

ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

64. Jahrgang · Nr. 23 · Seite 633–660 · 7. Dezember 1952

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

Zum biochemischen Syntheseweg der Steroide

Von Prof. Dr. R. TSCHESCHE und Dr. F. KORTE, Hamburg

Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität Hamburg

Es wird versucht, aus dem bekannten Tatsachenmaterial über Cardenolide, Bufadienolide und Spirostanole Anhaltspunkte für den biochemischen Syntheseweg der Sterole zu gewinnen. Es ergeben sich hieraus Folgerungen für die biochemischen Zusammenhänge dieser Steran-Derivate untereinander und für den Aufbau bisher nicht bekannter Intermediärprodukte der Synthese. Aus Mesogentiogenin und Picrotoxinin wird eine doppelt ungesättigte Oxsäure mit 10 C-Atomen abgeleitet, die sehr wahrscheinlich eine Rolle beim Aufbau der Steroide spielt. Ihr Kohlenstoff-Skelett ist zweimal im Squalen enthalten, das auf Grund von Fütterungsversuchen als besonders wirksam hinsichtlich der Cholesterol-Synthese erkannt worden ist. Es wird gezeigt, daß aus dieser Säure durch Wegnahme von 2 C-Atomen ein C₈-Keton entsteht, das als Baustein der Seitenkette der Spirostanole und Sterole gelten kann.

I. Mitteilung*)

Aus pflanzlichen und tierischen Organismen sind eine Reihe Typen von Steran-Derivaten isoliert worden: Sexualhormone, Nebennierenrindenhormone, pflanzliche Herzgifte, Krötengifte, Gallensäuren, Steroidsaponine, Steranalkaloide und Sterole. Sie unterscheiden sich vor allem im Aufbau der Seitenkette an C₁₇ und in der Anzahl und Art der Sauerstoff-Funktionen in der Molekel. Die Fähigkeit zum Aufbau des komplizierten Ringsystems aus vier Ringen scheint an eine gewisse Stufe der biologischen Entwicklung geknüpft zu sein, da aus Bakterien bisher nicht mit Sicherheit Verbindungen dieser Stoffklasse bekannt geworden sind. Hefen und Pilze sind jedoch schon der Sterol-Synthese fähig¹⁾.

Für einige der Steran-Derivate ist eine biologische Verknüpfung derart festgestellt worden, daß sie sehr wahrscheinlich durch Abbau aus den Kohlenstoff-reichsten und Sauerstoff-armsten Verbindungen, den Sterolen, gebildet werden. Es gilt dies für die Gallensäuren, die Nebennierenrindenhormone und vermutlich auch für die Sexualhormone. Jedenfalls haben biologische Versuche mit durch Isotopen markierten Sterolen, insbes. Cholesterol, einen solchen biochemischen Weg als vermutlich richtig erwiesen¹⁾. Für die anderen erwähnten Naturstoffe ist ein solcher Zusammenhang bisher nicht gefunden. Es wäre jedoch ebenso gut möglich, daß sie statt durch Abbau direkt auf dem Weg der Biosynthese entstehen.

Die Biochemie der Sterol-Synthese liegt bisher im Dunkeln. Wir wissen mit einiger Sicherheit, daß vermutlich Essigsäure auch hier das Ausgangsmaterial ist¹⁾. Zwischen ihr und den fertigen Sterolen mit 27–29 C-Atomen in der Molekel müssen aber eine ganze Reihe von Zwischenstufen vorhanden sein, über die bisher keine Aussagen gemacht werden können. Da die Sexualhormone, Nebennierenrindenhormone und Gallensäuren als Intermediärprodukte aus dem oben erwähnten Grunde ausfallen,

scheint es reizvoll, zu untersuchen, wieweit die anderen erwähnten Steran-Derivate als solche hierfür in Frage kommen.

Ableitung einer Intermediärstufe aus Cardenoliden und Bufadienoliden

Betrachten wir zunächst die Aglykone der pflanzlichen Herzgifte, bzw. Krötengifte, mit 23 und 24 C-Atomen in der Molekel²⁾. Sie sind zum Teil durch einen hohen Gehalt an Sauerstoff ausgezeichnet. So enthält das Ouabagenin (s. Tabelle 2) auf 23 C-Atome 8 Atome O. Daneben finden sich in dieser Gruppe viele Möglichkeiten zwischen O₈ und O₄ verwirklicht. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Aglykonen mit 24 C-Atomen und den chemisch gleich gebauten Krötengiften (Bufadienolide)³⁾ (III). Falls diese Verbindungen aus Essigsäure aufgebaut werden, so scheint es nicht unwahrscheinlich, daß unter den Intermediärstufen der Biosynthese relativ Sauerstoff-reiche Verbindungen zu erwarten sein werden. Es ergibt sich so die Möglichkeit, aus dem bekannten Tatsachenmaterial über Herzgiftaglykone eine Zwischenstufe zu konstruieren, die dann einige Wahrscheinlichkeit für sich hätte, dem gesuchten Intermediärprodukt nahezustehen.

