, 1H, H _{1α})
2.06-1.92 (m, 3H, H _{4β} , H _{12α} , H ₁₄)	1.88-1.58 (m, 8H, H _{1β} , H ₂ , H _{9β} , H _{15α} , H _{16α} , H ₂₀ , H ₂₄)
1.51-1.38 (m, 3H, H ₁₁ , H ₂₅)	1.37-1.18 (m, 4H, H _{12β} , H _{16β} , H ₁₇ , H _{15β})
1.01 (d, ³ J _{20/21} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₁)	0.90 (d, ³ J _{24/28} = 6.7 Hz, 3H, H ₂₈)

0.82 (d, $^3J_{25/27} = 6.4$ Hz, 3H, H₂₇)0.81 (d, $^3J_{25/26} = 6.4$ Hz, 3H, H₂₆)0.56 (s, 3H, H₁₈)**¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):**

148.5 (s, C ₈)	135.6 (d, C ₂₃)	132.2 (d, C ₂₂)
125.9 (s, C ₅)	125.8 (s, C ₁₀)	115.5 (s, C ₇)
76.8 (d, C ₆)	72.3 (t, C ₁₉)	66.2 (d, C ₃)
56.5 (d, C ₁₇)	56.2 (d, C ₁₄)	45.6 (s, C ₁₃)
42.9 (d, C ₂₄)	40.4 (t, C ₂₀)	40.1 (t, C ₁₂)
33.4 (t, C ₂)	33.2 (d, C ₂₅)	29.7 (t, C ₄)
29.5 (t, C ₉)	27.8 (t, C ₁₆)	23.7 (t, C ₁₅)
23.3 (t, C ₁)	22.1 (t, C ₁₁)	21.2 (q, C ₂₁)
20.0 (q, C ₂₆)	19.7 (q, C ₂₇)	17.7 (q, C ₂₈)
12.4 (q, C ₁₈)		

MS (EI, 70eV):

151 (100), 133 (73), 107 (58), 134 (57), 109 (47), 146 (43), 285 (41),
410 (40), 169 (31), 267 (22), 411 (12) 428 ([M]⁺, 3)

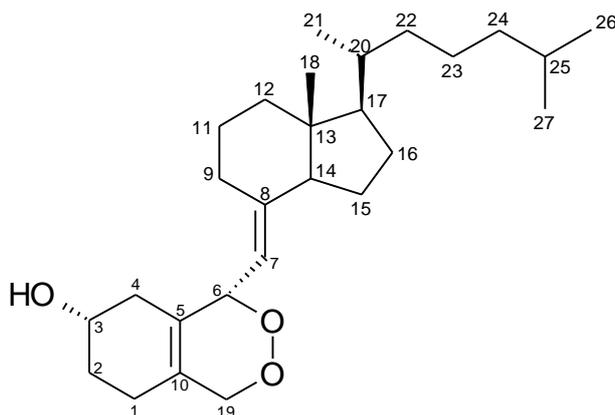
IR (KBr, cm⁻¹):

$\nu =$ 3408 (s, OH), 2955 (s; CH), 2871 (s, CH₂), 1458 (m, CH₂, CH₃), 1372
(m, CH₃), 1026 (w), 972 (w), 699 (s)

Massenfeinbestimmung:berechnet für [C₂₈H₄₄O₃]⁺: 428.3290

gefunden: 428.3325

(5Z,7E)-(6S)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3 β -ol (15a)



$C_{27}H_{44}O_3$ (MG = 416.65), farbloses Öl

$[\alpha]_D^{25} = +24^\circ$ ($c = 1.0$ mg/ml, MeOH)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

5.27 (d, $^3J_{6/7} = 8.8$ Hz, 1H, H ₆)	4.76 (d, $^3J_{6/7} = 8.8$ Hz, 1H, H ₇)
4.60 (d, $^2J = 15.6$ Hz, 1H, H _{19α})	4.17 (d, $^2J = 15.6$ Hz, 1H, H _{19β})
3.95 (m, 1H, H ₃)	2.71 (m, 1H, H _{9α})
2.15-1.80 (m, 8H, H ₁ , H ₂ , H ₄ ; H _{12α} , H ₁₄)	1.67-1.56 (m, 3H, H _{9β} , H _{15α} , H _{16α})
1.55-1.41 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅) H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})	1.39-1.23 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} ,
1.18-1.05 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)	1.00 (m, 1H, H _{22β})
0.91 (d, $^3J_{21/20} = 6.3$ Hz, 3H, H ₂₁)	0.87 (d, $^3J_{25/27} = 6.7$ Hz, 3H, H ₂₇)
0.86 (d, $^3J_{25/26} = 6.5$ Hz, 3H, H ₂₆)	0.56 (s, 3H, H ₁₈)

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

149.5 (s, C ₈)	126.8 (s, C ₅)	125.9 (s, C ₁₀)
114.5 (s, C ₇)	76.7 (d, C ₆)	72.2 (t, C ₁₉)
67.5 (d, C ₃)	56.6 (d, C ₁₇)	56.0 (d, C ₁₄)
45.6 (s, C ₁₃)	40.3 (t, C ₁₂)	39.5 (t, C ₂₄)
36.1 (t, C ₂₂)	36.0 (t, C ₂₀)	33.7 (t, C ₂)
30.9 (t, C ₄)	29.6 (t, C ₉)	27.9 (d, C ₂₅)
27.5 (t, C ₁₆)	24.4 (t, C ₁)	23.8 (t, C ₁₅)
23.7 (t, C ₂₃)	22.7 (q, C ₂₇)	22.5 (q, C ₂₆)

22.1 (t, C₁₁)18.8 (q, C₂₁)11.7 (q, C₁₈)**MS (Cl⁺, Ammoniak):**

399 (100), 282 (23), 415 (20), 412 (19), 381 (16), 434 ([M+NH₄]⁺, 12),
417 ([M+H]⁺, 6)

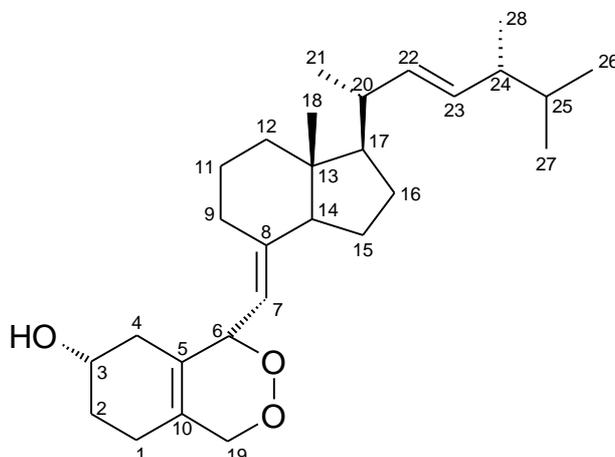
IR (KBr, cm⁻¹):

ν = 3416 (s, OH), 2951 (s; CH), 2867 (s, CH₂), 1661 (w, C=C), 1468 (m,
CH₂/CH₃), 1381 (m, CH₃), 1039 (m)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₃]⁺: 416.3290

gefunden: 416.3272

(5Z,7E,22E)-(6S)-6,19-Epidioxy-9,10-secoergosta-5(10),7,22-trien-**3b-ol (15b)**

C₂₈H₄₄O₃ (MG = 428.66), farbloses Öl

[**a**]_D²⁵ = + 10° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.26 (d, ³J_{6/7} = 8.8 Hz, 1H, H₆)

5.17 (m, 2H, H₂₂, H₂₃)

4.75 (d, ³J_{6/7} = 8.8 Hz, 1H, H₇)

4.59 (d, ²J = 15.4 Hz, 1H, H_{19 α})

4.16 (d, $^2J = 15.4$ Hz, 1H, H _{19β})	3.92 (m, 1H, H ₃)
2.71 (m, 1H, H _{9α})	2.10-1.80 (m, 7H, H _{1α} , H ₄ , H _{9β} , H _{12α} , H ₁₄ , H ₂₀)
1.73-1.53 (m, 7H, H _{1β} , H ₂ , H _{15α} , H _{16α} , H ₂₄)	1.49-1.36 (m, 3H, H ₁₁ , H ₂₅)
1.34-1.18 (m, 4H, H _{12β} , H _{16β} , H ₁₇ , H _{15β})	1.00 (d, $^3J_{20/21} = 6.6$ Hz, 3H, H ₂₁)
0.90 (d, $^3J_{24/28} = 6.9$ Hz, 3H, H ₂₈)	0.82 (d, $^3J_{25/27} = 6.4$ Hz, 3H, H ₂₇)
0.81 (d, $^3J_{25/26} = 6.4$ Hz, 3H, H ₂₆)	0.56 (s, 3H, H ₁₈)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

148.4 (s, C ₈)	135.6 (d, C ₂₃)	132.2 (d, C ₂₂)
126.8 (s, C ₅)	125.9 (s, C ₁₀)	114.6 (s, C ₇)
76.7 (d, C ₆)	72.2 (t, C ₁₉)	67.6 (d, C ₃)
56.5 (d, C ₁₇)	56.1 (d, C ₁₄)	45.6 (s, C ₁₃)
42.9 (d, C ₂₄)	40.3 (t, C ₂₀)	40.2 (t, C ₁₂)
33.8 (t, C ₂)	33.2 (d, C ₂₅)	31.0 (t, C ₄)
29.7 (t, C ₉)	27.7 (t, C ₁₆)	24.5 (t, C ₁)
23.8 (t, C ₁₅)	22.2 (t, C ₁₁)	21.2 (q, C ₂₁)
19.9 (q, C ₂₆)	19.6 (q, C ₂₇)	17.7 (q, C ₂₈)
12.2 (q, C ₁₈)		

MS (EI, 70eV):

151 (100), 133 (74), 107 (58), 134 (57), 109 (48), 410 (44), 146 (43),
285 (42), 169 (32), 267 (23), 411 (14) 428 ([M]⁺, 2)

IR (KBr, cm⁻¹):

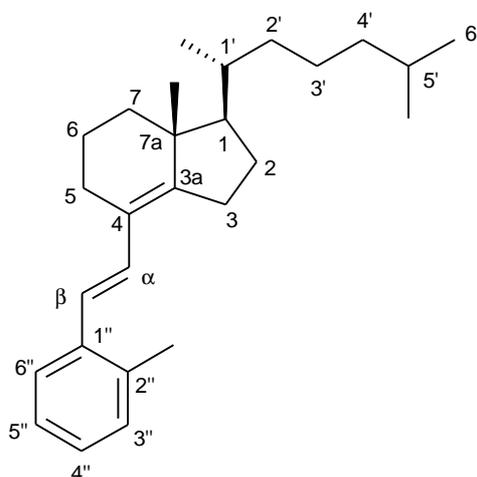
$\nu =$ 3408 (s, OH), 2954 (s; CH), 2871 (s, CH₂), 1456 (m, CH₂, CH₃), 1371
(m, CH₃), 1026 (w), 972 (w), 699 (s)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₈H₄₄O₃]⁺: 428.3290

gefunden: 428.3273

1((R)-1',5'-dimethylhexyl)-4((aE)-2''-methylstyryl)-7a-methyl-(1a,7aa)-5,6,7,7a-tetrahydroindan (36a)



$C_{27}H_{40}$ (MG = 364.62), farbloses Öl $[\alpha]_D^{25} = +40^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

7.47 (d, $^3J_{5''/6''} = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, $H_{6''}$)	7.11 (m, 3H, $H_{5''}$, $H_{4''}$, $H_{3''}$)
6.91 (d, $^3J_{\alpha/\beta} = 16.1 \text{ Hz}$, 1H, H_{β})	6.62 (d, $^3J_{\alpha/\beta} = 16.1 \text{ Hz}$, 1H, H_{α})
2.35 (s, 3H, CH_3 an $C_{2''}$)	2.47 (m, 1H, $H_{5\alpha}$)
2.02 (ddd, $^2J = 12.6 \text{ Hz}$, $^3J_{7\alpha/6\alpha} =$ $^3J_{7\alpha/6\beta} = 3.6 \text{ Hz}$, 1H, $H_{7\alpha}$)	1.90-1.76 (m, 3H, $H_{5\beta}$, $H_{3\alpha}$, $H_{2\alpha}$)
1.61 - 1.44 (m, 4H, H_6 , $H_{2\beta}$, H_5)	1.36 - 1.24 (m, 4H, $H_{3\beta}$, $H_{1'}$ $, H_{2'\alpha}$, $H_{3'\alpha}$)
1.44 - 1.05 (m, 6H, $H_{7\beta}$, H_1 , $H_{2'\beta}$, $H_{3'\beta}$, $H_{4'}$)	0.97 (d, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, 3H, CH_3 an $C_{1''}$)
0.94 (s, 3H, CH_3 an C_{7a})	0.87 (d, $^3J = 6.4 \text{ Hz}$, 3H, CH_3)
0.86 (d, $^3J = 6.4 \text{ Hz}$, 3H, CH_3)	

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

151.4 (s, C_{3a})	137.7 (s, $C_{1''}$)	135.4 (s, $C_{2''}$)
130.3 (d, C_{α})	129.9 (d, $C_{3''}$)	126.7 (d, $C_{6''}$)

126.1 (d, C _β)	125.2 (d, C _{4''})	124.6 (s, C ₄)
122.9 (d, C _{5''})	56.3 (d, C ₁)	44.2 (s, C _{7a})
39.6 (t, C _{4'})	37.2 (t, C ₇)	36.0 (t, C _{2'})
34.7 (d, C _{1'})	28.1 (d, C _{5'})	27.2 (t, C ₃)
26.0 (t, C ₂)	24.4 (t, C _{3'})	23.8 (t, C ₅)
22.9 (q, CH ₃)	22.7 (q, CH ₃)	20.0 (q, CH ₃ an C _{2''})
19.2 (q, CH ₃ an C _{1'})	19.1 (t, C ₆)	18.3 (q, CH ₃ an C _{7a})

MS (EI, 70eV):

251 (100), 197 (79), 155 (64), 364 ([M]⁺, 63), 105, (55), 133 (54) 131
(50), 181 (49), 209 (48), 349 (42), 169 (46), 365(20)

MS (CI⁺, Ammoniak):

365 ([M+H]⁺, 100), 251 (12)

IR (KBr, cm⁻¹):

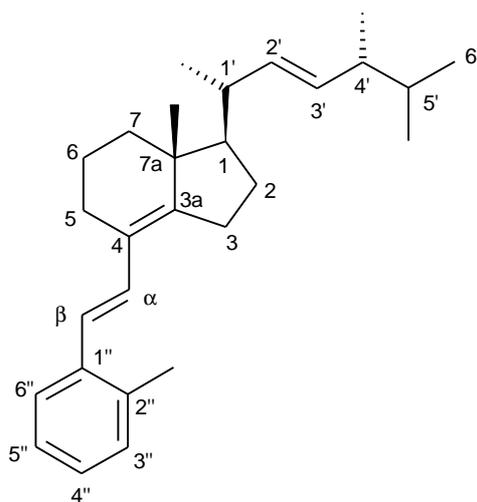
ν = 3090 (w, =C-H), 2930, (s, C-H), 1460 (m, CH₂/CH₃), 1380 (w, CH₃), 1050
(m), 958 (m, trans Ethylene), 746 (1,2 Disubst. Benzole)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₀]⁺: 364.3130

gefunden: 364.3090

**1((2E)-(1'R,4'R)-1',4',5'-trimethyl-2-hexenyl)-4((aE)-2''-methylstyryl)-7a-
methyl-(1a,7aa)-5,6,7,7a-tetrahydroindan (36b)**



$C_{28}H_{40}$ (MG = 376.63), farbloses Öl

$[a]_D^{25} = +18^\circ$ ($c = 1.0$ mg/ml, MeOH)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7.46 (d, $^3J_{5''/6''} = 7.6$ Hz, 1H, $H_{6''}$)	7.12 (m, 3H, $H_{3''}$, $H_{4''}$, $H_{5''}$)
6.89 (d, $^3J_{\alpha/\beta} = 16.0$ Hz, 1H, H_β)	6.61 (d, $^3J_{\alpha/\beta} = 16.0$ Hz, 1H, H_α)
5.23 (m, 2H, $H_{2'}$, $H_{3'}$)	2.46 (m, 1H $H_{5\alpha}$)
2.35 (s, 3H, CH_3 an $C_{2''}$)	2.15 (m, 1H, $H_{1''}$)
2.01 (ddd, $^2J = 12.4$ Hz, $^3J_{7\alpha/6\alpha} =$ $^3J_{7\alpha/6\beta} = 3.5$ Hz, 1H, $H_{7\alpha}$)	1.90-1.75 (m, 3H, $H_{2\alpha}$, $H_{3\alpha}$, $H_{5\beta}$)
1.55 - 1.44 (m, 3H, $H_{2\beta}$, $H_{6\alpha}$, $H_{4'}$)	1.42-1.24 (m, 3H, $H_{3\beta}$, $H_{6\beta}$, $H_{5'}$)
1.24-1.13 (m, 2H, H_{17} , $H_{12\beta}$)	1.06 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3 an $C_{1'}$)
0.95 (s, 3H, CH_3 an C_{7a})	0.93 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3 an $C_{4'}$)
0.85 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3)	0.84 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3)

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

151.2 (s, C_{3a})	137.6 (s, $C_{1''}$)	135.4 (s, $C_{2''}$)
135.3 (d, $C_{3'}$)	132.2 (d, $C_{2'}$)	130.2 (d, C_α)
129.8 (d, $C_{3''}$)	126.6 (d, $C_{6''}$)	126.0 (d, C_β)

125.2 (d, C _{4''})	124.5 (s, C ₄)	122.8 (d, C _{5''})
56.4 (d, C ₁)	44.0 (s, C _{7a})	42.9 (d, C _{4'})
39.3 (d, C _{1'})	37.0 (t, C ₇)	33.2 (d, C _{5'})
27.5 (t, C ₃)	26.0 (t, C ₂)	24.3 (t, C ₅)
21.4 (q, CH ₃ an C _{2''})	20.0 (q, CH ₃)	19.9 (q, CH ₃)
19.7 (t, C ₆)	19.0 (q, CH ₃ an C _{1'})	18.4 (q, CH ₃ an C _{7a})
17.7 (q, CH ₃ an C _{4'})		

MS (EI, 70eV):

55 (100), 69 (95), 105 (72), 119 (53) 81 (51), 133 (42), 149 (38), 109 (32) 150 (21) 251 (13) 276 (10) 376 ([M]⁺, 7)