In den Aglykonen vom C₂₃-Typ (Cardenolide)³⁾, die bisher am besten untersucht sind und bei denen ein besonders reiches Erfahrungsmaterial vorliegt, finden sich u. U. Hydroxyl-Gruppen bzw. Oxo-Gruppen an C₃, C₅, C₁₁, C₁₂, C₁₄, C₁₆ und C₁₉ vor, an anderen Stellen wurde bisher niemals eine Sauerstoff-Funktion beobachtet. Als einzige Ausnahme könnte hier das Ouabagenin angeführt werden, in dem Mannich⁴⁾ eine OH-Gruppe an C₁ angenommen hat. Dieser Befund paßt aber nicht recht zu den bekannten

*) Eingegangen am 18. August 1952.

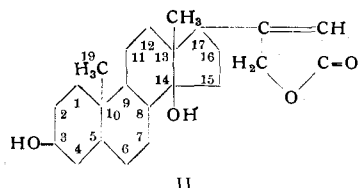
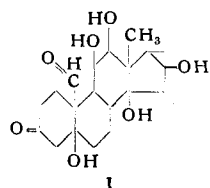
¹⁾ Vgl. L. F. Fieser u. M. Fieser: Natural Products related to Phenanthren. Reinhold Publ. Corp. New York 1949.

²⁾ R. Tschesche, diese Ztschr. 59, 224 [1947]; H. Heusser: Konstit., Konfig. u. Synthese d. digitaloid. Aglykone. Fortschr. d. Chem. org. Naturstoffe Bd. VII, 87 [1950], Springer-Verlag Wien. 7. Reichstein, diese Ztschr. 63, 412 [1951].

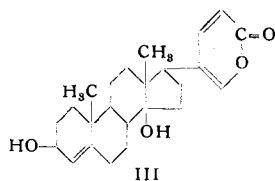
³⁾ Nomenclatur d. Steroide: Helv. Chim. Acta 34, 1680 [1951].

⁴⁾ C. Mannich u. G. Stewert, Ber. dtsch. chem. Ges. 75, 737 [1942].

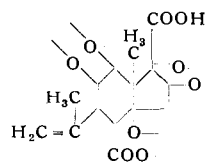
Tatsachen; auch sind die angeführten Beweise nicht vollkommen überzeugend. Jedenfalls lassen sie sich m. E. auch ebenso gut mit einer Verlegung dieser Hydroxyl-Gruppe nach C₁₆ vereinbaren. Wenn man annimmt, daß in dem vorher erwähnten hypothetischen Intermediärprodukt sich überall dort Sauerstoff-Funktionen finden, wo sie überhaupt in den Aglykonen beobachtet worden sind, so ergibt sich für dieses die Formel (I). Über die Natur der Seitenkette an C₁₇ kann hieraus jedoch keine Aussage abgeleitet werden.



II. Digitoxigenin,	OH an C ₃ , C ₁₄	Ring A/B cis,	C/D cis
Uzargenin,	OH an C ₃ , C ₁₄	Ring A/B trans,	C/D cis
Urezigenin ⁵⁾ ,	OH an C ₃ , C ₁₄	Ring A/B trans,	C/D cis
(OH an C ₃ α)			
Xysmalogenin ⁵⁾ ,	OH an C ₃ , C ₁₄	Ring A/B trans,	C/D trans
(OH an C ₃ α)			
Digoxigenin,	OH an C ₃ , C ₁₂ , C ₁₄	Ring A/B cis,	C/D cis
Sarmentogenin,	OH an C ₃ , C ₁₁ , C ₁₄	Ring A/B cis,	C/D cis
Periplogenin,	OH an C ₃ , C ₅ , C ₁₄	Ring A/B cis,	C/D cis
Gitoxigenin,	OH an C ₃ , C ₁₄ , C ₁₆	Ring A/B cis,	C/D cis
Strophanthidol,	OH an C ₃ , C ₅ , C ₁₄ , C ₁₉	Ring A/B cis,	C/D cis
Strophanthidin,	OH an C ₃ , C ₅ , C ₁₄	Ring A/B cis,	C/D cis
Adonitoxigenin ⁶⁾ ,	OH an C ₃ , C ₁₄ , C ₁₆	Ring A/B cis,	C/D cis
	Oxo-Gruppe an C ₁₉		
Ouabagenin,	OH an C ₃ , C ₅ , C ₁₁ ,	Ring A/B cis	C/D cis
C ₁₄ , C ₁₆ (?), C ₁₉			



III. Scillarenin ⁷⁾ ,	OH an C ₃ , C ₁₄ ,		C/D cis
	Doppelbdg. Δ _{4,5}		
Scillarosidin ⁸⁾ ,	OH an C ₃ , C ₁₁ , C ₁₄ ,	Ring A/B cis,	C/D cis
(außerdem CH ₃ CO an OH im Lactonring)			
Hellebrigenin ⁹⁾ ,	OH an C ₃ , C ₅ , C ₁₄ ,	Ring A/B cis,	C/D cis
	Oxo-Gruppe C ₁₉		
Bufalin ¹⁰⁾ ,	OH an C ₃ , C ₁₄	Ring A/B cis,	C/D cis
Telocinobufagin ¹¹⁾ ,	OH an C ₃ , C ₅ , C ₁₄ ,	Ring A/B cis,	C/D cis
Gamabufotalin ¹²⁾ ,	OH an C ₃ , C ₁₁ , C ₁₄ ,	Ring A/B cis,	C/D cis
Bufotalin ¹³⁾ ,	OH an C ₃ , C ₁₄ , C ₁₆ ,	Ring A/B cis,	C/D cis
(enthält COCH ₃ an OH an C ₁₆)			