IR (KBr, cm⁻¹):

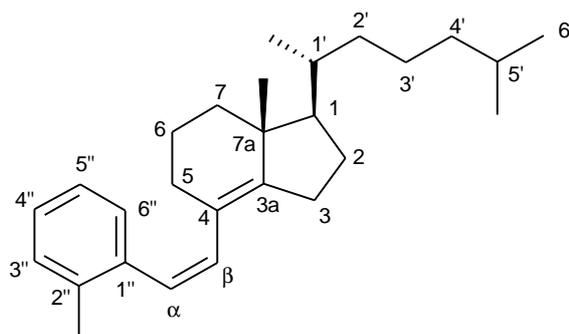
ν = 2960 (s, C-H), 1459 (m, CH₂/CH₃) 1372 (w, CH₃), 972 (m), 958 (m, trans Ethylene), 746 (1,2 Disubst. Benzole)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₈H₄₀]⁺: 376.3130

gefunden: 376.3117

1((R)-1',5'-dimethylhexyl)-4((aZ)-2''-methylstyryl)-7a-methyl-(1a,7aa)-5,6,7,7a-tetrahydroindan (37a)



$C_{27}H_{40}$ (MG = 364.62), farbloses Öl

$[\alpha]_D^{25} = +32^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

7.19 (d, $^3J_{5''/6''} = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, $H_{6''}$)	7.13 - 7.01 (m, 3H, $H_{3''}$, $H_{4''}$, $H_{5''}$)
6.34 (d, $^3J_{\alpha/\beta} = 12.1 \text{ Hz}$, 1H, H_{α})	6.14 (d, $^3J_{\alpha/\beta} = 12.1 \text{ Hz}$, 1H, H_{β})
2.25 (s, 3H, CH_3 an $C_{2''}$)	2.14 (m, 1H, $H_{5\alpha}$)
1.91 (ddd, $^2J = 12.6 \text{ Hz}$, $^3J_{7\alpha/6\alpha} =$ $^3J_{7\alpha/6\beta} = 3.6 \text{ Hz}$, 1H, $H_{7\alpha}$)	1.84-1.72 (m, 3H, $H_{2\alpha}$, $H_{3\alpha}$, $H_{5\beta}$)
1.66 - 1.43 (m, 4H, $H_{2\beta}$, H_6 , $H_{5'}$)	1.42 (m, 1H, $H_{1''}$)
1.36 - 1.24 (m, 3H, $H_{3\beta}$, $H_{2'\alpha}$, $H_{3'\alpha}$)	1.24 - 0.98 (m, 6H, H_1 , $H_{7\beta}$, $H_{2'\beta}$, $H_{3'\beta}$, $H_{4'}$)
0.91 (d, $^3J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, CH_3 an $C_{1'}$)	0.85 (d, $^3J = 6.4 \text{ Hz}$, 3H, CH_3)
0.84 (d, $^3J = 6.4 \text{ Hz}$, 3H, CH_3)	0.79 (s, 3H, CH_3 an C_{7a})

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

147.6 (s, C_{3a})	138.3 (s, $C_{1''}$)	135.6 (s, $C_{2''}$)
131.5 (d, C_{β})	129.6 (d, $C_{3''}$)	128.8 (d, $C_{6''}$)
127.1 (d, C_{α})	126.7 (d, $C_{4''}$)	125.1 (d, $C_{5''}$)
124.4 (s, C_4)	56.2 (d, C_1)	43.5 (s, C_{7a})
39.6 (t, $C_{4'}$)	37.1 (t, C_7)	35.9 (t, C_2)
34.8 (d, $C_{1'}$)	28.0 (d, $C_{5'}$)	27.6 (t, C_3)
27.1 (t, C_2)	26.2 (t, $C_{3'}$)	23.8 (t, C_5)
22.9 (q, CH_3)	22.6 (q, CH_3)	20.0 (q, CH_3 an $C_{2''}$)
19.5 (t, C_6)	19.0 (q, CH_3 an $C_{1'}$)	17.8 (q, CH_3 an C_{7a})

MS (EI, 70eV):

251 (100), 197 (78), 155 (68), 364 ($[M]^+$, 57), 105, (55), 133 (50) 131
(48), 181 (47), 209 (47), 169 (43), 349 (40), 365(20)

MS (Cl^+ , Ammoniak):

365 ($[M+H]^+$, 100), 251 (12), 363 (10)

IR (KBr, cm^{-1}):

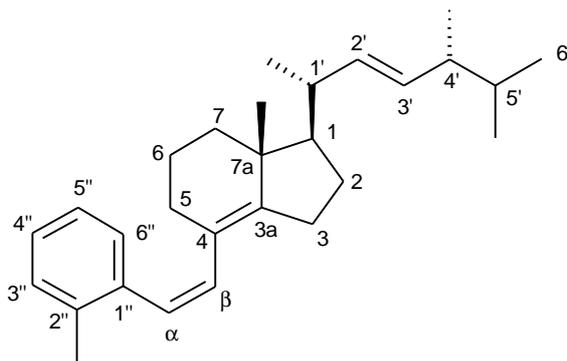
$\nu =$ 3088 (w, =C-H), 2935, (s, C-H), 1460 (m, CH_2/CH_3), 1382 (w, CH_3), 1048
(m), 743 (1,2 Disubst. Benzole)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für $[C_{27}H_{40}]^+$: 364.3130

gefunden: 364.3088

1((2E)-(1'R,4'R)-1',4',5'-trimethyl-2-hexenyl)-4((aZ)-2''-methylstyryl)-7a-methyl-(1a,7aa)-5,6,7,7a-tetrahydroindan (37b)



$C_{28}H_{40}$ (MG = 376.63), farbloses Öl

$[a]_D^{25} = 12^\circ$ ($c = 1.0$ mg/ml, MeOH)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

7.22 (d, $^3J_{5''/6''} = 7.6$ Hz, 1H, H _{6''})	7.16 - 7.01 (m, 3H, H _{3''} , H _{4''} , H _{5''})
6.33 (d, $^3J_{\alpha/\beta} = 12.0$ Hz, 1H, H _{α})	6.12 (d, $^3J_{\alpha/\beta} = 12.0$ Hz, 1H, H _{β})
5.18 (m, 2H, H _{2'} , H _{3'})	2.24 (s, 3H, CH ₃ an C _{2''})
2.12-2.0 (m, 2H, H _{5α} , H _{1'})	1.88 (ddd, $^2J = 12.4$ Hz, $^3J_{7\alpha/6\alpha} =$ $^3J_{7\alpha/6\beta} = 3.5$ Hz, 1H, H _{7α})
1.84-1.72 (m, 3H, H _{2α} , H _{3α} , H _{5β})	1.65-1.52 (m, 3H, H _{2β} , H _{6α} , H _{4'})
1.44 (m, 1H, H _{5'})	1.38-1.21 (m, 2H, H _{3β} , H _{6β})
1.20-1.12 (m, 2H, H ₁ , H _{7β})	0.99 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, CH ₃ an C _{1'})
0.89 (d, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, CH ₃ an C _{4'})	0.81 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, CH ₃)
0.79 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3H, CH ₃)	0.79 (s, 3H, CH ₃ an C _{7a})

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

147.5 (s, C _{3a})	138.2 (s, C _{1''})	135.6 (s, C _{2''})
135.5 (d, C _{3'})	132.0 (d, C _{2'})	131.4 (d, C _{β})
129.5 (d, C _{3''})	128.7 (d, C _{6''})	127.1 (d, C _{α})
126.6 (d, C _{4''})	125.1 (d, C _{5''})	124.5 (s, C ₄)
56.3 (d, C ₁)	43.3 (s, C _{7a})	42.9 (d, C _{4'})
39.4 (d, C _{1'})	36.9 (t, C ₇)	33.1 (d, C _{5'})
27.6 (t, C ₃)	27.5 (t, C ₂)	26.4 (t, C ₅)
21.2 (q, CH ₃ an C _{2''})	20.0 (q, CH ₃)	19.9 (q, CH ₃)
19.7 (t, C ₆)	19.3 (q, CH ₃ an C _{1'})	18.0 (q, CH ₃ an C _{7a})
17.7 (q, CH ₃ an C _{4'})		

MS (EI, 70eV):

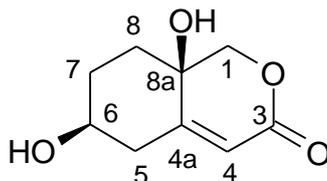
55 (100), 69 (94), 105 (90), 251 (68), 91 (60), 133 (50), 81 (45), 109 (31), 119 (30), 376 ([M]⁺, 30), 149 (28), 276 (12)

IR (KBr, cm⁻¹):

$\nu =$ 3090 (w, =C-H), 2937, (s, C-H), 1458 (m, CH₂/CH₃), 1380 (m, CH₃), 1047 (m), 746 (1,2 Disubst. Benzole)

Massenfeinbestimmung:berechnet für $[\text{C}_{28}\text{H}_{40}]^+$: 376.3130

gefunden: 376.3170

6a,8aa-Dihydroxy-1,5,6,7,8,8a-hexahydroisochroman-3-on (42) $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ (MG = 184.19), farblose Plättchen $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -85^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

Fp = 73 °C (Diethylether)

 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- D_4), δ (ppm):

5.79 (brs, 1H, H_4)	4.24 (m, 2H, H_1)
3.64 (m, 1H, H_6)	2.51 (ddd, $^2\text{J} = 14.3 \text{ Hz}$; $^3\text{J}_{5\alpha/6} = 4.7 \text{ Hz}$; $^4\text{J}_{4/5\alpha} = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{5\alpha}$)
2.21 (ddd, $^2\text{J} = 14.3 \text{ Hz}$; $^3\text{J}_{5\beta/6} = 11.2 \text{ Hz}$; $^4\text{J}_{4/5\beta} = 2.8 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{4\beta}$)	1.77 (m, 1H, $\text{H}_{7\alpha}$)
1.74 (m, 1H, $\text{H}_{8\alpha}$)	1.69 (m, 1H, $\text{H}_{7\beta}$)
1.34 (m, 1H, $\text{H}_{8\beta}$)	

 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Methanol- D_4), δ (ppm):

166.5 (s, C_3)	161.0 (s, C_{4a})	117.4 (d, C_4)
77.8 (t, C_1)	70.2 (d, C_6)	65.3 (s, C_{8a})
40.1 (t, C_5)	33.0 (t, C_7)	30.1 (t, C_8)

MS (EI, 70eV):

109 (100), 127 (72), 67 (69), 153 (68), 78 (66), 81 (59), 106 (57),
134 (57), 125 (52), 155 (46), 184 (8, $[\text{M}]^+$)

MS (Cl⁺, Ammoniak):

172 (100), 202 (35, [M+NH₄]⁺), 184 (31, [M]⁺), 154 (17), 186 (9), 166 (9),

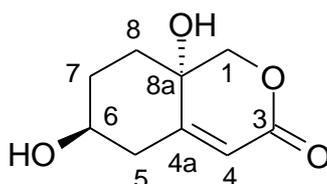
IR (KBr, cm⁻¹):

$\nu =$ 3269 (s; OH), 2943 (w; CH), 1695 (s; C=O), 1436 (w; CH₂), 1297 (m; C-O), 1068 (s; C-O)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₉H₁₂O₄]⁺: 184.0736

gefunden: 184.0761

6a,8ab-Dihydroxy-1,5,6,7,8,8b-hexahydro-isochroman-3-on (43)

C₉H₁₂O₄ (MG = 184.19), farblose Plättchen

[**a**]_D²⁵ = + 74° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

Fp = 71 °C (Diethylether)

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-D₄), δ (ppm)

5.78 (m, 1H, H₄)

4.25 (m, 2H, H₁)

4.17 (m, 1H, H₆)

2.72 (ddd, ²J = 15.7 Hz; ³J_{5 α /6} = 3.6 Hz; ⁴J_{4/5 α} = 2.7 Hz, 1H, H_{5 α})

2.46 (ddd, ²J = 15.7 Hz; ³J_{5 β /6} = 3.0

Hz; ⁴J_{4/5 β} = 2.7 Hz, 1H, H_{5 β})

2.01 (m, 1H, H_{7 α})

1.86 (m, 1H, H_{7 β})

1.73 (m, 1H, H_{8 α})

1.64 (m, 1H, H_{8 β})

^{13}C -NMR (125 MHz, Methanol- D_4), δ (ppm):

166.6 (s, C_3)	160.7 (s, C_{4a})	118.3 (d, C_4)
77.8 (t, C_1)	66.7 (d, C_6)	66.0 (s, C_{8a})
38.0 (t, C_5)	29.1 (t, C_7)	27.5 (t, C_8)

MS (EI, 70eV):

110 (100), 126 (92), 106 (91), 128 (85), 136 (74), 123 (47), 154 (42),
111 (42), 118 (37), 184 (6, $[\text{M}]^+$)

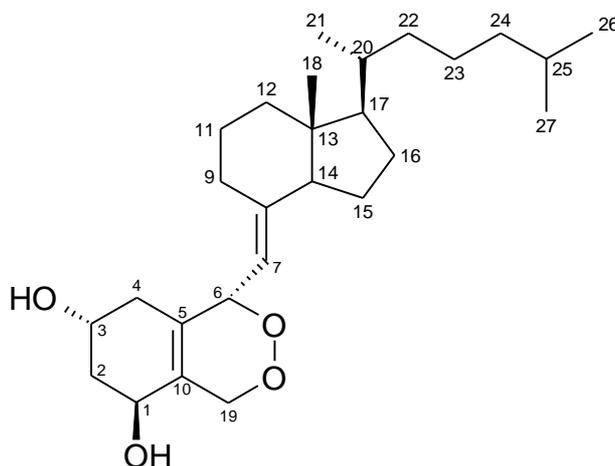
IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3265 (s; OH), 2947 (w; CH), 1687 (s; C=O), 1438 (w; CH_2), 1295 (m;
C-O), 1071 (s; C-O)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für $[\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4]^+$: 184.0736

gefunden: 184.0760

(5E,7E)-(6S)-6,19-Epideoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-1a,3b-diol (44)

$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$ (MG = 432.64), farbloses Öl

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +7^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

5.31 (d, $^3J_{6/7} = 9.1$ Hz, 1H, H ₆)	4.69 (d, $^3J_{6/7} = 9.1$ Hz, 1H, H ₇)
4.68 (d, $^2J = 15.8$ Hz, 1H, H _{19α})	4.59 (d, $^2J = 15.8$ Hz, 1H, H _{19β})
4.24 (m, 1H, C-H ₁)	4.12 (m, 1H, H ₃)
2.62 (m, 1H, H _{9α})	2.39 (m, 1H, H _{4α})
2.03-1.92 (m, 3H, H _{2α} , H _{12α} , H ₁₄) H _{15α} , H _{16α})	1.91-1.69 (m, 5H, H _{2β} , H _{4β} , H _{9β} , H _{15β} , H _{16β})
1.55-1.40 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)	1.39-1.20 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} , H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})
1.16-1.04 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)	0.99 (m, 1H, H _{22β})
0.89 (d, $^3J_{21/20} = 6.4$ Hz, 3H, H ₂₁)	0.84 (d, $^3J_{25/27} = 6.6$ Hz, 3H, H ₂₇)
0.84 (d, $^3J_{25/26} = 6.6$ Hz, 3H, H ₂₆)	0.53 (s, 3H, H ₁₈)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

150.4 (s, C ₈)	131.3 (s, C ₅)	128.0 (s, C ₁₀)
113.5 (s, C ₇)	76.6 (d, C ₆)	70.3 (t, C ₁₉)
65.4 (d, C ₁)	63.9 (d, C ₃)	56.7 (d, C ₁₇)
56.0 (d, C ₁₄)	45.7 (s, C ₁₃)	40.9 (t, C ₂)
40.3 (t, C ₁₂)	39.5 (t, C ₂₄)	36.1 (t, C ₂₂)
36.1 (t, C ₂₀)	34.3 (t, C ₄)	29.7 (t, C ₉)
28.0 (d, C ₂₅)	27.5 (t, C ₁₆)	23.9 (t, C ₁₅)
23.7 (t, C ₂₃)	22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.2 (t, C ₁₁)	18.8 (q, C ₂₁)	11.8 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

265 (100), 363 (94), 378 (84), 133 (83), 211 (80), 119 (72), 171 (59),
364 (51), 250 (48), 379 (40), 414 (12), kein M⁺-Peak

MS (Cl⁺, Ammoniak):

415 (100), 379 (50), 378 (11), 154 (8), 433 ([M+H]⁺, 1)

IR (KBr, cm⁻¹):

$\nu =$ 3402 (s, OH), 2951 (s; CH), 1658 (m, C=C), 1465 (m, CH₂/CH₃),

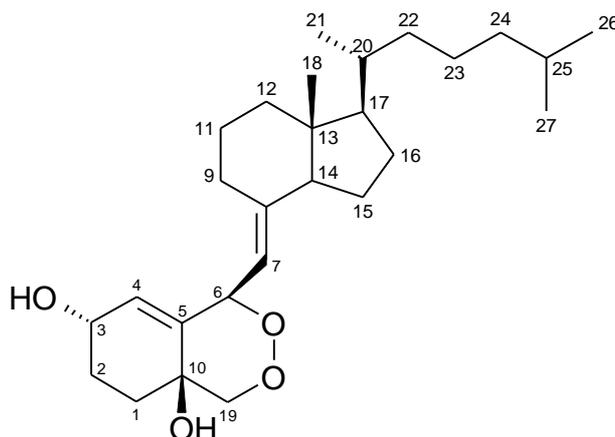
1375 (m, CH₃), 1040 (s)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₄]⁺: 432.3240

gefunden: 432.3270

(4Z,7E)-(6R)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3b,10a-diol (45)



C₂₇H₄₄O₄ (MG = 432.64), farbloses Öl

[*a*]_D²⁵ = ° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), *d*(ppm):

5.78 (d, ³ J _{3/4} = 4.3 Hz, 1H, H ₄)	5.62 (d, ³ J _{6/7} = 7.0 Hz, 1H, H ₇)
5.23 (d, ³ J _{6/7} = 7.0 Hz, 1H, H ₆)	4.25 (m, 1H, H ₃)
4.18 (d, ² J = 12.5 Hz, 1H, H _{19α})	4.09 (d, ² J = 12.5 Hz, 1H, H _{19β})
2.61 (m, 1H, H _{9α})	2.08 (m, 1H, H _{2α})
2.00-1.95 (m, 2H, H _{12α} , H ₁₄)	1.87 (m, 1H, H _{1α})
1.78 (m, 1H, H _{2β})	1.74 - 1.54 (m, 5H, H _{1β} , H _{2β} , H _{9β} , H _{15α} , H _{16α})
1.53-1.38 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)	1.36 - 1.18 (m, 6H, H _{12β} , H _{15α} , H _{16β} , H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})
1.15-1.03 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)	0.98 (m, 1H, H _{22β})
0.89 (d, ³ J _{21/20} = 6.3 Hz, 3H, H ₂₁)	0.84 (d, ³ J _{25/27} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₇)
0.84 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)	0.48 (s, 3H, H ₁₈)

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

145.9 (s, C ₈)	139.0 (s, C ₅)	125.9 (d, C ₄)
117.6 (d, C ₇)	82.5 (t, C ₁₉)	80.9 (d, C ₆)
66.2 (s, C ₁₀)	63.6 (d, C ₃)	56.5 (d, C ₁₇)
55.8 (d, C ₁₄)	46.0 (s, C ₁₃)	40.0 (t, C ₁₂)
39.5 (t, C ₂₄)	36.1 (t, C ₂₂)	36.0 (d, C ₂₀)
29.6 (t, C ₉)	28.0 (d, C ₂₅)	27.5 (t, C ₁₆)
27.1 (t, C ₁)	26.8 (t, C ₂)	23.8 (t, C ₁₅)
23.5 (t, C ₂₃)	22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.1 (t, C ₁₁)	18.8 (q, C ₂₁)	11.8 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

147 (100), 133 (80), 109 (80), 107 (63), 133 (59), 118 (56), 149 (52), 165 (44), 247 (30), 278 (18), 397 (12), 432 ($[\text{M}]^+$, 3)

IR (KBr, cm^{-1}):

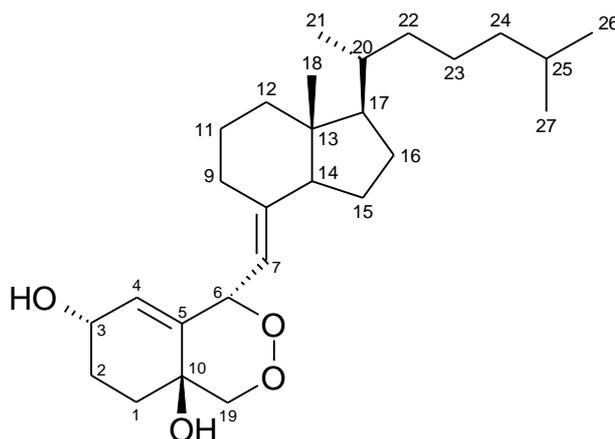
$\nu =$ 3480 (s, OH), 3451 (s, OH), 2920 (s; CH), 2858 (s, CH₂), 1650 (w, C=C),
1469 (m, CH₂, CH₃), 1008 (s, CO)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für $[\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4]^+$: 432.3240

gefunden: 432.3222

(4Z,7E)-(6S)- 6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3b,10a-diol (46)



$C_{27}H_{44}O_4$ (MG = 432.64), farbloses Öl

$[\alpha]_D^{25} = +39^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

5.73 (d, $^3J_{3/4} = 5.4 \text{ Hz}$, 1H, H_4)	5.65 (d, $^3J_{6/7} = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H_6)
4.83 (d, $^3J_{6/7} = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H_7)	4.27 (d, $^2J = 12.9 \text{ Hz}$, 1H, $H_{19\alpha}$)
4.25 (m, 1H, H_3)	4.02 (d, $^2J = 12.9 \text{ Hz}$, 1H, $H_{19\beta}$)
2.60 (m, 1H, $H_{9\alpha}$)	2.08 (m, 1H, $H_{2\alpha}$)
2.04-1.94 (m, 2H, $H_{12\alpha}$, H_{14})	1.87 (m, 1H, $H_{1\alpha}$)
1.79 (m, 1H, $H_{2\beta}$)	1.71 - 1.54 (m, 5H, $H_{1\beta}$, $H_{2\beta}$, $H_{9\beta}$, $H_{15\alpha}$, $H_{16\alpha}$)
1.54-1.44 (m, 4H, H_{11} , H_{20} , H_{25}) H_{17} , $H_{22\alpha}$, $H_{23\alpha}$)	1.39 -1.23 (m, 7H, $H_{12\beta}$, $H_{15\alpha}$, $H_{16\beta}$, H_{17} , $H_{22\alpha}$, $H_{23\alpha}$)
1.18-1.05 (m, 3H, $H_{23\beta}$, H_{24})	0.99 (m, 1H, $H_{22\beta}$)
0.91 (d, $^3J_{21/20} = 6.3 \text{ Hz}$, 3H, H_{21})	0.86 (d, $^3J_{25/27} = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, H_{27})
0.85 (d, $^3J_{25/26} = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, H_{26})	0.55 (s, 3H, H_{18})

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

150.5 (s, C_8)	138.7 (s, C_5)	125.1 (d, C_4)
112.3 (d, C_7)	82.3 (t, C_{19})	79.7 (d, C_6)
65.5 (s, C_{10})	63.5 (d, C_3)	56.7 (d, C_{17})
56.0 (d, C_{14})	45.9 (s, C_{13})	40.3 (t, C_{12})
39.5 (t, C_{24})	36.1 (t, C_{22})	36.1 (d, C_{20})

29.9 (t, C ₉)	28.0 (d, C ₂₅)	27.5 (t, C ₁₆)
26.7 (t, C ₁)	26.5 (t, C ₂)	23.9 (t, C ₂₃)
23.7 (t, C ₁₅)	22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.2 (t, C ₁₁)	18.8 (q, C ₂₁)	11.9 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

147 (100), 135 (83), 109 (82), 107 (69), 133 (69), 119 (65), 149 (58), 165 (48), 247 (30), 278 (17), 396 (10), 432 ([M]⁺, 1)

MS (Cl⁺, Ammoniak):

367 (100), 396 (85), 379 (55), 281 (30), 414 (21), 433 ([M+H]⁺, 19)
450 ([M+NH₄]⁺, 3)

IR (KBr, cm⁻¹):

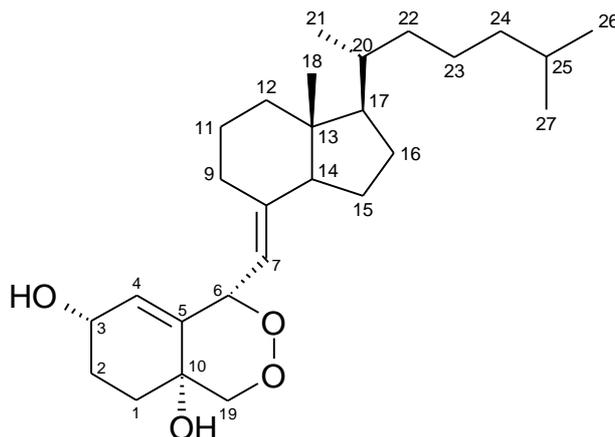
ν = 3481 (s, OH), 3449 (s, OH), 2921 (s; CH), 2860 (s, CH₂), 1654 (w, C=C),
1470 (m, CH₂, CH₃), 1010 (s, CO)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₄]⁺: 432.3240

gefunden: 432.3217

(4Z,7E)-(6S)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3b,10b-diol (47)



$C_{27}H_{44}O_4$ (MG = 432.64), farbloses Öl

$[\alpha]_D^{25} = -6^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

5.65 (m, 1H, H ₄)	5.58 (d, $^3J_{6/7} = 7.9 \text{ Hz}$, 1H, H ₇)
5.21 (d, $^3J_{6/7} = 7.9 \text{ Hz}$, 1H, H ₆)	4.27 (m, 1H, H ₃)
4.12 (d, $^2J = 12.5 \text{ Hz}$, 1H, H _{19\alpha})	4.02 (d, $^2J = 12.5 \text{ Hz}$, 1H, H _{19\beta})
2.59 (m, 1H, H _{9\alpha})	2.08-1.90 (m, 3H, H _{2\alpha} , H _{12\alpha} , H ₁₄)
1.90 -1.80 (m, 2H, H _{1\alpha} , H _{2\beta})	1.79 - 1.41 (m, 9H, H _{1\beta} , H _{2\beta} , H _{9\beta} , H _{15\alpha} , H _{16\alpha} , H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)
1.39 -1.20 (m, 6H, H _{12\beta} , H _{15\alpha} , H _{16\beta} , H ₁₇ ; H _{22\alpha} , H _{23\alpha})	1.17-1.03 (m, 3H, H _{23\beta} , H ₂₄)
0.98 (m, 1H, H _{22\beta})	0.90 (d, $^3J_{21/20} = 6.3 \text{ Hz}$, 3H, H ₂₁)
0.85 (d, $^3J_{25/27} = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, H ₂₇)	0.84 (d, $^3J_{25/26} = 6.4 \text{ Hz}$, 3H, H ₂₆)
0.58 (s, 3H, H ₁₈)	

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

145.4 (s, C ₈)	136.5 (s, C ₅)	129.1 (d, C ₄)
117.9 (d, C ₇)	82.5 (t, C ₁₉)	80.0 (d, C ₆)
67.6 (d, C ₃)	65.9 (s, C ₁₀)	56.6 (d, C ₁₇)
55.8 (d, C ₁₄)	45.6 (s, C ₁₃)	40.2 (t, C ₁₂)
39.5 (t, C ₂₄)	36.1 (t, C ₂₂)	36.1 (d, C ₂₀)
30.4 (t, C ₁)	29.6 (t, C ₉)	28.0 (d, C ₂₅)

27.5 (t, C ₂)	27.3 (t, C ₁₆)	23.9 (t, C ₂₃)
23.3 (t, C ₁₅)	22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.3 (t, C ₁₁)	18.8 (q, C ₂₁)	11.9 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

135 (100), 133 (95), 147 (93), 109 (87), 107 (75), 149 (63), 119 (54), 247 (48), 165 (42), 278 (12), 396 (9), 432 ([M]⁺, 1)

MS (Cl⁺, Ammoniak):

399 (100), 381 (92), 380 (83), 281 (85), 414 (29), 433 ([M+H]⁺, 12)
450 ([M+NH₄]⁺, 5)

IR (KBr, cm⁻¹):

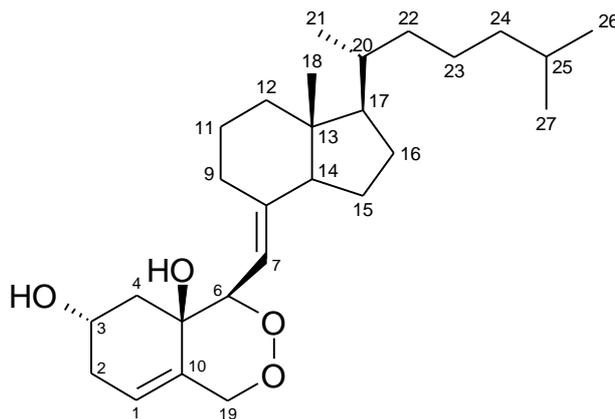
$\nu =$ 3445 (s, OH), 2929 (s; CH), 2850 (s, CH₂), 1654 (w, C=C), 1467 (m, CH₂, CH₃), 1383 (m, CH₃), 1077 (m, CO), 1036 (m), 1015 (m)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₄]⁺: 432.3240

gefunden: 432.3292

(1Z,7E)-(6R)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-1(10),7-dien-3b,5a-diol (48)



$C_{27}H_{44}O_4$ (MG = 432.64), farbloses Öl

$[\alpha]_D^{25} = +117^\circ$ ($c = 1.0$ mg/ml, MeOH)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

5.59 (m, 1H, H_1)	5.01 (m, 2H, H_7 und $H_{19\alpha}$)
4.80 (d, $^3J_{6/7} = 8.7$ Hz, 1H, H_6)	4.27 (d, $^2J = 14.0$ Hz, 1H, $H_{19\beta}$)
4.16 (m, 1H, H_3)	2.64 (m, 1H, $H_{9\alpha}$)
2.51 (m, 1H, $H_{2\alpha}$)	2.03 (m, 1H, $H_{2\beta}$)
2.02-1.96 (m, 3H, $H_{4\alpha}$, $H_{12\alpha}$, H_{14})	1.90-1.75 (m, 3H, $H_{9\beta}$, $H_{15\alpha}$, $H_{16\alpha}$)
1.55-1.42 (m, 4H, H_{11} , H_{20} , H_{25})	1.41 -1.21 (m, 7H, $H_{4\beta}$, $H_{12\beta}$, $H_{15\beta}$)
$H_{16\beta}$, H_{17} ; $H_{22\alpha}$, $H_{23\alpha}$)	
1.17-1.05 (m, 3H, $H_{23\beta}$, H_{24})	0.99 (m, 1H, $H_{22\beta}$)
0.90 (d, $^3J_{21/20} = 6.4$ Hz, 3H, H_{23})	0.85 (d, $^3J_{25/27} = 6.7$ Hz, 3H, H_{27})
0.84 (d, $^3J_{25/26} = 6.7$ Hz, 3H, H_{26})	0.54 (s, 3H, H_{18})

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

152.3 (s, C_8)	133.1 (s, C_{10})	123.1 (d, C_1)
110.0 (d, C_7)	85.4 (d, C_6)	73.9 (t, C_{19})
70.0 (s, C_5)	64.2 (d, C_3)	56.5 (d, C_{17})
56.3 (d, C_{14})	45.8 (s, C_{13})	40.5 (t, C_4)
40.1 (t, C_{12})	39.5 (t, C_{24})	36.1 (t, C_{22})
36.1 (d, C_{20})	34.6 (t, C_2)	30.2 (t, C_9)
28.0 (d, C_{25})	27.6 (t, C_{16})	23.8 (t, C_{23})

23.7 (t, C ₁₅)	22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.1 (t, C ₁₁)	18.8 (q, C ₂₁)	12.2 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

133 (100), 177 (88), 123 (82), 105 (81), 290 (79), 273 (50), 247 (48), 378 (22), 363 (20), 396 (12), 414 (8), 432 ([M]⁺, 1)

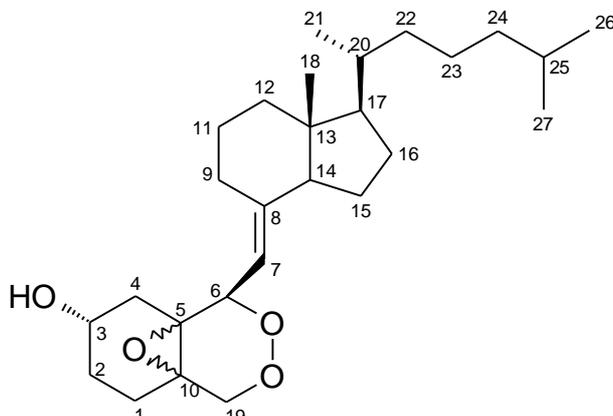
IR (KBr, cm⁻¹):

$\nu =$ 3429 (s, OH), 2952 (s; CH), 2850 (s, CH₂), 1654 (w, C=C), 1467 (m, CH₂, CH₃), 1074 (m, CO), 988 (m)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₄]⁺: 432.3240

gefunden: 432.3213

(7E)-(6R)-6,19-Epidioxy-5,10-epoxy-9,10-secocholesta-7-en-3b-ol (49)

C₂₇H₄₄O₄ (MG = 432.65, farbloses Öl)

[α]_D²⁵ = + 104° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.16 (d, ³J_{6/7} = 10.0 Hz, 1H, H₆)

4.87 (d, ³J_{6/7} = 10.0 Hz, 1H, H₇)

4.26 (d, ²J = 13.4 Hz, 1H, H_{19 α})

4.19 (d, ²J = 13.4 Hz, 1H, H_{19 β})

3.88 (m, 1H, H ₃)	2.97 (m, 1H, H _{4α})
2.64 (m, 1H, H _{9α})	2.17 (m, 1H, H _{1α})
2.10 (m, 1H, H _{4β})	2.05-1.95 (m, 2H, H _{12α} , H ₁₄)
1.92-1.55 (m, 6H, H _{1β} , H ₂ H _{9β} , H _{15α} , H _{16α})	
1.54-1.40 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅) H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})	1.40-1.21 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} ,
1.18-1.04 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)	1.00 (m, 1H, H _{22β})
0.91 (d, ³ J _{21/20} = 6.2 Hz, 3H, H ₂₁)	0.85 (d, ³ J _{25/27} = 6.7 Hz, 3H, H ₂₇)
0.84 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)	0.54 (s, 3H, H ₁₈)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

150.2 (s, C ₈)	112.6 (s, C ₇)	78.6 (d, C ₆)
72.8 (t, C ₁₉)	65.6 (d, C ₃)	63.8 (s, C ₅)
59.5 (s, C ₁₀)	56.6 (d, C ₁₇)	56.1 (d, C ₁₄)
46.0 (s, C ₁₃)	40.1 (t, C ₁₂)	39.5 (t, C ₂₄)
36.1 (t, C ₂₂)	36.0 (t, C ₂₀)	33.0 (t, C ₂)
29.6 (t, C ₉)	28.0 (d, C ₂₅)	27.5 (t, C ₁₆)
27.0 (t, C ₄)	23.9 (t, C ₁₅)	23.6 (t, C ₂₃)
22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)	22.2 (t, C ₁₁)
21.4 (t, C ₁)	18.9 (q, C ₂₁)	12.2 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

134 (100), 147 (64), 107 (56), 149 (54), 177 (53), 159(52), 247 (50), 288 (43), 401 (41), 301 (38), 414 (28), 415 (8) 432 ([M]⁺, 5)

MS (CI⁺, Ammoniak):

291 (100), 308 (87), 290 (70), 397 (68), 399 (65), 160 (63), 396 (60), 400 (47), 433 ([M+H]⁺, 21) 450 ([M+NH₄]⁺, 15)

IR (KBr, cm⁻¹):