IV Grundskelett des Picrotoxinins

An Formel I ist zu beachten, daß in ihr die Ringe A und B, wie C und D in cis verknüpft sind. Bei den Aglykonen der Herzgifte und bei den Krötengiften ist als einzigen Steran-Derivaten die cis-Verknüpfung zwischen Ring C

und D die Regel (Ausnahme nur Xysmalogenin⁵⁾). Die Ringe A und B sind bei ihnen ebenfalls mit Ausschluß der Aglykone der Uzarglykoside in cis verbunden^{13a)}. Es scheint daher vertretbar, anzunehmen, daß auch in dem Intermediärprodukt der Biosynthese cis-Verknüpfung der Ringe A und B sowie C und D vorliegt. In den Sterolen ist die Verknüpfung zwischen Ring C und D stets trans, ebenso in den Steroidsapogeninen (Spirostanolen³⁾); in den ersteren ist sie bei Ring A und B ebenfalls trans, soweit keine Doppelbindung von C₅ ausgeht, bei letzteren findet sich sowohl trans wie cis-Anordnung vor.

In dem Intermediärprodukt (I) ist an C₁₉ eine Oxo-Gruppe angenommen worden, da eine solche sich im Strophanthidin und Adonitoxigenin⁶⁾ findet, wahrscheinlich auch im Antiarigenin, doch könnte hier auch eine primäre Hydroxyl-Gruppe wie im Strophanthidol oder Ouabagenin vorhanden sein. An C₃ wird eine Keto-Gruppe für möglich erachtet, die erst in einem späteren Entwicklungsstadium in eine OH-Gruppe übergeht. Bei der Untersuchung der Aglykone der Uzara-Wurzel wurde neben dem schon länger bekannten Uzargenin mit β-ständiger OH-Gruppe an C₃ auch das Isomere mit OH in α-Stellung (Urezigenin) gefunden. Ebenso dürfte Xysmalogenin, das aus der gleichen Pflanze stammt⁵⁾, vielleicht ein 3(α)-Derivat sein. Von dem Sauerstoff-reichen Intermediärprodukt der biochemischen Synthese würden sich die Sauerstoff-ärmeren Aglykone durch ganz oder teilweise Herausnahme der OH- bzw. Oxo-Gruppen an C₅, C₁₁, C₁₂, C₁₆ oder C₁₉ ableiten.

Geht man zu den Aglykonen der Herzgifte mit 24 C-Atomen über, so ändert sich zwar der Aufbau der Seitenkette von einem einfach ungesättigten Fünfring zu einem doppelt ungesättigten Sechsring, die Sauerstoff-Funktionen finden sich aber an den gleichen Stellen in der Molekel vor. Bemerkenswerter Weise verhalten sich die Bufagine der Kröten nicht anders, soweit hier Versuchsmaterial vorliegt (s. Tabelle 3). Scillarenin⁷⁾ hat 2 OH-Gruppen, an C₃ und C₁₄, und eine Doppelbindung von C₅ ausgehend, die vielleicht einer Hydroxyl-Gruppe an dieser Stelle ihre Entstehung verdankt. Scillarosidin⁸⁾ zeigt OH-Gruppen an C₃, C₁₁ und C₁₄. Die Konstitution der Gene der Bovoside aus *Boviea volubilis* H. und *B. kilimandscharica* M., die zur gleichen Gruppe gehören, ist leider noch nicht bekannt^{14, 15, 16)}. Im Hellebrigenin findet sich die Oxo-Gruppe C₁₉ an gleicher Stelle wie im Strophanthidin wieder. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Bufadienolide Sauerstoff-Funktionen an C₃, C₅, C₁₁, C₁₂, C₁₄, C₁₆ und C₁₉ wie die Cardenolide aufweisen. Das dem Digitoxigenin entsprechende Bufalin fanden wir neuerdings auch im Pflanzenreich als Genin des Transvaalins¹⁷⁾ auf, damit wurde das erste Mal ein Bufagin als Aglykon eines pflanzlichen Herzgiftes aufgefunden. Es scheint daher gerechtfertigt, die Cardenolide und Bufadienolide von einer gemeinsamen Grundsubstanz abzuleiten. Die Sterol-Synthese in pflanzlichen und tierischen Organismen kann daher in den ersten Stufen bis zum Intermediärprodukt (I) als gleichlaufend angenommen werden.

Als weitere Stütze dafür, daß die Sexualhormone, Nebennierenrindenhormone und Gallensäuren einen anderen

⁵⁾ R. Tschesche u. K. H. Bradtge, Chem. Ber., im Druck.

⁶⁾ R. Tschesche u. R. Petersen, unveröffentlicht.

⁷⁾ A. Stoll, J. Renz u. A. Brack, Helv. Chim. Acta 34, 2301 [1951].

⁸⁾ A. Stoll u. J. Renz, Helv. Chim. Acta 25, 43, 377 [1942]; A. Stoll, J. Renz u. A. Helfenstein, ebenda 26, 648 [1943].

⁹⁾ J. Schmutz, Pharmac. Acta Helv. 22, 373 [1947]; A. Buzas u. T. Reichstein, Helv. Chim. Acta 31, 110 [1948].

¹⁰⁾ K. Meyer, Helv. Chim. Acta 32, 1239 [1949].

¹¹⁾ K. Meyer, ebenda 32, 1593 [1949].

¹²⁾ K. Meyer, ebenda 32, 1599 [1949].

¹³⁾ K. Meyer, ebenda 32, 1993 [1949].

^{13a)} Über 2 neue Glykoside mit trans-Verknüpfung der Ringe A und B im Aglykon Gofrusid und Frugosid s. A. Hunger u. T. Reichstein, Helv. Chim. Acta 35, 1073 [1952].

¹⁴⁾ A. Katz, ebenda 33, 1420 [1950].

¹⁵⁾ R. Tschesche u. K. Sellhorn, Chem. Ber., im Druck.

¹⁶⁾ Über weitere Verbindungen dieser Gruppe (Nebenglykoside des Scillarens) siehe: A. Stoll u. W. Kreis, Helv. Chim. Acta 34, 1431 [1951].

¹⁷⁾ R. Tschesche u. H. Höttemann, unveröffentlicht.

Entstehungsweg haben als die Cardenolide und Bufadienolide, kann noch angeführt werden, daß in den ersteren bisher niemals eine Hydroxyl-Gruppe an C₅, C₁₄ und C₁₉ gefunden wurde, dafür aber u. U. an C₆, C₇ und C₁₇. An diesen Stellen haben die letzteren stets nur H-Atome.

Was läßt sich zugunsten der Intermediärstufe anführen?

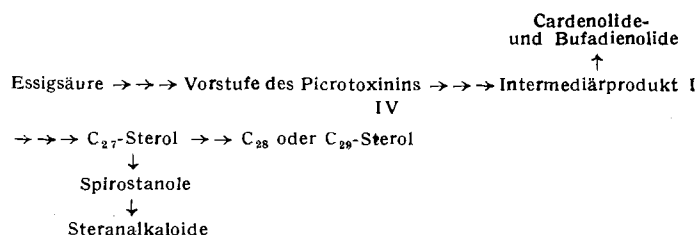
Bei der Konstitutionsermittlung des Bitterstoffes Picrotoxinin stellte neuerdings Conroy¹⁸⁾ für das Grundskelett die Formel IV auf. Die beiden Ringe in ihm sind ebenfalls in cis-Stellung verbunden und Conroy diskutiert die Frage, ob es sich hierbei um einen Baustein der Sterol-Synthese handelt oder die Verbindung durch Abbau von Abkömmlingen dieser Stoffklasse entstanden ist. An Picrotoxinin ist außer der cis-Verknüpfung der Ringe besonders auffallend, daß sich die Sauerstoff-Funktionen fast überall in den gleichen Positionen finden, wie sie für das Intermediärprodukt (I) abgeleitet wurden. Ich möchte daher vermuten, daß Picrotoxinin eher von dem Wege der Sterol-Synthese abgezweigt ist, als ein Abbauprodukt darstellt, obwohl Conroy das letztere anzunehmen geneigt scheint.

Wir haben weiter in Herzgifte führenden Pflanzen nach Zwischenstufen gesucht, die geeignet sind, die vorgetragene Auffassung zu stützen. Dabei sollten solche besonderen Aufschluß geben können, in deren Glykosiden die trans-Verknüpfung der Ringe A und B feststellbar ist wie in den Sterolen, soweit letztere ohne Doppelbindung an C₅ sind. Wir fanden unter den Geninen der Uzara-Wurzel neben dem Uzarigenin mit β -Stellung der OH-Gruppe an C₃ das Aglykon Urezigenin des Glykosids Urezin mit α -Stellung der gleichen Gruppe. Es ergibt sich hieraus die Vermutung, daß an C₃ einmal eine Keto-Gruppe vorhanden war. Dieselbe α -ständige OH-Gruppe findet sich auch im Xysmalogenin, einem anderen Nebenaglykon der Wurzel wieder, in dem interessanterweise nunmehr auch die Ringe C und D in trans-Stellung erscheinen. Jedenfalls lassen sich die experimentellen Befunde damit am besten deuten. Dagegen konnte bisher nicht das vierte mögliche Isomere entdeckt werden, das bei β -ständiger OH-Gruppe an C₃ trans-Verknüpfung der Ringe C und D aufweist. Man ist geneigt, zu vermuten, daß es bzw. seine Vorstufe weiter im Sinne der Sterol-Synthese verbraucht wird.