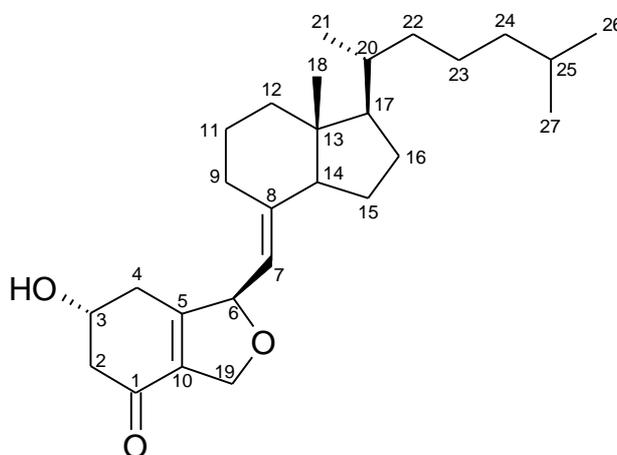
$\nu =$ 3424 (s, OH), 2951 (s; CH), 2869 (s, CH₂), 1666 (w, C=C), 1467 (m, CH₂, CH₃), 1379 (w, CH₃), 1045 (m, CO)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₄]⁺: 432.3240

gefunden: 432.3236

(5E,7E)-(6R)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-1-on (50)



C₂₇H₄₂O₃ (MG = 414.63), farbloses Öl

[α]_D²⁵ = + 64° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.40 (d, ³ J _{6/7} = 9.2 Hz, 1H, H ₆)	4.86 (d, ³ J _{6/7} = 9.2 Hz, 1H, H ₇)
4.76 (brs, 2H, H ₁₉)	4.40 (m, 1H, H ₃)
2.75 (dd, ² J = 16.6 Hz, ³ J _{2α/3} = 3.7 Hz, 1H, H _{2α})	2.67 (m, 1H, H _{9α})
2.65 (dd, ² J = 16.6 Hz, ³ J _{2β/3} = 6.5 Hz, 1H, H _{2β})	2.30 (m, 1H, H _{4α})
2.10 (m, 1H, H _{1α})	2.06-1.96 (m, 3H, H _{4β} , H _{12α} , H ₁₄)
1.92-1.62 (m, 6H, H _{1β} , H ₂ , H _{9β} , H _{15α} , H _{16α})	

1.60-1.40 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅) H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})	1.39-1.20 (m, 6H, H _{12β} , , H _{15β} , H _{16β} ,
1.17-1.05 (m, 3H, H _{23β} H ₂₄)	1.00 (m, 1H, H _{22β})
0.91 (d, ³ J _{20/21} = 6.1 Hz, 3H, H ₂₁)	0.85 (d, ³ J _{25/27} = 6.5 Hz, 3H, H ₂₇)
0.84 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)	0.55 (s, 3H, H ₁₈)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

194.5 (s, C ₁)	151.3 (s, C ₅)	151.2 (s, C ₈)
129.6 (s, C ₁₀)	112.5 (d, C ₇)	76.2 (d, C ₆)
68.0 (t, C ₁₉)	66.2 (d, C ₃)	56.3 (d, C ₁₇)
55.9 (d, C ₁₄)	46.2 (t, C ₂)	46.0 (s, C ₁₃)
40.1 (t, C ₁₂)	39.6 (t, C ₂₄)	36.1 (t, C ₂₂)
36.1 (d, C ₂₀)	34.3 (t, C ₄)	29.7 (t, C ₉)
28.1 (d, C ₂₅)	27.6 (t, C ₁₆)	23.9 (t, C ₂₃)
23.8 (t, C ₁₅)	22.9 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.1 (t, C ₁₁)	18.9 (q, C ₂₁)	12.2 (q, C ₁₈)

MS (Cl⁺, Ammoniak):

261 (100), 281 (91), 275 (49), 135 (48), 247 (42), 415 ([M+H]⁺, 8)

IR (KBr, cm⁻¹):

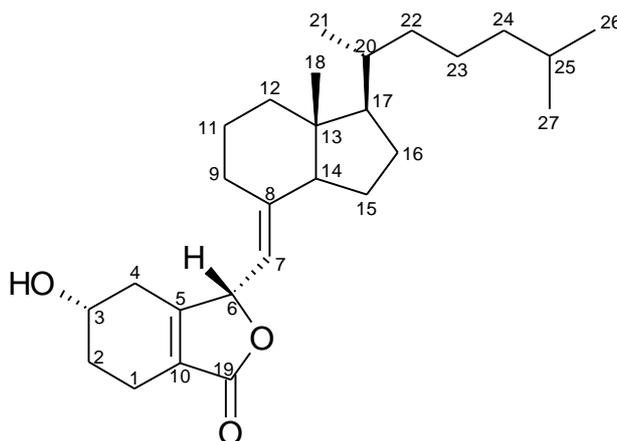
ν = 3428 (s; OH), 2953 (s; CH), 2852 (m; CH₂), 1674 (s; C=O), 1468 (m; CH₂), 1384 (m; CH₃), 1280 (w), 1049 (w; C-O)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₂O₃]⁺: 414.3134

gefunden: 414.3120

(5Z,7E)-(6S)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-19-on (51)



$C_{27}H_{42}O_3$ (MG = 414.63), farbloses Öl

$[\alpha]_D^{25} = +44^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

5.60 (d, $^3J_{6/7} = 8.9 \text{ Hz}$, 1H, H_6)	4.68 (d, $^3J_{6/7} = 8.9 \text{ Hz}$, 1H, H_7)
4.20 (m, 1H, H_3)	2.65 (m, 1H, $H_{9\alpha}$)
2.47 (m, 1H, $H_{4\alpha}$)	2.34 (m, 2H, H_1)
2.16 (m, 1H, $H_{4\beta}$)	2.04-1.94 (m, 2H, $H_{12\alpha}$, H_{14})
1.92-1.54 (m, 5H, H_2 , $H_{9\beta}$, $H_{15\alpha}$, $H_{16\alpha}$)	1.53-1.38 (m, 4H, H_{11} , H_{20} , H_{25})
1.37-1.20 (m, 6H, $H_{12\beta}$, $H_{15\beta}$, $H_{16\beta}$, H_{17} ; $H_{22\alpha}$, $H_{23\alpha}$)	1.18-1.04 (m, 3H, $H_{23\beta}$, H_{24})
0.97 (m, 1H, $H_{22\beta}$)	0.92 (d, $^3J_{21/20} = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, H_{21})
0.87 (d, $^3J_{25/27} = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, H_{27})	0.86 (d, $^3J_{25/26} = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, H_{26})
0.59 (s, 3H, H_{18})	

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

173.1 (s, C_{19})	161.5 (s, C_5)	148.6 (s, C_8)
125.5 (s, C_{10})	114.4 (d, C_7)	79.3 (d, C_6)
66.0 (d, C_3)	56.6 (d, C_{17})	55.8 (d, C_{14})
45.7 (s, C_{13})	40.2 (t, C_{12})	39.5 (t, C_{24})
36.0 (t, C_{22})	36.0 (d, C_{20})	32.0 (t, C_4)
30.0 (t, C_2)	29.6 (t, C_9)	28.0 (d, C_{25})
27.5 (t, C_{16})	23.9 (t, C_{23})	23.4 (t, C_{15})

22.8 (q, C ₂₇)	22.5 (q, C ₂₆)	22.2 (t, C ₁₁)
18.8 (q, C ₂₁)	17.6 (t, C ₁)	11.8 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

107 (100), 301 (93), 147 (78), 259 (76), 167 (75), 237 (52), 414 (45), 283 (44), 329 (37), 128 (32), 107 (32), 415 (21, [M]⁺), 399 (14)

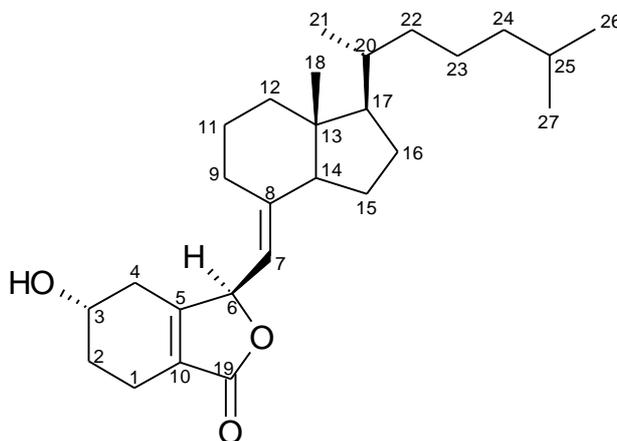
IR (KBr, cm⁻¹):

ν = 3420 (s; OH), 2926 (s; CH), 2851 (m; CH₂), 1736 (s; C=O), 1636 (m; C=C), 1465 (w; CH₂), 1383 (s; CH₃), 1078 (w; C-O)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₂O₃]⁺: 414.3134

gefunden: 414.3124

(5Z,7E)-(6R)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-19-on (52)

C₂₇H₄₂O₃ (MG = 414.63), farbloses Öl

[α]_D²⁵ = + 29° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.59 (d, ³J_{6/7} = 8.7 Hz, 1H, H₆)

4.61 (d, ³J_{6/7} = 8.7 Hz, 1H, H₇)

4.19 (m, 1H, H ₃)	2.61 (m, 1H, H _{9α})
2.50 (m, 1H, H _{4α})	2.33 (m, 2H, H ₁)
2.21 (m, 1H, H _{4β})	2.04-1.94 (m, 2H, H _{12α} , H ₁₄)
1.91-1.56 (m, 5H, H ₂ , H _{9β} , H _{15α} , H _{16α})	1.53-1.38 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)
1.37-1.19 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} , H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})	1.17-1.03 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)
0.99 (m, 1H, H _{22β})	0.90 (d, ³ J _{21/20} = 6.0 Hz, 3H, H ₂₁)
0.85 (d, ³ J _{25/27} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₇)	0.84 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)
0.52 (s, 3H, H ₁₈)	

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

173.1 (s, C ₁₉)	161.1 (s, C ₅)	148.4 (s, C ₈)
125.7 (s, C ₁₀)	114.4 (d, C ₇)	79.5 (d, C ₆)
65.7 (d, C ₃)	56.5 (d, C ₁₇)	55.8 (d, C ₁₄)
45.5 (s, C ₁₃)	40.0 (t, C ₁₂)	39.5 (t, C ₂₄)
36.0 (t, C ₂₂)	36.0 (d, C ₂₀)	31.7 (t, C ₄)
29.8 (t, C ₂)	29.5 (t, C ₉)	28.0 (d, C ₂₅)
27.5 (t, C ₁₆)	23.8 (t, C ₂₃)	23.8 (t, C ₁₅)
22.8 (q, C ₂₇)	22.5 (q, C ₂₆)	22.0 (t, C ₁₁)
18.8 (q, C ₂₁)	17.4 (t, C ₁)	12.1 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

135 (100), 167 (55), 107 (54), 128 (52), 147 (50), 301 (50), 259 (46), 237 (28), 273 (25), 414 (17), 329 (13), 415 (6, [M]⁺), 399 (5)

MS (CI⁺, Ammoniak):

171 (100), 413 (80), 416 (73, [M+H]⁺), 433 (50, [M+NH₄]⁺), 430 (46), 402(45), 290 (45)

IR (KBr, cm⁻¹):

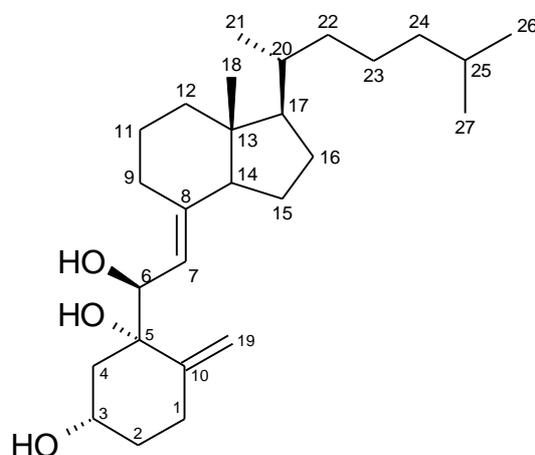
$\nu =$ 3424 (s; OH), 2928 (s; CH), 2850 (m; CH₂), 1735 (s; C=O), 1636 (m; C=C), 1467 (w; CH₂), 1384 (s; CH₃), 1078 (w; C-O)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₂O₄]⁺: 414.3134

gefunden: 414.3119

(7E)-(6S)-9,10-secocholesta-7,10(19)-dien-3b,5b,6-triol (53)



C₂₇H₄₆O₃ (MG = 418.67), farbloses Öl

[**a**]_D²⁵ = + 33° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), **δ**(ppm):

5.06 (brs, 1H, H _{19α})	4.97 (d, ³ J _{6/7} = 8.8 Hz, 1H, H ₇)
4.73 (brs, 1H, H _{19β})	4.68 (d, ³ J _{6/7} = 8.8 Hz, 1H, H ₆)
4.45 (m, 1H, H ₃)	2.58 (m, 1H, H _{1α})
2.53 (m, 1H, H _{9α})	2.41 (m, 1H, H _{1β})
2.14 (ddd, ² J = 10.8 Hz; ³ J _{3/4α} = 6.3Hz; ⁴ J _{4α/6} = 2.0 Hz, 1H, H _{4α})	2.05-1.94 (m, 2H, H _{12α} , H ₁₄)
1.93-1.82 (m, 2H, H _{2α} , H _{16α})	1.64 (psd, ² J = 10.8 Hz; ³ J _{3/4β} ≈ 0 Hz, 1H, H _{4β})

1.62 - 1.39 (m, 7H, H_{2β}, H_{9β}, H_{15α}, H₁₁,

H₂₀, H₂₅)

1.38 - 1.19 (m, 6H, H_{12β}, H_{15β}, H_{16β},

H₁₇; H_{22α}, H_{23α})

1.18-1.03 (m, 3H, H_{23β}, H₂₄)

0.97 (m, 1H, H_{22β})

0.89 (d, ³J_{20/21} = 6.4 Hz, 3H, H₂₁)

0.84 (d, ³J_{25/27} = 6.5 Hz, 3H, H₂₇)

0.84 (d, ³J_{25/26} = 6.5 Hz, 3H, H₂₆)

0.57 (s, 3H, H₁₈)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

150.8 (s, C₁₀)

147.6 (s, C₈)

118.5 (d, C₇)

103.7 (t, C₁₉)

79.8 (d, C₆)

79.5 (s, C₅)

75.6 (d, C₃)

55.6 (d, C₁₄)

56.7 (d, C₁₇)

45.7 (s, C₁₃)

43.9 (t, C₄)

40.3 (t, C₁₂)

39.5 (t, C₂₄)

36.1 (t, C₂₂)

36.1 (d, C₂₀)

33.0 (t, C₂)

29.8 (t, C₉)

28.2 (t, C₁)

28.0 (d, C₂₅)

27.5 (t, C₁₆)

23.9 (t, C₂₃)

23.3 (t, C₁₅)

22.8 (q, C₂₇)

22.6 (q, C₂₆)

22.3 (t, C₁₁)

18.8 (q, C₂₁)

11.9 (q, C₁₈)

MS (EI, 70eV):

109 (100), 291 (90), 274 (75), 135 (55), 161 (44), 105 (40), 247 (36),

189 (33), 400 (27), 364 (14), 401 (12); kein [M]⁺-Peak

MS (CI⁺, Ammoniak):

400 (100), 401 (56), 399 (45) 291 (14), 127 (13), 419 (5, [M+H]⁺)

IR (KBr, cm⁻¹):

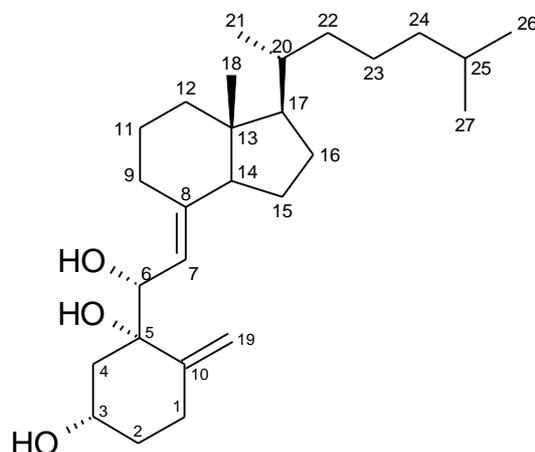
ν = 3385 (m; OH), 2940 (s; CH), 1423 (m; CH₂), 1374 (m; CH₃), 1017 (s;
C-O), 890 (s, =C-H)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₆O₃]⁺: 418.3447

gefunden: 418.3431

(7E)- (6R)-9,10-secocholesta-7,10(19)-dien-3b,5b,6-triol (54)



C₂₇H₄₆O₃ (MG = 418.67), farbloses Öl

[a]_D²⁵ = + 127° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

4.99 (d, ³ J _{6/7} = 8.9 Hz, 1H, H ₇)	4.89 (dd, ² J = 1.8 Hz, 2H, H ₁₉)
4.67 (d, ³ J _{6/7} = 8.9 Hz, 1H, H ₆)	4.49 (m, 1H, H ₃)
2.69 (m, 1H, H _{9α})	2.64 (m, 1H, H _{1α})
2.47 (ddd, ² J = 10.7 Hz; ³ J _{3/4α} = 6.4 Hz; ⁴ J _{4α/6} = 1.9 Hz, 1H, H _{4α})	2.42 (m, 1H, H _{1β})
1.99-1.80 (m, 4H, H _{2α} , H _{12α} , H ₁₄ , H _{16α})	1.75 (psd, ² J = 10.7 Hz; ³ J _{3/4β} ≈ 0 Hz, 1H, H _{4β})
1.74 - 1.63 (m, 7H, H _{2β} , H _{9β} , H _{15α} , H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)	1.44 - 1.26 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} , H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})
1.17-1.05 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)	1.00 (m, 1H, H _{22β})
0.89 (d, ³ J _{20/21} = 6.2 Hz, 3H, H ₂₁)	0.85 (d, ³ J _{25/27} = 6.8 Hz, 3H, H ₂₇)
0.85 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)	0.47 (s, 3H, H ₁₈)

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

149.5 (s, C_{10})	148.5 (s, C_8)	114.5 (d, C_7)
106.0 (t, C_{19})	81.4 (d, C_6)	80.3 (s, C_5)
75.9 (d, C_3)	55.7 (d, C_{14})	56.3 (d, C_{17})
45.4 (s, C_{13})	45.0 (t, C_4)	40.5 (t, C_{12})
39.6 (t, C_{24})	36.2 (t, C_{22})	36.1 (d, C_{20})
32.7 (t, C_2)	29.7 (t, C_9)	28.4 (t, C_1)
28.1 (d, C_{25})	27.7 (t, C_{16})	24.1 (t, C_{23})
23.9 (t, C_{15})	22.9 (q, C_{27})	22.6 (q, C_{26})
22.0 (t, C_{11})	18.9 (q, C_{21})	12.0 (q, C_{18})