Auffällig ist, daß alle Steran-Derivate, die für den Aufbau zu Sterolen in Betracht kommen, eine Hydroxyl-Gruppe an C₃ haben. Diese findet sich in den Sterolen in β -Stellung wieder und wird auf dem biochemischen Syntheseweg nicht herausreduziert. Als Grund für ihr Erhaltenbleiben kann der Schutz durch Glykosidierung angeführt werden. Bekanntlich kommen in den Herzgiftglykosiden eine Reihe von ungewöhnlichen Zuckern als Glykosid-Partner vor; es seien erwähnt: Digitoxose, Cymarose, Oleandrose, Sarmenose, Digitalose, Thevetose u. a. Es erhebt sich die Frage, ob diese Zucker sofort in die Aglykone eingeführt werden oder aber ob Glucose-Derivate als Zwischenstufen auftreten. Wir haben zur Prüfung dieser Möglichkeit die Nebenglykoside von *Digitalis lanata* näher untersucht¹⁹⁾ und haben dabei ein Glykosid Gitorin aufgefunden, das nur Glucose gebunden an Gitorigenin enthält. Während sonst die Glykoside dieser Pflanze Digitoxose oder Digitalose direkt an das Aglykon geknüpft enthalten und weiterhin auch endständig noch Glucose, ist im Gitorin nur ein Zucker vorhanden. Vielleicht darf man

vermuten, daß die spezifischen Glykoside dieser Pflanze, Lanataglykosid A, B und C sowie 16-Acetyl-digitalinum verum¹⁸⁾ über Monoglucose-Derivate entstehen, in denen später ein Austausch der Glucose gegen die anderen genannten Zucker eintritt. Mit dieser Vorstellung stimmt überein, daß in den Sterolglykosiden (Phytosterolinen) aus Pflanzen im allgemeinen Glucose als Glykosid-Partner gefunden wurde. Bemerkenswerterweise findet sich in den Uzaraglykosiden, bei denen schon ein weiterer chemischer Umbau im Aglykon zu den Sterolen hin eingetreten ist, ebenfalls Glucose in den Molekeln vor.

Für die Sterol-Synthese in Pflanzen und vielleicht auch in tierischen Organismen läßt sich somit folgender Weg diskutieren:



Spirostanole und ihre Stellung im biochemischen Syntheseweg der Sterole

In dem obigen Schema sind die Steroidsapogenine (Spirostanole) (V, Beispiel Tigogenin) als ein Seitenweg von einem hypothetischen C₂₇-Sterol aufgeführt worden. Während die pflanzlichen Sterole im Gegensatz zum Cholesterin (C₂₇H₄₆O) 28 oder 29 C-Atome in der Molekel enthalten, bauen sich die Spirostanole nur aus 27 C-Atomen auf. Das eine oder die zwei zusätzlichen C-Atome in ihnen sind als CH₃- oder C₂H₅-Gruppe an C₂₄ gebunden. Es scheint nicht unwahrscheinlich, daß daher auch ein C₂₇-Sterol die Vorstufe der C₂₈- und C₂₉-Sterole ist (VI, Beispiel Stigmasterol), indem eine Methyl- oder Äthyl-Gruppe später in dieses eingeführt wird²⁰⁾. Damit soll nicht behauptet werden, daß das C₂₇-Sterol mit Cholesterin identisch ist. In der Hefe wurde neben den C₂₈-Sterolen Ergosterol, Ascosterol, Fäcosterol, Episterol und Fungisterol auch das C₂₇-Sterol Zymosterol gefunden¹⁾. In tierischen Organismen bleibt jedoch die Sterol-Synthese auf der Stufe des Cholesterols stehen. Von einem ähnlichen C₂₇-Sterol leiten sich wahrscheinlich die Spirostanole ab, und zwar derart, daß weiterer Sauerstoff in die Molekel oxydativ eingeführt wird. Außer den beiden Sauerstoff-Atomen, die die Cyclohalbacetal-Gruppierung in der Seitenkette bilden, finden sich Sauerstoff-Funktionen u. U. an C₂, C₃, C₆, C₁₂ und C₁₅ (?). Trotz der ca. 20 bekannten Vertreter dieser Stoffklasse ist bei keinem bisher eine OH-Gruppe an C₅, C₁₄ oder C₁₉ beobachtet worden. Dagegen finden sich solche an C₂, C₆ und u. U. an C₁₅ (?), also an Stellen, bei denen die Cardenolide oder Bufadienolide niemals eine Sauerstoff-Funktion aufwiesen. Es scheint daher wenig wahrscheinlich, daß die Spirostanole Zwischenstufe von dem Intermediärprodukt (I) zu dem C₂₇-Sterol sind. Übereinstimmend hiermit wurde bisher niemals eine cis-Verknüpfung der Ringe C und D beobachtet²¹⁾. Es

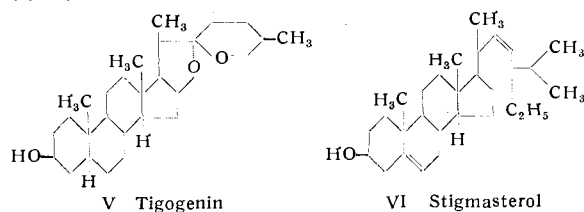
²⁰⁾ Diese Gruppierung kann sterisch in verschiedener Weise angeordnet sein, entweder in der a- oder b-Form¹⁾, diese Feststellung steht mit einer nachträglichen Einführung in ein C₂₇-Sterol nicht in Widerspruch.

²¹⁾ In diesem Zusammenhang ist auch noch die Tatsache bedeutungsvoll, daß die Zucker in den Steroidsaponinen im allgemeinen andere als in den pflanzlichen Herzgiften sind. Desoxyzucker wurden bisher in keinem Falle beobachtet, und neben Glucose und Rhamnose treten auch Xylose und Galactose auf, die in der Chemie der Herzglykoside bisher nicht gefunden wurden.

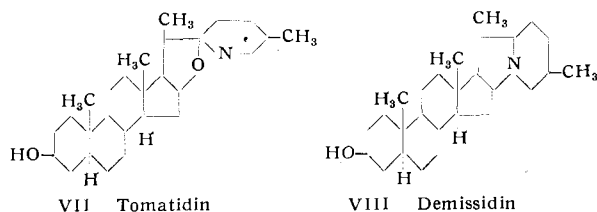
¹⁸⁾ H. Conroy, J. Amer. Chem. Soc. 74, 3046 [1952].

¹⁹⁾ R. Tschesche, G. Grimmer u. F. Neuwald, Chem. Ber., im Druck.

scheint daher gerechtfertigt, die Steroidsapogenine als einen Seitenweg von dem angenommenen C₂₇-Sterol aufzufassen.

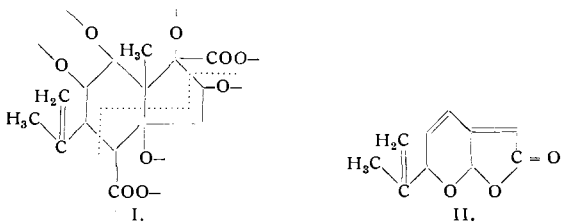


Die Steran-alkaloide stellen ihrem Aufbau nach zweifellos Umwandlungsprodukte der Spirostanole dar, soweit sie 27 C-Atome in der Molekel enthalten. Durch Einbau von Stickstoff in die Acetal-Gruppierung der Seitenkette lassen sie sich unschwer von diesen ableiten (Beispiel: Tomatidin (VII) und Demissidin (VIII²²)).



II. Mitteilung**)

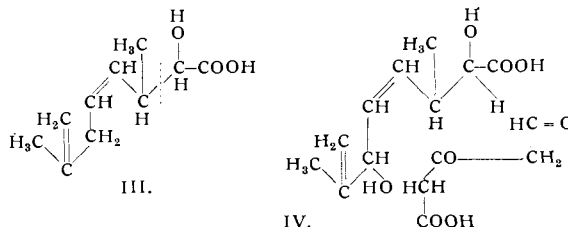
In der ersten Mitteilung zu diesem Thema haben wir von uns aus den Kenntnissen über Cardenolide, Bufadienolide und Spirostanole einige allgemeine Schlüsse zum Syntheseweg der Steroide gezogen. Es hatte sich dabei ergeben, daß das Grundskelett des Bitterstoffes Picrotoxinin (I) sehr wahrscheinlich einer Vorstufe nahe steht, die auf dem Wege dieser Synthese liegt. Inzwischen gelang es dem einen von uns (Korte²³) im Mesogentiogenin, dem Aglykon des Bitterstoffes Gentiopicroin, eine Verbindung zu finden, die geeignet erscheint, weiteres Licht in die Art des Aufbaus der Steroide zu bringen. Für diesen Stoff ist die Konstitution II sehr wahrscheinlich.



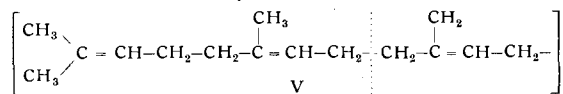
C₁₀-Verbindung als Baustein des Mesogentiogenins und Picrotoxinins, sowie der Steroide

Betrachtet man die Formeln I und II, so sieht man, daß man das Kohlenstoff-Skelett des Mesogentiogenins im Picrotoxinin unterbringen kann, wenn man 5 C-Atome wegläßt, die unterhalb der gestrichelten Linie im Formelbild des letzteren sich finden. In beiden Molekeln steht die Carboxyl-Gruppe, die Isopropyliden-Gruppe und die Verzweigung am β-C-Atom an der gleichen Stelle. Während im Picrotoxinin diese Seitenkette eine CH₃-Gruppe darstellt, ist sie im Mesogentiogenin in eine Aldehyd-Gruppe verwandelt, die in der hydratisierten Form einmal an einem Lacton-Ring, das andere Mal an einem Pyran-Ring beteiligt ist. An dem Ort der Doppelbindung im Pyran-Ring des Mesogentiogenins finden sich im Picrotoxinin

zwei OH-Gruppen in Glykol-Stellung vor. Dies läßt den Schluß zu, daß eine Verbindung vom Typ III Vorstufe zum Aufbau beider Bitterstoffe sein kann. Im Picrotoxinin könnte diese nach Einführung einer weiteren OH-Gruppe in ε-Stellung zum Carboxyl mit einer Kohlenstoff-Kette von 5 C-Atomen so kondensiert sein, daß das Grundskelett des Picrotoxinins sich ergibt. Formal ließe sich dieser Vorgang etwa analog IV darstellen.