MS (EI, 70eV):

291 (100), 274 (93), 105 (82), 251 (65), 364 (65), 141 (64), 247 (62)
189 (56), 400 (43), 401 (11); kein $[\text{M}]^+$ -Peak

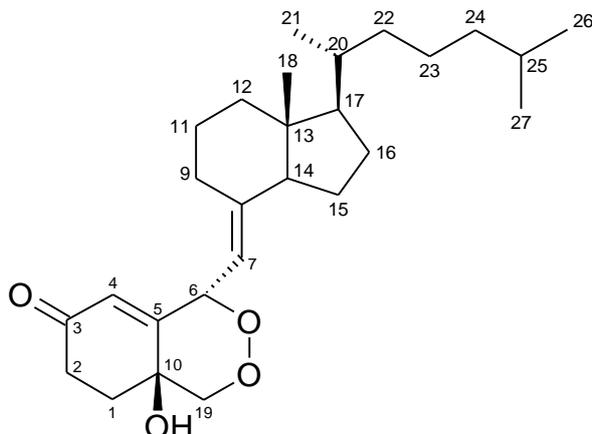
IR (KBr, cm^{-1}):

$\nu =$ 3380 (m; OH), 2950 (s; CH), 1420 (m; CH_2), 1370 (m; CH_3), 1010 (s;
C-O), 890 (s, =C-H)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für $[\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_3]^+$: 418.3447

gefunden: 418.3429

(4Z,7E)-(6S)- 6,19-Epidioxy-10a-hydroxy-9,10-secocholesta-4,7-dien-3-on**(55)****C₂₇H₄₂O₄** (MG = 430.63), farbloses Öl**[α]_D²⁵** = + 42° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)**¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ(ppm):**

5.91 (s, 1H, H ₄)	5.58 (d, ³ J _{6/7} = 8.4 Hz, 1H, H ₆)
4.83 (d, ³ J _{6/7} = 8.4 Hz, 1H, H ₇)	4.38 (d, ² J = 13.2 Hz, 1H, H _{19α})
4.12 (d, ² J = 13.2 Hz, 1H, H _{19β})	2.80 (m, 1H, H _{2α})
2.60 (m, 1H, H _{9α})	2.49 (m, 1H, H _{2β})
2.07-1.94 (m, 3H, H _{1α} , H _{12α} , H ₁₄)	1.92-1.60 (m, 4H, H _{1β} , H _{9β} ,
H _{15α} , H _{16α})	
1.57-1.40 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)	1.41 -1.20 (m, 6H, H _{12β} , H _{15α} , H _{16β} ,
H ₁₇ ; H _{22α} , H _{23α})	
1.18-1.05 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)	0.99 (m, 1H, H _{22β})
0.90 (d, ³ J _{21/20} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₁)	0.85 (d, ³ J _{25/27} = 6.7 Hz, 3H, H ₂₇)
0.85 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)	0.57 (s, 3H, H ₁₈)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

198.6 (s, C ₃)	155.4 (s, C ₅)	153.4 (s, C ₈)
124.9 (d, C ₄)	111.4 (d, C ₇)	81.8 (t, C ₁₉)
76.4 (s, C ₁₀)	65.2 (d, C ₆)	56.5 (d, C ₁₇)
55.9 (d, C ₁₄)	45.8 (s, C ₁₃)	40 (t, C ₁₂)

39.5 (t, C ₂₄)	36.1 (t, C ₂₂)	36.0 (d, C ₂₀)
32.7 (t, C ₂)	30.4 (t, C ₁)	29.8 (t, C ₉)
28.0 (d, C ₂₅)	27.5 (t, C ₁₆)	23.8 (t, C ₁₅)
23.6 (t, C ₂₃)	22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.0 (t, C ₁₁)	18.8 (q, C ₂₁)	12.3 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

135 (100), 121 (93), 149 (61), 123 (53), 105 (44), 109 (36), 154 (33), 117 (31), 159 (28), 173 (20), 130 (20), 177 (17), 165 (15), 188 (14), 262 (11), 412 (7), 430 ([M]⁺, 2)

MS (CI⁺, Ammoniak):

413 (100), 397 (99), 395 (73), 172 (34), 291 (33), 431 ([M+H]⁺, 19), 448 ([M+NH₄]⁺, 4)

IR (KBr, cm⁻¹):

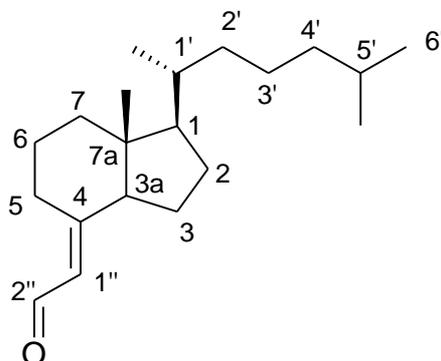
$\nu =$ 3419 (s, OH), 2952 (s; CH), 2869 (s, CH₂), 1685 (s, C=O), 1467 (m, CH₂, CH₃), 1383 (m, CH₃), 1100 (w, CO)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₂O₄]⁺: 430.3083

gefunden: 430.3101

((4E)-1a((R)-1',5' dimethylhexyl)-7a-methyl-(3ab, 7aa)-hexahydroindan-4-yliden)-acetaldehyd (56)



C₂₀H₃₄O (MG = 290.49), farbloses Öl

[α]_D²⁵ = + 67° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

10.05 (d, ³ J _{1''/2''} = 8.3 Hz, 1H, H _{2''})	5.72 (d, ³ J _{1''/2''} = 3 Hz, 1H, H _{1''})
3.36 (m, 1H, H _{5α})	2.19-2.04 (m, 2H, H _{7α} , H _{3a})
1.98-1.79 (m, 3H, H _{5β} , H _{3α} , H _{2α})	1.58-1.45 (m, 4H, H ₆ , H _{1'} , H _{5'})
1.43 -1.22 (m, 6H, H _{7β} , H _{3β} , H _{2β} , H ₁ ; H _{2'α} , H _{3'α})	1.18-1.06 (m, 3H, H _{3'β} , H _{4'})
1.02 (m, 1H, H _{2'β})	0.92 (d, ³ J _{1'/8'} = 5.9 Hz, 3H, CH ₃ an C _{1'})
0.86 (d, ³ J _{5'/7'} = 6.6 Hz, 3H, CH ₃)	0.86 (d, ³ J _{5'/6'} = 6.6 Hz, 3H, CH ₃)
0.59 (s, 3H, CH ₃ an C _{7a})	

¹³C-NMR (22.5 MHz, CDCl₃), δ(ppm):

190.3 (d, C _{2''})	167.9 (s, C ₄)	124.1 (d, C _{1''})
57.1 (d, C _{3a})	56.9 (d, C ₁)	47.6 (s, C _{7a})
40.0 (t, C ₇)	39.4 (t, C _{4'})	35.9 (t, C ₂)
35.8 (d, C _{1'})	29.3 (t, C ₅)	28.0 (d, C _{5'})
27.4 (t, C ₂)	24.2 (t, C ₃)	23.8 (t, C _{3'})
22.7 (q, CH ₃)	22.5 (q, CH ₃)	22.2 (t, C ₆)
18.8 (q, CH ₃ an C _{1'})	12.1 (q, CH ₃ an C _{7a})	

MS (EI⁺, 70eV):

159 (100), 290 (94, [M]⁺), 111 (77), 246 (87), 205 (79), 176 (67), 188 (66), 191 (45), 259 (39), 231 (33), 264 (32)

MS (CI⁺, Ammoniak):

308 (100, [M+NH₄]⁺), 291 (63, [M+H]⁺), 309 (33), 273 (15)

IR (KBr, cm⁻¹):

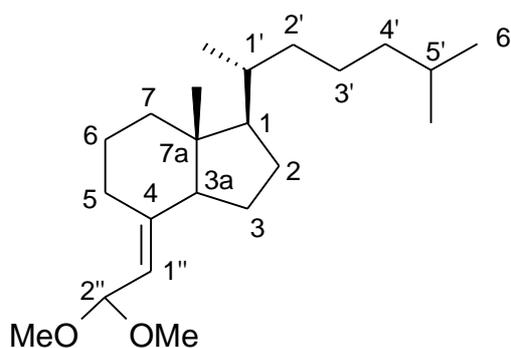
$\nu =$ 2953 (s, C-H), 2870 (m, -CH₃), 1672, (s, C=O), 1467 (m, CH₂), 1382 (w, CH₃), 1133 (m, C-O)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₀H₃₄O₁]⁺: 290.2610

gefunden: 290.2580

(4E)-1a((R)-1',5' Dimethylhexyl)-4-(2'',2''-dimethoxyethyliden)-7a-methyl-(3ab, 7aa)-hexahydroindan (57)



C₂₂H₄₀O₂ (MG = 336.56), farbloses Öl

[a]_D²⁵ = + 62° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.10 (d, ³J_{1''/2''} = 6.5 Hz, 1H, H_{1''})

5.01 (d, ³J_{1''/2''} = 6.5 Hz, 1H, H_{2''})

3.31 (s, 3H, OCH₃)

3.29 (s, 3H, OCH₃)

2.64 (m, 1H, H _{5α})	2.03-1.92 (m, 2H, H _{7α} , H _{3a})
1.87-1.66 (m, 2H, H _{5β} , H _{2α})	1.65 (m, 1H, H _{3α})
1.60-1.46 (m, 4H, H ₆ , H _{1'} , H _{5'})	1.45 -1.22 (m, 6H, H _{7β} , H _{3β} , H _{2β} ,
H ₁ ; H _{2'α} , H _{3'α})	
1.20-1.06 (m, 3H, H _{3'β} , H _{4'})	1.02 (m, 1H, H _{2'β})
0.90 (d, ³ J = 6.4 Hz, 3H, CH ₃ an C _{1'})	0.85 (d, ³ J = 6.7 Hz, CH ₃)
0.84 (d, ³ J = 6.6 Hz, CH ₃)	0.56 (s, 3H, CH ₃ an C _{7a})

¹³C-NMR (22.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

145.8 (s, C ₄)	117.6 (d, C _{1''})	100.0 (d, C _{2''})
56.6 (d, C ₁)	55.6 (d, C _{3a})	52.8 (q, OCH ₃)
52.8 (q, OCH ₃)	45.4 (s, C _{7a})	40.0 (t, C ₇)
39.4 (t, C _{4'})	36.0 (d, C _{1'})	36.0 (t, C _{2'})
29.4 (t, C ₅)	27.9 (t, C _{5'})	27.5 (d, C ₂)
23.8 (t, C ₃)	23.4 (t, C _{3'})	22.7 (q, CH ₃)
22.5 (q, CH ₃)	22.1 (t, C ₆)	18.8 (q, CH ₃ an C _{1'})
11.9 (q, CH ₃ an C _{7a})		

MS (EI, 70eV):

305 (100), 290 (80), 274 (79), 160 (76), 191 (68), 122 (65) 150 (52)
 177 (50), 106 (50), 163 (47), 293 (43), 117 (42), 133 (41), 146 (41)
 336 ([M]⁺, 40)

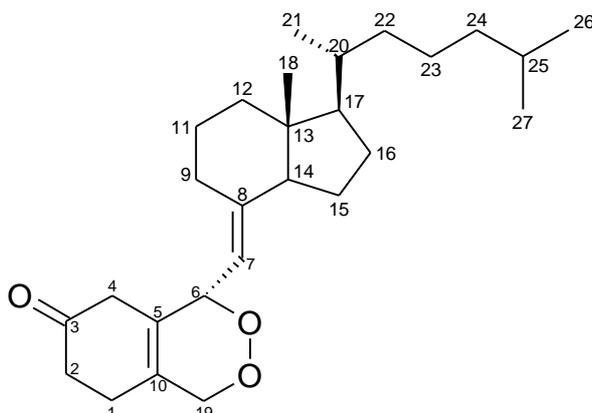
IR (KBr, cm⁻¹):

ν = 2951 (s, C-H), 2869 (m, -CH₃), 1653 (w, C=C), 1468 (m, CH₂), 1381
 (w, CH₃), 1131 (m, C-O), 1078 (m), 1054 (s), 966 (m), 910 (w)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₂H₄₀O₂]⁺: 336.3028

gefunden: 336.3071

(5Z,7E)-(6S)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3-on (58)

$C_{27}H_{43}O_3$ (MG = 414.63), farbloses Öl

$[a]_D^{25} = +16^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

5.26 (d, $^3J_{6/7} = 8.9 \text{ Hz}$, 1H, H_7)

4.64 (d, $^2J = 16.1 \text{ Hz}$, 1H, $H_{19\alpha}$)

2.83 (d, $^2J = 20.6 \text{ Hz}$, 1H, $H_{4\alpha}$)

2.59 (d, $^2J = 20.6 \text{ Hz}$, 1H, $H_{4\beta}$)

2.42-2.37 (m, 2H, $H_{1\beta}$, $H_{2\beta}$)

1.72-1.62 (m, 3H, $H_{9\beta}$, $H_{15\alpha}$, $H_{16\alpha}$)

1.38-1.21 (m, 6H, $H_{12\beta}$, $H_{15\beta}$, $H_{16\beta}$,
 H_{17} ; $H_{22\alpha}$, $H_{23\alpha}$)

0.98 (m, 1H, $H_{22\beta}$)

0.85 (d, $^3J_{25/27} = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, H_{27})

0.55 (s, 3H, H_{18})

4.80 (d, $^3J_{6/7} = 8.9 \text{ Hz}$, 1H, H_6)

4.32 (d, $^2J = 16.1 \text{ Hz}$, 1H, $H_{19\beta}$)

2.64 (m, 1H, $H_{9\beta}$)

2.56-2.52 (m, 2H, $H_{1\alpha}$, $H_{2\alpha}$)

2.01-1.92 (m, 2H, $H_{12\alpha}$, H_{14})

1.61-1.39 (m, 4H, H_{11} , H_{20} , H_{25})

1.16-1.04 (m, 3H, $H_{23\beta}$, H_{24})

0.89 (d, $^3J_{21/20} = 6.3 \text{ Hz}$, 3H, H_{21})

0.84 (d, $^3J_{25/26} = 6.4 \text{ Hz}$, 3H, H_{26})

 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

208.8 (s, C_3)

126.7 (d, C_{10})

71.9 (t, C_{19})

45.8 (s, C_{13})

149.8 (s, C_8)

114.3 (d, C_7)

56.7 (d, C_{17})

40.3 (t, C_{12})

127.3 (s, C_5)

76.3 (d, C_6)

55.9 (d, C_{14})

39.6 (t, C_{24})

38.9 (t, C ₄)	38.3 (t, C ₂)	36.1 (t, C ₂₂)
36.1 (d, C ₂₀)	29.8 (t, C ₉)	28.1 (d, C ₂₅)
27.6 (t, C ₁₆)	25.8 (t, C ₁)	23.9 (t, C ₁₅)
23.7 (t, C ₂₃)	22.9 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.3 (q, C ₁₁)	18.9 (q, C ₂₁)	11.8 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

397 (100), 283 (88), 201 (71), 206 (65), 188 (64), 241 (58), 259 (56),
157 (56), 312 (41), 128 (28) 382 (25), 105 (17), 415([M]⁺, 4)

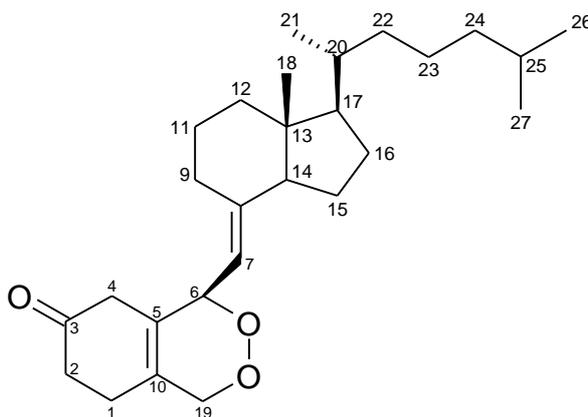
IR (KBr, cm⁻¹):

ν = 2926 (s; CH), 2868 (s; CH₂), 1715 (s; C=O), 1654 (m; C=C), 1457 (w; CH₂),
1384 (s; CH₃)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₂O₃]⁺: 414.3134

gefunden: 414.3126

(5Z,7E)-(6R)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-3-on (59)

C₂₇H₄₂O₃ (MG = 414.63), farbloses Öl

[**a**]_D²⁵ = + 68° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), **d**(ppm):

5.23 (d, $^3J_{6/7} = 9.3$ Hz, 1H, H ₆)	4.84 (d, $^3J_{6/7} = 9.3$ Hz, 1H, H ₇)
4.61 (d, $^2J = 15.8$ Hz, 1H, H _{19α})	4.35 (d, $^2J = 15.8$ Hz, 1H, H _{19β})
2.90 (d, $^2J = 19.1$ Hz, 1H, H _{4α})	2.62 (m, 2H, H _{4β} , H _{9α})
2.59-2.50 (m, 2H, H _{1α} , H _{2α})	2.44-2.38 (m, 2H, H _{1β} , H _{2β})
2.02-1.96 (m, 2H, H _{12α} , H ₁₄)	1.72-1.66 (m, 2H, H _{9β} , H _{16α})
1.68 (m, 1H, H _{15α})	1.56-1.40 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)
1.38 -1.18 (m, 6H, H _{12β} , H _{15α} , H _{16β} , H ₁₇ ; H _{22α} , H _{23α})	1.17-1.04 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)
0.98 (m, 1H, H _{22β})	0.90 (d, $^3J_{21/20} = 6.4$ Hz, 3H, H ₂₁)
0.85 (d, $^3J_{25/27} = 6.7$ Hz, 3H, H ₂₇)	0.84 (d, $^3J_{25/26} = 6.3$ Hz, 3H, H ₂₆)
0.52 (s, 3H, H ₁₈)	

 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

208.5 (s, C ₃)	150.2 (s, C ₈)	126.9 (s, C ₅)
126.9 (d, C ₁₀)	114.2 (d, C ₇)	76.2 (d, C ₆)
71.9 (t, C ₁₉)	56.6 (d, C ₁₇)	56.1 (d, C ₁₄)
45.7 (s, C ₁₃)	40.1 (t, C ₁₂)	39.5 (t, C ₂₄)
39.1 (t, C ₄)	38.1 (t, C ₂)	36.1 (t, C ₂₂)
36.0 (d, C ₂₀)	29.5 (t, C ₉)	28.0 (d, C ₂₅)
27.5 (t, C ₁₆)	25.8 (t, C ₁)	23.8 (t, C ₁₅)
23.6 (t, C ₂₃)	22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.1 (q, C ₁₁)	18.9 (q, C ₂₁)	12.2 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