Muten diese Überlegungen zunächst vielleicht spekulativ an, so erlangen sie sofort stärkere Bedeutung, wenn man sie mit Ergebnissen in Zusammenhang setzt, die Langdan und Bloch²⁴) mit Hilfe radioaktiver Essigsäure und radioaktiven Squalens hinsichtlich der Sterol-Synthese gewannen. Sie fanden, daß bei Mäusen Squalen 10–20 mal wirksamer als Acetat ist und über 3 mal aktiver als Isovaleriansäure, die bisher als beste Vorstufe dieser biochemischen Synthese bekannt war.



Stellt man die Molekel des Squalens sich an den punktierten Linien oxydiert und gleichzeitig die eine Doppelbindung der linken Teilstücke an das Ende der Kette verschoben vor, so erhält man zwei Mol einer Säure mit dem Kohlenstoffgerüst der Säure III aus einer Molekel Squalen. Es bedarf nur noch der Einführung einer Doppelbindung in γ,δ-Stellung zur Carboxyl-Gruppe und einer Hydratisierung der zu COOH benachbarten Doppelbindung, um die C₁₀-Säure III zu haben. Zur Kondensation analog IV müßte dann in diese noch eine weitere OH-Gruppe in ε-Stellung eingebaut werden. Es scheint somit recht wahrscheinlich, daß eine Verbindung mit einem Kohlenstoff-Skelett analog III als Zwischenstufe der Steroid-Synthese eine Rolle spielt. Man könnte hiergegen noch einwenden, daß für unsere Überlegungen Befunde aus dem Tier- und Pflanzenreich zugleich herangezogen wurden, es sei daher hier nochmals auf eine Folgerung in der ersten Arbeit zu diesem Thema hingewiesen. Es war festgestellt worden, daß die Steroid-Synthese in beiden Reichen bis zum Aufbau des Vierringsystems im wesentlichen gleichlaufend sein muß. Ob Squalen unbedingt eine Vorstufe des Cholesterols im Tierreich ist, erscheint uns nicht sicher, bei Pflanzen wird der Aufbau der C₁₀-Säure sicherlich direkt ablaufen.

Wenn man das Formelbild des Picrotoxinins betrachtet, so läßt es sich leicht durch weitere 5 C-Atome in gerader Kette zum Vierringsystem der Steroide ergänzen, worauf schon Conroy²⁵) hingewiesen hat. Man könnte sich vorstellen, daß eine Verbindung analog VI sich mit Acetylacetoncarbonsäure VII oder einer ähnlichen Verbindung unter CO₂-Verlust kondensiert²⁶). Letztere Säure kann als zellmöglich angesehen werden. Es würde sich so eine Substanz mit der Konstitution ähnlich VIII ergeben, die eine

²²) R. Kuhn, I. Löw u. H. Trischmann, diese Ztschr. 64, 397 [1952].

²³*) Eingegangen am 19. September 1952.

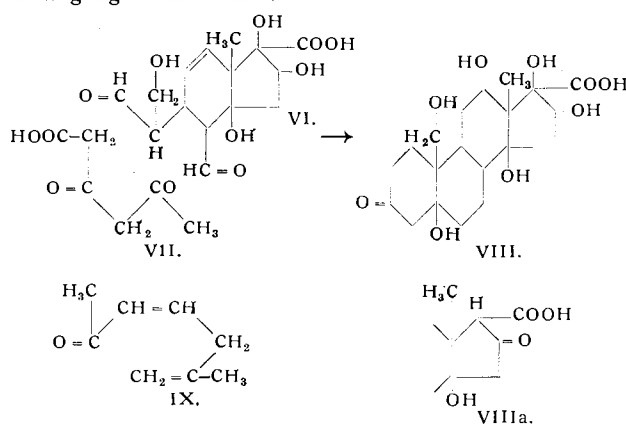
²⁴) F. Korte, unveröffentlicht.

²⁵) R. G. Langdan u. K. Bloch, J. Amer. Chem. Soc. 74, 1869 [1952] (s. a. diese Ztschr. 64, 374 [1952]).

²⁶) H. Conroy, J. Amer. Chem. Soc. 74, 3046 [1952].

²⁷) In diesem Zusammenhang ist bedeutungsvoll, daß Acetessigsäure ein besseres Ausgangsmaterial als Essigsäure hinsichtlich der Cholesterol-Bildung darstellt.

Reihe von Forderungen erfüllt, die in der I. Mitteilung für das sog. Intermediärprodukt der biochemischen Synthese erhoben wurden. In ihm finden sich die Oxo-Gruppe an C₃, ferner die OH-Gruppen an C₅, C₁₄ und C₁₉ (hier möglicherweise auch eine Aldehyd-Gruppe) wieder. Wenn an die Doppelbindung C₁₁—C₁₂ Wasser angelagert wird, so könnte je nach der Art, wie dieser Vorgang abläuft, entweder an C₁₁ oder C₁₂ eine OH-Gruppe erscheinen. Ferner würde dieses Zwischenprodukt OH-Gruppen an C₁₆ und C₁₇ enthalten sowie eine Carboxyl-Gruppe C₂₀. Weiter muß die Kondensation der Teilstücke VI und VII so geschehen, daß im Endeffekt keine Sauerstoff-Funktion an C₁ und C₇ verbleibt. Es ist natürlich durchaus möglich, daß in der Verbindung VI an C₁, C₁₀, C₁₉ und u. U. an C₇ (Bezeichnung wie im Steran-Ringsystem) andere Oxydationsstufen vorliegen, die zum Ringschluß in Bezug auf Ring A und B führen, doch erscheint es vorerst müßig, darüber Erwägungen anzustellen.