397 (100), 283 (93), 105 (90), 312 (84), 201, (79), 128 (79) 241 (72),
157 (70), 206 (70), 259 (63), 382 (34), 415([M]⁺,7)

IR (KBr, cm^{-1}):

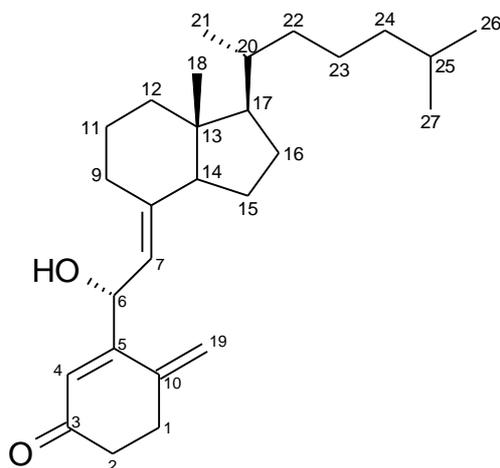
$\nu =$ 927 (s; CH), 2870 (s; CH₂), 1720 (s; C=O), 1654 (m; C=C), 1466 (w;
CH₂), 1384 (s; CH₃)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für $[C_{27}H_{42}O_3]^+$: 414.3134

gefunden: 414.3130

(4E,7E)-(6R)-6-Hydroxy-9,10-secocholesta-4,7,10(19)-trien-3-on (60)



$C_{27}H_{42}O_2$ (MG = 398.63), farbloses Öl

$[a]_D^{25} = -8^\circ$ ($c = 1.0$ mg/ml, MeOH)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

6.32 (s, 1H, C-H ₄)	5.42 (d, $^3J_{6/7} = 8.9$ Hz, 1H, H ₇)
5.33 (dd, $^2J < 2$ Hz, 2H, H ₁₉)	4.96 (d, $^3J_{6/7} = 8.9$ Hz, 1H, H ₆)
2.74 (m, 1H, H _{9\beta})	2.72-2.66 (m, 2H, H _{1\alpha} , H _{2\alpha})
2.54-2.48 (m, 2H, H _{1\beta} , H _{2\beta})	2.04-1.92 (m, 2H, H _{12\alpha} , H ₁₄)
1.76-1.60 (m, 3H, H _{9\beta} , H _{15\alpha} , H _{16\alpha})	1.56-1.39 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)
1.38-1.20 (m, 6H, H _{12\beta} , H _{15\beta} , H _{16\beta} , H ₁₇ , H _{22\alpha} , H _{23\alpha})	1.19-1.04 (m, 3H, H _{23\beta} , H ₂₄)
0.98 (m, 1H, H _{22\beta})	0.90 (d, $^3J_{21/20} = 6.0$ Hz, 3H, H ₂₁)
0.85 (d, $^3J_{25/27} = 6.7$ Hz, 3H, H ₂₇)	0.84 (d, $^3J_{25/26} = 6.6$ Hz, 3H, H ₂₆)
0.46 (s, 3H, H ₁₈)	

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

199.7 (s, C ₃)	159.5 (s, C ₅)	145.6 (s, C ₁₀)
----------------------------	----------------------------	-----------------------------

138.8 (s, C ₈)	124.3 (d, C ₇)	121.3 (d, C ₄)
115.0 (t, C ₁₉)	66.5 (d, C ₆)	56.6 (d, C ₁₇)
55.7 (d, C ₁₄)	46.1 (s, C ₁₃)	40.2 (t, C ₁₂)
39.5 (t, C ₂₄)	38.0 (t, C ₂)	36.1 (t, C ₂₂)
36.0 (d, C ₂₀)	32.8 (t, C ₁)	29.5 (t, C ₉)
28.0 (d, C ₂₅)	27.5 (t, C ₁₆)	23.8 (t, C ₁₅)
23.4 (t, C ₂₃)	22.8 (q, C ₂₇)	22.5 (q, C ₂₆)
22.1 (t, C ₁₁)	18.9 (q, C ₂₁)	11.8 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

134 (100), 172 (90), 150 (82), 247 (63), 122 (60), 267 (55), 241 (53),
69 (50), 380 (45), 146 (39), 226 (28), 157 (26), 295 (25), 239 (21), 398
([M]⁺, 9)

MS (CI⁺, Ammoniak):

381 (100), 398 (98), 416 ([M+NH₄]⁺, 25), 415 (22)

IR (KBr, cm⁻¹):

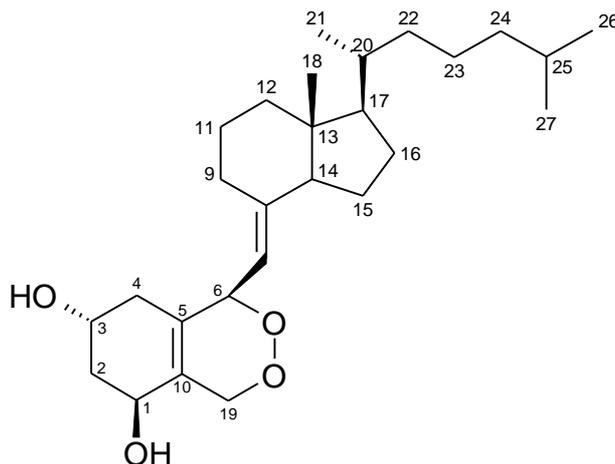
ν = 3409 (s, OH), 2951 (s; CH), 2869 (s, CH₂), 1668 (s, C=O), 1468 (m, CH₂,
CH₃), 1377 (m, CH₃), 1110 (w, CO)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₂O₂]⁺: 398.3185

gefunden: 398.3168

(5Z,7E)-(6R)-6,19-Epidioxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien-1a,3b-diol (85)



$C_{27}H_{44}O_4$ (MG = 432.64), farbloses Öl

$[a]_D^{25} = +67^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

5.13 (d, $^3J_{6/7} = 9.3 \text{ Hz}$, 1H, H ₆)	4.95 (d, $^3J_{6/7} = 9.3 \text{ Hz}$, 1H, H ₇)
4.77 (d, $^2J = 16.1 \text{ Hz}$, 1H, H _{19\alpha})	4.48 (d, $^2J = 16.1 \text{ Hz}$, 1H, H _{19\beta})
4.35 (m, 1H, H ₁)	4.20 (m, 1H, H ₃)
2.69 (m, 1H, H _{9\alpha})	2.14 (m, 1H, H _{4\alpha})
2.09 (m, 1H, H _{2\alpha})	2.02-1.95 (m, 2H, H _{12\alpha} , H ₁₄)
1.94-1.62 (m, 5H, H _{2\beta} , H _{4\beta} , H _{9\beta} , H _{15\alpha} , H _{16\alpha})	1.52-1.37 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅)
1.37-1.19 (m, 6H, H _{12\beta} , H _{15\beta} , H _{16\beta} , H ₁₇ , H _{22\alpha} , H _{23\alpha})	1.16-1.04 (m, 3H, H _{23\beta} , H ₂₄)
0.99 (m, 1H, H _{22\beta})	0.90 (d, $^3J_{21/20} = 6.2 \text{ Hz}$, 3H, H ₂₁)
0.84 (d, $^3J_{25/27} = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, H ₂₇)	0.84 (d, $^3J_{25/26} = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, H ₂₆)
0.53 (s, 3H, H ₁₈)	

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

148.4 (s, C ₈)	130.0 (s, C ₅)	128.1 (s, C ₁₀)
115.5 (s, C ₇)	76.4 (d, C ₆)	70.7 (t, C ₁₉)
65.8 (d, C ₁)	64.3 (d, C ₃)	56.5 (d, C ₁₇)
56.0 (d, C ₁₄)	45.6 (s, C ₁₃)	40.3 (t, C ₁₂)
40.1 (t, C ₂)	39.5 (t, C ₂₄)	36.1 (t, C ₂₂)

36.0 (t, C ₂₀)	33.9 (t, C ₄)	29.5 (t, C ₉)
28.0 (d, C ₂₅)	27.6 (t, C ₁₆)	23.8 (t, C ₁₅)
23.6 (t, C ₂₃)	22.8 (q, C ₂₇)	22.5 (q, C ₂₆)
22.1 (t, C ₁₁)	18.8 (q, C ₂₁)	12.0 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

265 (100), 363 (96), 133 (93), 378 (86), 211 (83), 119 (75), 171 (63),
364 (49), 250 (44), 379 (38), 414 (13), kein M⁺-Peak

MS (Cl⁺, Ammoniak):

415 (100), 379 (55), 378 (32), 154 (12), 433 ([M+H]⁺, 2)

IR (KBr, cm⁻¹):

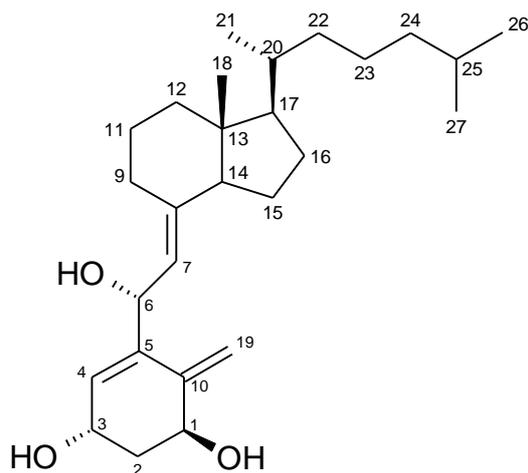
$\nu =$ 3426 (s, OH), 2951 (s; CH), 1655 (m, C=C), 1460 (w, CH₂/CH₃),
1376 (m, CH₃), 1040 (s)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₄]⁺: 432.3240

gefunden: 432.3232

(5E,7E)-(6R)-9,10-secocholesta-4,7,10(19)-trien-1a,3b,6-triol (88)



$C_{27}H_{44}O_3$ (MG = 416.65), farbloses Öl

$[\alpha]_D^{23} = +03^\circ$ ($c = 1.0$ mg/ml, MeOH)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

6.14 (d, $^3J_{3/4} = 3.4$ Hz 1H, H ₄)	5.25 (d, $^3J_{6/7} = 8.9$ Hz, 1H, H ₇)
5.22 (brs, 1H, H _{19α})	5.18 (brs, 1H, H _{19β})
5.01 (d, $^3J_{6/7} = 8.9$ Hz, 1H, H ₆)	4.58 (m, 1H, H ₃)
4.43 (dd, $^3J_{1/2\alpha} = 3.0$ Hz, $^3J_{1/2\beta} = 2.7$ Hz, 1H, H ₁)	2.71 (m, 1H, H _{9α})
2.15 (m, 1H, H _{2α})	2.01-1.90 (m, 2H, H _{12α} , H ₁₄)
1.88-1.70 (m, 3H, H _{2β} , H _{9β} , H _{16α})	1.64 (m, 1H, H _{15α})
1.53-1.38 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅) H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})	1.37-1.18 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} ,
1.17-1.03 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)	0.98 (m, 1H, H _{22β})
0.89 (d, $^3J_{21/20} = 6.3$ Hz, 3H, H ₂₁)	0.84 (d, $^3J_{25/27} = 6.7$ Hz, 3H, H ₂₇)
0.84 (d, $^3J_{25/26} = 6.7$ Hz, 3H, H ₂₆)	0.47 (s, 3H, H ₁₈)

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

144.4 (s, C ₁₀)	143.2 (s, C ₈)	138.7 (s, C ₅)
127.7 (d, C ₄)	122.3 (d, C ₇)	111.5 (t, C ₁₉)
70.0 (d, C ₁)	66.6 (d, C ₆)	64.6 (d, C ₃)
56.6 (d, C ₁₇)	55.7 (d, C ₁₄)	45.9 (s, C ₁₃)

40.3 (t, C ₂)	39.5 (t, C ₁₂)	39.5 (t, C ₂₄)
36.1 (t, C ₂₂)	36.0 (d, C ₂₀)	29.3 (t, C ₉)
28.0 (t, C ₁₆)	27.6 (d, C ₂₅)	23.8 (t, C ₁₅)
23.3 (t, C ₂₃)	22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)
22.2 (t, C ₁₁)	18.8 (q, C ₂₁)	12.0 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

133 (100), 149 (70), 247 (62), 107 (57), 380 (50), 267 (40), 398 (35), 362 (10), 416 ([M]⁺, 6)

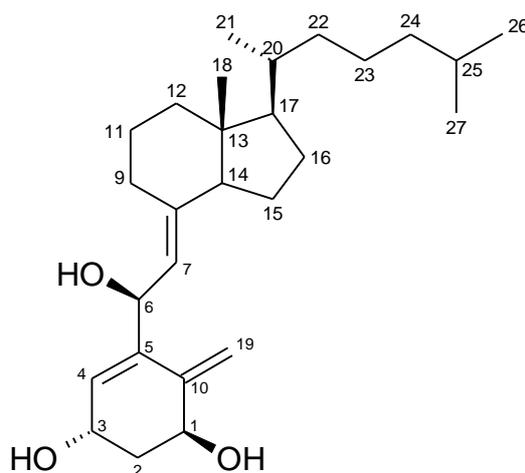
IR (KBr, cm⁻¹):

$\nu =$ 3290 (s, OH), 2952 (s; CH), 2872 (s, CH₂), 1668 (w, C=C), 1467 (s, CH₂, CH₃), 1382 (m, CH₃), 1040 (s), 991 (m)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₃]⁺: 416.3290

gefunden: 416.3312

(5E,7E)-(6S)-9,10-secocholesta-4, 7,10(19) -trien-1a,3b,6-triol (89)

C₂₇H₄₄O₃ (MG = 416.65), farbloses Öl

[**a**]_D²³ = +23° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.93 (d, ³ J _{3/4} = 3.4 Hz, 1H, H ₄)	5.12 (brs, 1H, H _{19α})
5.08 (d, ³ J _{6/7} = 8.4 Hz, 1H, H ₇)	5.07 (brs, 1H, H _{19β})
4.95 (d, ³ J _{6/7} = 8.4 Hz, 1H, H ₆)	4.38 (m, 1H, H ₃)
4.30 (dd, ³ J _{1/2α} = 3.2 Hz, ³ J _{1/2β} = 3.1 Hz, 1H, H ₁)	2.67 (m, 1H, H _{9α})
1.98-1.88 (m, 2H, H _{12α} , H ₁₄)	1.87-1.71 (m, 3H, H _{2α} , H _{9β} , H _{16α})
1.68 (m, 1H, H _{2β})	1.58 (m, 1H, H _{15α})
1.48-1.38 (m, 4H, H ₁₁ , H ₂₀ , H ₂₅) H ₁₇ , H _{22α} , H _{23α})	1.37-1.15 (m, 6H, H _{12β} , H _{15β} , H _{16β} ,
1.14-0.99 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)	0.95 (m, 1H, H _{22β})
0.90 (d, ³ J _{21/20} = 6.5 Hz, 3H, H ₂₁)	0.85 (d, ³ J _{25/27} = 6.7 Hz, 3H, H ₂₇)
0.84 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)	0.56 (s, 3H, H ₁₈)

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-D₄), δ (ppm):

145.0 (s, C ₁₀)	143.4 (s, C ₈)	140.3 (s, C ₅)
128.6 (d, C ₄)	124.4 (d, C ₇)	111.4 (t, C ₁₉)
70.0 (d, C ₁)	67.8 (d, C ₆)	65.4 (d, C ₃)
58.0 (d, C ₁₇)	55.8 (d, C ₁₄)	46.5 (s, C ₁₃)
41.8 (t, C ₂)	40.8 (t, C ₁₂)	40.7 (t, C ₂₄)
37.3 (t, C ₂₂)	37.4 (d, C ₂₀)	30.1 (t, C ₉)
29.2 (t, C ₁₆)	28.7 (d, C ₂₅)	25.0 (t, C ₁₅)
24.5 (t, C ₂₃)	23.4 (t, C ₁₁)	23.2 (q, C ₂₇)
22.9 (q, C ₂₆)	19.4 (q, C ₂₁)	12.4 (q, C ₁₈)

MS (EI, 70eV):

135 (100), 247 (78), 107 (73), 149 (72), 380 (60), 267 (48), 398 (31), 362 (17), 416 ([M]⁺, 6)

MS (Cl⁺, Ammoniak):

365 (100), 281 (91), 381 (51), 399 (20), 417 ([M+H]⁺, 10)

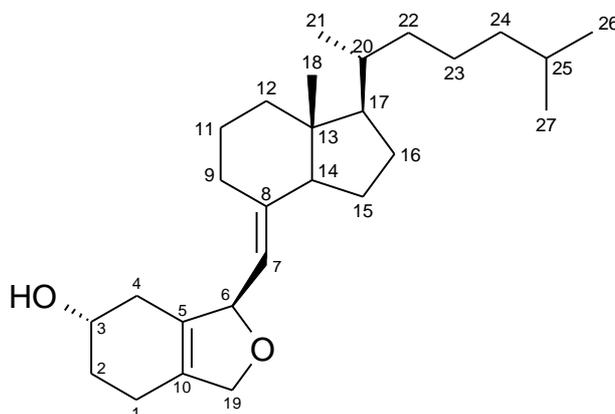
IR (KBr, cm⁻¹):

$\nu = 3280$ (s, OH), 2951 (s; CH), 2870 (s, CH₂), 1659 (m, C=C), 1466 (m, CH₂, CH₃), 1376 (m, CH₃), 1050 (m)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₃]⁺: 416.3290

gefunden: 416.3274

(5Z,7E)- (6R)-6,19-Epoxy-9,10-secocholesta-5(10),7-dien (91a)

C₂₇H₄₄O₂ (MG = 400.65), farbloses Öl

[α]_D²⁵ = + 33° ($c = 1.0$ mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

5.43 (d, ³J_{6/7} = 9.2 Hz, 1H, H₆)

4.55 (d, ²J = 11.1 Hz, 1H, H_{19 α})

4.09 (m, 1H, H₃)

2.24 (m, 1H, H_{4 α})

2.01-1.80 (m, 5H, H_{1 β} , H_{2 α} ,

H_{4 β} , H_{12 α} , H₁₄),

1.53-1.39 (m, 4H, H₁₁, H₂₀, H₂₅)

H₁₇, H_{22 α} , H_{23 α})

4.82 (d, ³J_{6/7} = 9.2 Hz, 1H, H₇)

4.45 (d, ²J = 11.1 Hz, H_{19 β})

2.66 (m, 1H, H_{9 α})

2.11 (m, 1H, H_{1 α})

1.79-1.54 (m, 4H, H_{2 β} , H_{9 β} , H_{15 α} , H_{16 α})

1.37-1.19 (m, 6H, H_{12 β} , H_{15 β} , H_{16 β} ,

1.17-1.04 (m, 3H, H _{23β} , H ₂₄)	0.99 (m, 1H, H _{22β})
0.90 (d, ³ J _{21/20} = 6.4 Hz, 3H, H ₂₁)	0.85 (d, ³ J _{25/27} = 6.5 Hz, 3H, H ₂₇)
0.86 (d, ³ J _{25/26} = 6.6 Hz, 3H, H ₂₆)	0.53 (s, 3H, H ₁₈)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

143.9 (s, C ₈)	131.3 (s, C ₅)	130.9 (s, C ₁₀)
120.0 (d, C ₇)	83.4 (d, C ₆)	76.0 (t, C ₁₉)
67.2 (d, C ₃)	56.6 (d, C ₁₇)	55.9 (d, C ₁₄)
45.2 (q, C ₁₃)	40.4 (t, C ₁₂)	39.5 (t, C ₂₄)
36.1 (t, C ₂₂)	36.1 (d, C ₂₀)	30.8 (t, C ₂)
30.5 (t, C ₉)	29.1 (t, C ₄)	28.0 (d, C ₂₅)
27.7 (t, C ₁₆)	24.0 (t, C ₁₅)	23.8 (t, C ₂₃)
22.8 (q, C ₂₇)	22.6 (q, C ₂₆)	22.1 (t, C ₁₁)
19.4 (t, C ₁)	18.9 (q, C ₂₁)	12.0 (q, C ₁₈)

MS (Cl⁺, Ammoniak):

248 (100), 398 (69), 298 (68), 383 (29), 401 ([M+H]⁺, 29)

IR (KBr, cm⁻¹):

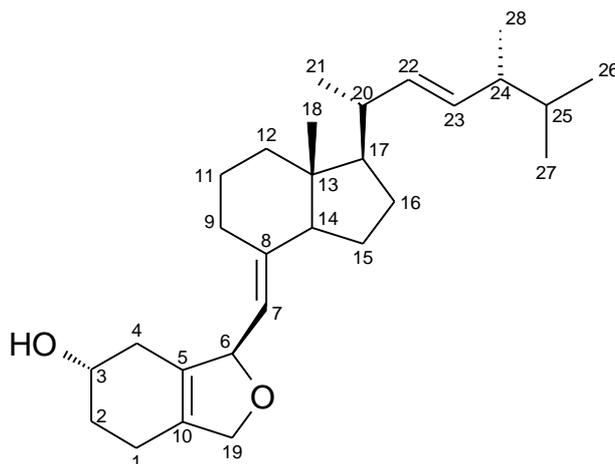
ν = 3426 (s, OH), 2927 (s; CH), 2860 (s, CH₂), 1458 (m, CH₂, CH₃), 1370 (w, CH₃), 1031 (m)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₇H₄₄O₂]⁺: 400.3341

gefunden: 400.3363

(7E,22E)-(6R)-6,19-Epoxy-9,10-secoergosta-5(10),7,22-trien (91b)



$C_{28}H_{44}O_2$ (MG = 412.66), farbloses Öl

$[\alpha]_D^{25} = +31^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

5.44(d, $^3J_{6/7} = 9.3 \text{ Hz}$, 1H, H_6)	5.17 (m, 2H, H_{22} , H_{23})
4.81 (d, $^3J_{6/7} = 9.3 \text{ Hz}$, 1H, H_7)	4.54 (d, $^2J = 10.8 \text{ Hz}$, 1H, $H_{19\alpha}$)
4.44 (d, $^2J = 10.8 \text{ Hz}$, 1H, $H_{19\beta}$)	4.08 (m, 1H, H_3)
2.65 (m, 1H, $H_{9\alpha}$)	2.24 (m, 1H, $H_{4\alpha}$)
2.11 (m, 2H, $H_{1\alpha}$, $H_{2\alpha}$)	2.04-1.78 (m, 5H, $H_{1\beta}$, $H_{4\beta}$, $H_{12\alpha}$, H_{14} , H_{20} , H_{24})
1.76-1.63 (m, 4H, $H_{2\beta}$, $H_{9\beta}$, $H_{15\alpha}$, $H_{16\alpha}$)	1.52-1.36 (m, 4H, H_{11} , H_{20} , H_{25})
1.37-1.19 (m, 4H, $H_{12\beta}$, $H_{15\beta}$, $H_{16\beta}$, H_{17})	1.00 (d, $^3J_{20/21} = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, H_{21})
0.89 (d, $^3J_{24/28} = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, H_{28})	0.82 (d, $^3J_{25/27} = 6.4 \text{ Hz}$, 3H, H_{27})
0.80 (d, $^3J_{25/26} = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, H_{26})	0.54 (s, 3H, H_{18})

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

143.9 (s, C_8)	135.6 (d, C_{23})	132.0 (d, C_{22})
131.3 (s, C_5)	130.9 (s, C_{10})	120.1 (d, C_7)
83.4 (d, C_6)	76.0 (t, C_{19})	67.1 (d, C_3)
56.4 (d, C_{17})	56.9 (d, C_{14})	45.1 (q, C_{13})
42.9 (d, C_{24})	40.3 (d, C_{20})	40.2 (t, C_{12})
33.1 (d, C_{25})	30.8 (t, C_2)	30.5 (t, C_9)

29.1 (t, C ₄)	27.8 (t, C ₁₆)	23.9 (t, C ₁₅)
22.1 (t, C ₁₁)	21.1 (q, C ₂₁)	20.0 (q, C ₂₆)
19.6 (q, C ₂₇)	19.4 (t, C ₁)	17.6 (q, C ₂₈)
12.3 (q, C ₁₈)		

MS (Cl⁺, Ammoniak):

412 (100), 394 (31), 396 (20) 429 (8) 431 ([M+NH₄]⁺, 6)

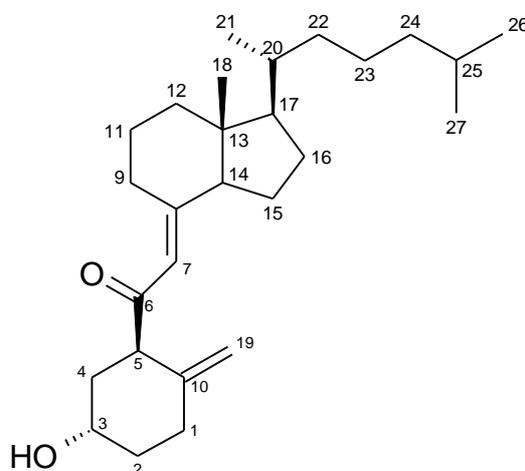
IR (KBr, cm⁻¹):

$\nu =$ 3445 (s, OH), 2955 (s; CH), 2870 (s, CH₂), 1457 (m, CH₂, CH₃), 1372 (m, CH₃), 1031 (m), 972 (m, =C-H)

Massenfeinbestimmung:

berechnet für [C₂₈H₄₄O₂]⁺: 412.3341

gefunden: 412.3362

(7E)-(5S)-3b-Hydroxy-9,10-secocholesta 7,10(19)-dien-6-on (93a)

C₂₇H₄₄O₂ (MG = 400.65), farbloses Öl

[α]_D²⁵ = + 45° (c = 1.0 mg/ml, MeOH)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

6.01 (s, 1H, H ₇)	4.85 (dd, ² J < 1 Hz, 2H, H ₁₉)
4.10 (m, 1H, H ₃)	3.74 (m, 1H, H _{9α})

3.43 (pst, $^3J_{4\alpha/5} \approx 5$ Hz, $^3J_{4\beta/5} \approx 4$ Hz,

1H, H₅)

2.37-2.30 (m, 2H, H_{1 α} , H_{4 α})

2.14-2.04 (m, 2H, H_{1 β} , H₁₄)

1.99 (m, 1H, H_{12 α})

1.90 (m, 1H, H_{2 α})

1.75-1.62 (m, 3H, H_{9 β} , H_{15 α} , H_{16 α})

1.59-1.40 (m, 6H, H₁₁, H₂₀, H₂₅,

H_{2 β} , H_{4 β})

1.38-1.22 (m, 6H, H_{12 β} , H_{15 β} , H_{16 β} ,

H₁₇, H_{22 α} , H_{23 α})

1.18-1.06 (m, 3H, H_{23 β} , H₂₄)

1.00 (m, 1H, H_{22 β})

0.91 (d, $^3J_{21/20} = 6.0$ Hz, 3H, H₂₁)

0.86 (d, $^3J_{25/27} = 6.5$ Hz, 3H, H₂₇)

0.85 (d, $^3J_{25/26} = 6.6$ Hz, 3H, H₂₆)

0.53 (s, 3H, H₁₈)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

201.1 (s, C₆)

162.0 (s, C₁₀)

146.4 (s, C₈)

118.9 (d, C₇)

111.8 (t, C₁₉)

66.6 (d, C₃)

57.0 (d, C₁₇)

56.8 (d, C₁₄)

55.1 (d, C₅)

47.5 (q, C₁₃)

40.2 (t, C₁₂)

39.5 (t, C₂₄)

36.4 (t, C₂)

36.0 (t, C₂₂)

36.0 (d, C₂₀)

35.7 (t, C₄)

30.9 (t, C₁)

29.8 (t, C₉)

28.0 (d, C₂₅)

27.4 (t, C₁₆)

24.1 (t, C₁₅)

23.8 (t, C₂₃)

22.8 (q, C₂₇)

22.5 (q, C₂₆)

22.1 (t, C₁₁)

18.8 (q, C₂₁)

12.1 (q, C₁₈)

MS (EI, 70eV):

289 (100), 135 (96), 149 (92), 133 (79), 107 (72), 121 (69), 109 (63),

261 (60), 147 (54), 290 (51), 119, (42), 247 (32), 382 (15), 367 (11),

400 ([M]⁺, 7)

MS (CI⁺, Ammoniak):

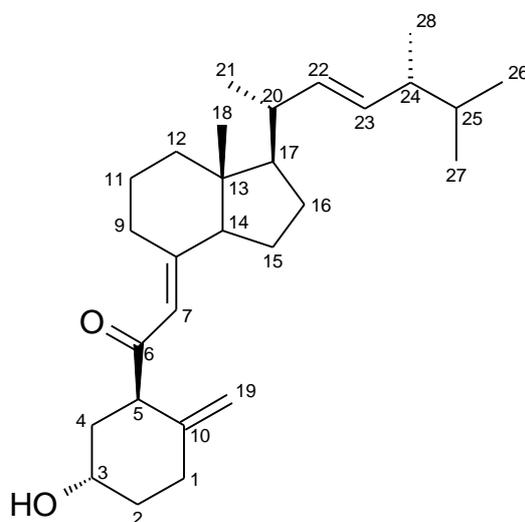
401 ([M+NH₄]⁺, 100), 190 (53), 172 (28), 279 (28)

IR (KBr, cm⁻¹):

ν = 3422 (s, OH), 2929 (s; CH), 2868 (s, CH₂), 1684 (m, C=O), 1467 (m, CH₂, CH₃), 1381 (w, CH₃), 1022 (m)

Massenfeinbestimmung:berechnet für $[C_{27}H_{44}O_2]^+$: 400.3341

gefunden: 400.3329

(7E, 22E)-(5S)-3b-Hydroxy-9,10-secoergosta 7,10(19),22-trien-6-on (93b) $C_{28}H_{44}O_2$ (MG = 412.66), farbloses Öl $[a]_D^{25} = -22^\circ$ ($c = 1.0 \text{ mg/ml}$, MeOH) **$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm):**5.99 (s, 1H, C-H₇)5.16 (m, 2H, H₂₂, H₂₃)4.90 (d, $^2J < 1 \text{ Hz}$, 1H, H_{19\alpha})4.78 (d, $^2J < 1 \text{ Hz}$, 1H, H_{19\beta})4.09 (m, 1H, H₃)3.73 (m, 1H, H_{9\alpha})3.43 (pst, $^3J_{4/5} \approx 5 \text{ Hz}$, 1H, H₅)2.37-2.25 (m, 2H, H_{1\alpha}, H_{4\alpha})2.14-2.07 (m, 2H, H_{1\beta}, H₁₄)2.04 (m, 1H, H_{12\alpha})2.02-1.78 (m, 3H, H_{2\alpha}, H₂₀, H₂₄)1.77-1.64 (m, 3H, H_{9\beta}, H_{15\alpha}, H_{16\alpha})1.51-1.33 (m, 5H, H₁₁, H₂₅, H_{2\beta}, H_{4\beta},
H₁₇)1.32-1.21 (m, 4H, H_{12\beta}, H_{15\beta}, H_{16\beta},
H₁₇)0.99 (d, $^3J_{20/21} = 6.7 \text{ Hz}$, 3H, H₂₁)0.89 (d, $^3J_{24/28} = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, H₂₈)

0.81 (d, $^3J_{25/27} = 6.7$ Hz, 3H, H₂₇)0.80 (d, $^3J_{25/26} = 6.9$ Hz, 3H, H₂₆)0.52 (s, 3H, H₁₈)**¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):**

201.1 (s, C ₆)	162.0 (s, C ₁₀)	146.5 (s, C ₈)
135.3 (d, C ₂₃)	132.3 (d, C ₂₂)	119.0 (d, C ₇)
111.8 (t, C ₁₉)	66.6 (d, C ₃)	57.2 (d, C ₁₇)
56.7 (d, C ₁₄)	55.2 (d, C ₅)	47.4 (q, C ₁₃)
42.9 (d, C ₂₄)	40.3 (d, C ₂₀)	40.1 (t, C ₁₂)
36.5 (t, C ₂)	35.8 (t, C ₄)	33.2 (d, C ₂₅)
31.0 (t, C ₁)	29.8 (t, C ₉)	27.6 (t, C ₁₆)
24.2 (t, C ₁₅)	22.2 (t, C ₁₁)	21.2 (q, C ₂₁)
20.0 (q, C ₂₆)	19.1 (q, C ₂₇)	17.7 (q, C ₂₈)
12.4 (q, C ₁₈)		

MS (Cl⁺, Ammoniak):

301 (100), 35 (84), 414 ([M+H]⁺, 47), 411 (46), 318 (26), 413 (19)
431([M+NH₄]⁺, 9)

IR (KBr, cm⁻¹):

$\nu =$ 3430 (s, OH), 2956 (s; CH), 2871 (s, CH₂), 1684 (s, C=O), 1458 (m, CH₂,
CH₃), 1371 (m, CH₃), 1067 (m, CO), 971 (m, =C-H)

Massenfeinbestimmung:berechnet für [C₂₇H₄₄O₂]⁺: 412.3341

gefunden: 412.3317

Literaturverzeichnis:

- [1] L.W. Pickle, M. Mungiole, G.K. Jones, A.A. White: Atlas of United States mortality. Hyattsville, Maryland: National Center of Health Statistics 1996, S. 13 - 23.
- [2] R. Levi-Montalcini: The nerve growth factor 35 years later; *Science*, 237, 1154 - 1162, (1987)
- [3] S. Furukawa, Y. Furukawa: Nerve Growth Factor synthesis and its regulatory mechanisms: An approach to therapeutic induction of nerve growth factor synthesis; *Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev.*, 2, 328 - 344, (1990)
- [4] S. Furukawa, Y. Furukawa, E. Satayoshi, K. Hayashi: Synthesis/secretion of nerve growth factor is associated with cell growth in cultured mouse astroglial cells; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 395-402, (1987)
- [5] M.M. Racke, P.J. Mason, M.P. Johnson, R.G. Brankamp, M.D. Linnik: Demonstration of a second pharmacologically active promoter Region in the NGF gene that induces transcription at exon 3; *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 41, 192-199, (1996) und hier zitierte Literatur
- [6] H. Awagishi, M. Ando, H. Sakamoto, S. Yoshida, F. Ojima, Y. Ishiguro, N. Ukai, S. Furukawa: Hericenones C, D and E, stimulator of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Herichium erinaceum*; *Tetrahedron Lett.*, 4561-4564, (1991)
- [7] I. Neveu, F. Jehan, R. Houlgatte, D. Wion, P. Brachet: Activation of nerve growth factor synthesis in primary glial cells by phorbol 12-myristate 13-acetate: role of protein kinase C; *Brain Res.*, 570, 316-322, (1992)
- [8] Y. Furukawa, N. Tomioka, W. Sato, E. Satoyoshi, K. Hayashi, S. Furukawa: Catecholamins increase nerve growth factor mRNA content in both mouse astroglial cells and fibroblast cells; *FEBS Lett.*, 247, 463-467, (1989)
- [9] Y. Furukawa, S. Furukawa, F. Ikeda, E. Satoyoshi, K. Hayashi: Aliphatic side chain of catecholamine potentiates the stimulatory of the catechol part on the synthesis of nerve growth factor; *FEBS Lett.*, 208(9), 258 - 262, (1987)
-

- [10] R. Ikegami, Y. Furukawa, K. Kaechi, K. Hayashi, S. Furukawa: Effects of catecholamines and 4-methylcatechol on the synthesis and secretion of nerve growth factor by rat sciatic nerve segments in culture; *Biomed. Res.*, 11, 61 - 65, (1990)
- [11] S. Furukawa, Y. Furukawa, E. Satoyoshi, K. Hayashi : Regulation of nerve growth factor synthesis/secretion by catecholamine in cultured mouse astroglial cells; *Boichem. Biophys. Res. Com.* 147, 1048 - 1054, (1987)
- [12] Y. Furukawa, N. Fukazawa, . Miyama, K. Hayashi, S. Furukawa: Stimulatory effect of 4-alkylcatechols and their diacetylated derivatives on the synthesis of nerve growth factor; *Biochem. Pharmacol.*, 40, 2337 - 2342, (1990)
- [13] R. Takeuchi, K. Murase, Y. Furukawa, S. Furukawa, k. Hayashi: Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by 1,4-benzoquinone and its derivatives in cultured mouse astroglial cells; *FEBS Lett.*, 261, 63 - 66, (1990)
- [14] M.S. Saporito, H.M. Wilcox, K. Clopton-Hartpence, M.E. Lewis, J.L. Vaught, S. Carswell: Pharmacological induction of nerve growth factor mRNA in adult rat brain; *Exp. Neurol.*, 123, 295-302, (1993)
- [15] S. Balabanova, H.P. Richter, G. Antoniadis, J. Homoki, N. Kremmer, J. Hanle, W.M. Teller: 25-hydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid; *Klin. Wochenschr.*, 62, 1086 - 1090, (1984)
- [16] D. Wion, D. MacGrogan, I. Neveu, F. Jehan, R. Houlgatte, P. Brachet: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a potent inducer of nerve growth factor synthesis; *J. Neurosci. Res.*, 28, 110-114, (1991)
- [17] I.M. Musiol, D. Feldman: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induction of nerve growth factor in L929 mouse fibroblasts: effect of vitamin D receptor regulation and potency of vitamin D₃ analogs; *Endocrinology*, 138, 12-18, (1997)
- [18] M.S. Saporito, E. Robbis, E. Brown, K. Clopton Hartpence, J. Battle, J.L. Vaught, S. Carswell: 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ induces nerve growth factor in the brain; Proceedings of the ninth workshop on Vitamin D Orlando, Florida (USA) 1994 S. 629 - 632
- [19] W.E. Stumpf, S. Madhabananda, S.A. Clark: Brain target sites for 1,25-Dihydroxyvitamin D₃; *Science*, 215, 1403 - 1405, (1982)
-

- [20] W.E. Stumpf, L.P. O'Brian: 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ sites of action in the brain: an autoradiographic study; *Histochemistry*, 87, 393 - 406, (1987)
- [21] J. Sonnenberg, V.N. Luine, L.C. Krey, S. Christakos: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ treatment results in increased cholin acetyltransferase activity in specific brain nuclei; *Endocrinology*, 118, 1433 - 1439, (1986)
- [22] M.K. Sutherland, M.J. Somerville, L.L.K. Yoong, C. Bergeron, M.R. Haussler, D.R. Crapper McLachan: Reduction of vitamin D receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbinding-28K mRNA levels; *Mol. Brain Res.*, 13, 239 - 250, (1992)
- [23] A.W. Norman: Vitamin D, the calcium homeostatic hormone, Academic Press, New York, 1979, S. 1 - 230
- [24] H.F. DeLuca, .K. Schnoes: Metabolism and mechanism of action of vitamin D, *Ann. Rev. lochem.*, 45, 631-666 (1976)
- [25] T. Suda: The role of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ in the myeloid cell differentiation; *Proc. Soc. Exp. iol. Med.*, 191, 214-220, (1989)
- [26] S. Kadowaki, A.W. Norman: Dietary vitamin D is essential for normal insulin secretion from the perfused rat pancreas; *J. Clin. Invest.*, 73, 759-766, (1984)
- [27] C.D. Tsoukas, D. Provedini, D. Manolagas, S.C. Manolagas: 1,25-dihydroxyvitamin D₃: a novel immunoregulatory hormone; *Science*, 224, 1438-1440
- [28] D. Feldman, T. Chen, M. Hirst, K. Colston, M. Karasek, C. Cone, *J. Clin. Endocrin. Met.*, 51, 1463-1468 (1980)
- [29] J.P. Sestelo, J.L. Mascarenas, L. Castedo, A. Mourino: Ultrasonically induced conjugate addition of Iodites to the elektron deficient olefines and its applikation to the synthesis of side-chain analogs of the hormone 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃; *J. Org. Chem.*, 58, 118-123, (1993) und hier zitierte Literatur
- [30] K.R. Muralidharan, A.R. de Lera, S.D. Isaeff, A.W. Norman, W.H. Okamura: Studies on the A-Ring Diastereomers of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃; *J. Org. Chem.*, 58, 1895-1899, (1993) und hier zitierte Literatur
-

- [31] F. Jehan, I. Neveu, N. Barbot, L. Binderup, P. Brachet, D. Wion: MC903, an analog of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, increases the synthesis of nerve growth factor; *Eur. J. Pharmacol., Mol. Pharmacol. Sect.*, 208, 198-201, (1991)
- [32] G. Michel, A. Gailis, B. Jarzebska-Deussen, A. Muüschén, A. Mirmohammadsadegh, T. Ruzicka: 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ and calcipotriol induce IL-10 receptor gene expression in human epidermal cells; *Inflamm. Res.*, 46, 32-34, (1997)
- [33] M. Hudlicky: Oxidation in organic chemistry; American Chemical Society, Washington, DC, 1990, S.1-360
- [34] J.W.J. Gielen, R.B. Koolstra, H.J.C. Jacobs, E. Havinga: Triplet-sensitized interconversion and photooxygenation of Vitamin D and *trans* Vitamin D; *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 99, 306-311, (1980)
- [35] S. Yamada, K. Nakayama, H. Takayama: Studies of Vitamin D oxidation. 3. Dye-sensitized photooxidation of Vitamin D and chemical behavior of Vitamin D 6,19-Epidioxides; *J. Org. Chem.*, 48, 3477-3483, (1983)
- [36] S. Moriuchi, F. Tsuruki, Y. Otawara, N. Hosoya, S. Yamada, K. Nakayama, H. Takayama: Biological activity of the endoperoxides derived from Vitamin D derivatives by dye-sensitized photo-oxidation; *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 25, 455 - 458, (1979)
- [37] S. Yamada, K. Yamamoto, H. Naito, T. Suzuki, M. Ohmori: Synthesis and differentiating action of vitamin D endoperoxides. Singlet oxygen adducts of vitamin D derivatives in human myeloid leukemia cells (HL-60); *J. Med. Chem.*, 28, 1148-1153, (1985)
- [38] Y. Shiina, C. Miyaura, H. Tanaka, E. Abe, S. Yamada, K. Yamamoto, E. Ino, H. Takayama, I. Matsunaga, Y. Nishii, T. Suda: Mechanism of the differentiating action of 25-Hydroxyvitamin D₃ Endoperoxides in human myeloid leukemia cells (HL-60); *J. Med. Chem.*, 28, 1153-1158, (1985)
- [39] K. Frobel, T. Krämer: Kombinatorische Synthese: Ein neuer Weg in der Wirkstoffsuche; *Chem. in uns. Zeit*, 6, 270 - 285, (1996)
- [40] M. Balci: Bicyclic Endoperoxides and synthetic applications; *Chem. Rev.*, 81, 91-108, (1981)
-

- [41] W. Adam, H.J. Eggelte: Prostanoid Endoperoxid model compounds: 2,3-Dioxabicyclo[2.2.1]heptane via selective Diimide reduction; *J.Org.Chem.*, 24, 3987 - 3988, (1977)
- [42] G.O. Schenck, D.E. Dunlap: Photosynthese von Cycloheptadien-Endoperoxid bei -100 °C und Hydrierung von Endoperoxiden mit Thioharnstoff; *Angew. Chem.*, 7, 248 - 249, (1956)
- [43] C.H. Foster, G.A. Berchtold: Addition of singlet oxygen to aren oxides; *J.Org.Chem.*, 25, 3743 - 3746, (1975)
- [44] H.H. Wassermann, J.L. Ives: Singlet oxygen in organic synthesis; *Tetrahedron*, 37, 1825 - 1852, (1981)
- [45] W. Adam, M. Balci: Photooxygenation of 1,3,5-Cycloheptatrien: Transformation of Endoperoxides; *J. Am. Chem. Soc.* 101, 7542 - 7547, (1979)
- [46] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge: Free Radicals in Biology and Medicine, 2. Edition; Clarendon Press, Oxford 1994, S. 225, 395, 396
- [47] S. Patai (Ed.): The chemistry of peroxides, John Wiley & Sons Ltd., Chichester 1983 S. 203 - 204
- [48] P.B. Merkel, D. R. Kearns: Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer; *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 7244-7253, (1972)
- [49] M. Kasha, D.E. Brabham: Singlet Oxygene, Academic Press, New York 1979 S. 1-479
- [50] J.H. Wieringa, J. Strating, H. Wynberg, W. Adam: Adamantylideneadamantane peroxide; a stable 1,2 Dioxetan; *Tet Lett.*, 169 - 172, (1972)
- [51] R. Matusch, G. Schmidt: Konkurrenz von Endoperoxid- und Hydroperoxidbildung bei der Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit cyclischen, konjugierten Dienen; *Angew. Chem.*, 100, 729 - 730, (1988)
- [52] C.S. Foote, S. Wexler: Olefin oxidations with excited singlet molecular oxygen; *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 3879 - 3880, (1964)
-

- [53] E. McKeown, W.A. Waters: The oxidation of organic compounds by singlet-oxygen; *J. Chem. Soc., B*, 1040 - 1046 (1966)
- [54] R.. Boyer, .G. Lindstrom, B. Darby, M. Hylarides: The peracid oxidation of singlet-oxygen acceptors; *Tet. Lett.*, 47, 4111 - 4114, (1975)
- [55] H.H. Wassermann, .R. Scheffer, J.L. Cooper: Singlet-oxygen reactions with 9,10-Diphenyl-anthracene peroxide; *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 4991 - 4996, (1972)
- [56] H.H. Wasserman, R.W. Murray: Singlet Oxygen; Academic Press New York, London 1979, S. 59 - 112
- [57] C.S. Foote, R.W. Denny; Chemistry of singlet-oxygene. XII. Electronic effects on rate and products of the reaction with olefins; *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 5162 - 5167, (1971)
- [58] C.S. Foote, S. Wexler, W. Ando: Chemistry of singlet-oxygen. III. Product selectivity; *Tet. Lett.*, 46, 4111 - 4118, (1965)
- [59] J. Bland, B. Craney: Chemical oxygenation of Vitamin D₃; *Tet. Lett.*, 46, 4041 - 4044, (1974)
- [60] G. Schmidt: Photooxidationen von p-Menthadienen; Dissertation Marburg 1987 S. 7-9
- [61] A.P. Schaap, A.L. Thayer, E.C. Blossey, D.C. Neckers: Polymer based sensitizers for photooxidations. II; *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 3741 - 3745, (1975)
- [62] C.S. Foote, S. Wexler, W. Ando, R. Higgins: Chemistry of singlet oxygene IV: Oxygenations with hypochlorite-hydrogen-peroxide; *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 975 - 981, (1968)
- [63] G. Schmidt: Photooxidationen von p-Menthadienen; Dissertation Marburg 1987 S. 77-88
- [64] A.A. Frimer (Ed.): Singlet Oxygen, Volume 1, Physical-Chemical Aspect; CRC Press inc., Boca Raton, Florida 1985, S. 39 - 51
- [65] H.H. Inhoffen, G. Quinkert, S. Schütz: Aufbau des trans-Hydrinan-Ketons aus Vitamin D₃ zum vinylogenen Aldehyd; *Chem. Ber.*, 90, 1283 - 1286, (1957)
-

- [66] M. Duraisamy, H.M. Walborsky: Circular dichroism of isomeric 10,19-Dihydrovitamin D: *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 3270 - 3273, (1983)
- [67] P. Fresenius, K. Görlitzer: Organisch-chemische Nomenklatur, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1991, S. 60 - 78
- [68] H. Friebolin: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1988, S. 239
- [69] L.M. Jackman, S. Sternhell: Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, 2nd Edition; Pergamon Press Ltd., Oxford 1959, S. 276
- [70] W.C. Neikamp, P.D. Dailey: NMR Spectra of some cyclohexyl derivatives; *J. Chem. Phys.*, 38, 445-447, (1963)
- [71] S.H. Schroeter, E.L. Eliel: The configuration of the carvomenthols, carveols and related compounds, *J. Org. Chem.*, 30, 1-7, (1965)
- [72] E.F. Mooney: Annual Reports on NMR Spectroscopy, Volume 6A, Academic Press, London 1975 S. 220 -225
- [73] M. Karplus: Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments, *J. Chem. Phys.*, 30, 11-15, (1959)
- [74] S.R. Wilson, M. Serajul Haque: An asymmetric total synthesis of Vitamin D₃ (Cholecalciferol); *Tet. Lett.*, 25, 3147 - 3150, (1984)
- [75] S. Winstein, P. Carter, F.A.L. Anet, A.J.R. Bourn: The effects of steric compression on chemical shifts in half-cage and related molecules; *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5247 - 5249, (1965)
- [76] G. Slomp, B.R. Mc Garvey: Nuclear magnetic resonance studies on 6-Methyl-Steroids; *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 2200 - 2201, (1959)
- [77] M. Barfield, D.M. Grant: The effect of hyperkonjugation on the geminal spin-spin coupling constant; *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 1899 - 1904, (1963)
- [78] Friebolin: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1988, S. 233
-

- [79] P. Sykes: Reaktionsmechanismen in der Organischen Chemie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1988, S. 388-390
- [80] A. Nickon, W.L. Mendelson: Reactivity and geometry in allylic systems; III. Photosensitized oxygenation of cholest-4-ene, a steroid olefin with a conformationally flexible ring; *Can. J. Chem.*: 43, 1419 - 1428, (1964)
- [81] R. L. Kenney, G.S. Fisher: Photosensitized oxidation of carvomenthene; *J. Org. Chem.*, 28, 3509 - 3512, (1963)
- [82] G.O. Schenck, O.A. Neumüller, W. Eisfeld: Δ^5 -Steroid-7 α -Hydroperoxyde und -7-Ketone durch allylumlagerung von Δ^6 -Steroid-5 α -Hydroperoxyden; *Liebigs Ann. Chem.*, 618, 202 - 211, (1958)
- [83] M.J.S. Dewar, A.C. Griffin, W. Thiel, I. Turchi: A possible mechanism for the formation of oxiranes in reactions of singlet molecular oxygen with olefins; *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 4439 - 4440, (1975)
- [84] N. Shimizu, P.D. Bartlett: Photooxidation of olefins by α -Diketons and by Benzophenone. A praktikal epoxidation method with Biacetyl; *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 4193 - 4200, (1976)
- [85] A.P. Schaap, G.R. Faler: Mechanism of 1,2 cycloaddition of of singlet oxygen to alkenes. Trapping a peroxide intermediat; *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 3381 - 3382, (1973)
- [86] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1991, S. 103 - 109
- [87] J.E. Lear, L.L. Smith: Sterol Metabolism IV: Cholesterol 24-Hydroperoxide; *J. Org. Chem.*, 36, 1007 - 1009, (1971)
- [88] A.M. Feinberg, K. Nakanishi, J. Barciszewski, A.J. Rafalski, H. Augustyniak, M. Wiewiorowski: Isolation and characterization of Peroxy-Y-base from phenylalanin-transfer ribonucleic acid of the plant *lupinus luteus*; *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 7797 - 7800 (1974)
- [89] S. Patai (Ed.): The chemistry of peroxides, John Wiley & Sons Ltd., Chichester 1983 S. 105 - 126
-

- [90] W. Adam, H. Rebollo: Singlet oxygenation of cycloheptatrien; isolation and characterization of 1,2 Dioxetan; *Tet Lett.*, 22, 3049 - 3052, (1981)
- [91] K.R. Kopecky, J.E. Filby, C. Munford, P.A. Lockwood, J. Y. Ding: Preparation and thermolysis of some 1,2 Dioxethanes; *Can. J. Chem.*, 53, 1103-1122, (1975)
- [92] H. Takeshita, T. Hatsui: Sensitized photoreduction of dioxetanes to cis 1,2 Glycols: solvent and sensitizer dependencies on the singlet oxygene oxidation; *J. Org. Chem.*, 43, 3080-3083, (1978)
- [93] A. Zschunke: Molekülstruktur: Form, Dynamik, Funktion, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1993, S. 208 - 210
- [94] AccuModel Version 1.1, Copyright 1996 Microsimulation
- [95] H.Hesse, M.Pechet, G. Johnson, J.P.Finet: A direct, regio- and stereoselective 1 α -hydroxylation of (5E)-Calciferol derivatives; *J. Org. Chem.*, 51, 1635- 1637, (1986)
- [96] S.Yamada, H.Takayama: Studies on the adducts of sulfur dioxide with Vitamin D; *Chem. Lett.*, 583-586, (1979)
- [97] M.J. Calverley: Synthesis of MC-903, a biologically active Vitamin D metabolite analogue; *Tetrahedron*, 43, 4609-4619, (1987)
- [98] H.J. Schneider, A. Hoppen: Carbon-13 nuclear magnetic resonance substituent-induced shieldings and conformational equilibria in cyclohexanes; *J. Org. Chem.*, 43, 3867-3873, (1978)
- [99] .O. Pierson, O.A. Runquist: The reduction of Ascaridole with Triphenylphosphine; *J. Org. Chem.*, 11, 3654-3655, (1969)
- [100] P.D. Bartlett, M.E. Landis, M.J. Shapiro: Cis-stilbene oxide from trans-stilbene via dioxetan deoxygenation - a stereospecific sequence involving three inversions; *J. Org. Chem.*, 42, 1661-1662, (1977)
- [101] I. Neveu, P. Naveilhan, F. Jehan, C. Baudet, D. Wion, H.F. De Luca, P. Brachet: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells; *Mol. Brain Res.*, 24, 70 - 76, (1994)
-

- [102] I. Neveu, P. Naveilhan, F. Jehan, C. Baudet, M. Garabedian, D. Wion, P. Brachet: Rat brain glial cells synthesize and respond to 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ by an increased production of nerve growth factor; Proceedings of the ninth workshop on Vitamin D Orlando, Florida (USA) 1994 S. 621 -628
- [103] .D. McCarthy, J. De Vellis: Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue; *J. Cell Biol.*, 85, 890 - 902, (1980)
- [104] P. Neveilhan, I. Neveau, C. Baudet, K.Y. Ohyama, P. Brachet, D. Wion: Expression of 25(OH) vitamin D₃ 24-hydroxylase gene in glial cells; *NeuroReport*, 5, 255 - 257, (1993)
- [105] H.A.P. Pols, J.C. Birkenhäger, .P. Schilte, T.J. Visser: Evidence that the self-induced metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ limits the homologous up-regulation of its receptor in rat osteosarcoma cells; *Biochim. Biophys. Acta*, 970, 122 - 129, (1988)
- [106] F. Mohamadi, N. Richards, W. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W.C. Still: MacroModel - An integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics: *J. Comput. Chem.*, 11, 440 - 452 (1990)
- [107] W.C. Still, A. Tempczyk, R.C. Hawley, T. Hendrickson: Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics, . *Am. Chem. Soc.*, 112, 6127 - 6132, (1990)
-