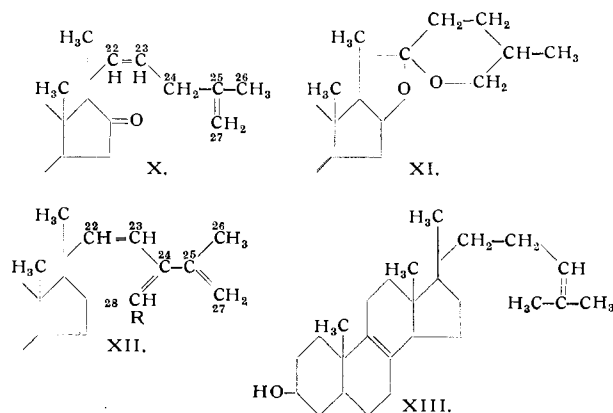
Angliederung der verschiedenen Seitenketten an C₁₇

Aus VIII könnte durch Wasserabspaltung an C₁₆ und C₁₇ leicht eine β -Ketosäure (VIIIa) entstehen, die chemisch einer Kondensation mit reaktionsfähigen Molekeln an C₁₇ unter CO₂-Verlust fähig erscheint. So könnte mit einem geeigneten Fünfringlacton-Derivat die Seitenkette der Cardenolide, mit einem Sechsringlacton-Derivat die Bufadienolide und mit einem C₆-Keton der Typ des Cholesterols und der Spirostanole entstehen. Zu diesem letzteren Problem lassen sich noch einige bemerkenswerte Ausführungen machen.

Als geeignetes Keton zur Herstellung der Seitenkette des Cholesterols kann die Verbindung IX gelten, die sich aus III durch Wegnahme der beiden C-Atome rechts der Methyl-Verzweigung und unter Ausbildung einer Keto-Gruppe ableiten läßt. Es scheint sogar denkbar, daß dieses Keton biochemisch eine Vorstufe von III ist. Es läßt sich im übrigen durch die schon erwähnte Verlagerung der Doppelbindung auch aus Squalen ableiten. Nun ist besonders auffällig, daß sich damit die Bildung der Seitenkette der Spirostanole und aller bekannten Sterole unschwer ableiten läßt.

Denkt man sich in eine Verbindung analog X an die Doppelbindung C₂₂—C₂₃ Wasser unter Ausbildung einer OH-Gruppe an C₂₂ angelagert sowie den gleichen Vorgang an der Doppelbindung C₂₅—C₂₇ mit Herstellung einer OH-Gruppe an C₂₇ wiederholt, so läßt sich sofort die Seitenkette der Spirostanole herstellen. Es bedarf nur noch einer Oxydoreduktion von Ketogruppe an C₁₆ und OH-Gruppe an C₂₂ mit nachfolgender Wasserabspaltung, um das charakteristische Formelbild der Spirostanole XI entstehen zu lassen. Eine Wasserstoff-Anlagerung an beide Doppelbindungen in X liefert die Seitenkette des Cholesterols.

Andererseits könnte die Verbindung VIII durch Decarboxylierung an C₁₇ und Herausnahme des Sauerstoffs an C₅, C₁₄, C₁₉ bzw. C₁₁ oder C₁₂ leicht in Derivate der Steroidhormone übergehen, wobei auch an eine Angliederung von 2 C-Atomen an C₁₇ zum Typ des Progesterons und der Nebennierenrindenhormone zu denken ist²⁷⁾. Neuere Arbeiten von Zaffaroni und Mitarb.²⁸⁾ und Brady²⁹⁾ machen es wahrscheinlich, daß ein Intermediärprodukt zwischen Essigsäure und Cholesterol für die Entstehung des Testosterons verantwortlich ist, so daß diese Hormone nicht Abbauprodukte des Cholesterols sind, wie bisher mitunter angenommen worden ist³⁰⁾.



Aufbau der Seitenkette der Sterole im Pflanzenreich

In der I. Mitteilung zu diesem Thema war darauf hingewiesen worden, daß die pflanzlichen Sterole mit 28 oder 29 C-Atomen als Vorstufe ein C₂₇-Sterol haben müssen. Betrachtet man das Formelbild X, so kann die Ausbildung einer CH₃- oder C₂H₅-Gruppe an C₂₄ durch Kondensation von Formaldehyd oder Acetaldehyd bzw. deren Derivaten mit der von zwei Doppelbindungen eingeschlossenen CH₂-Gruppe erfolgen. Es würde dann eine Verbindung XII gebildet werden, aus der sich durch Hydrierung alle bekannten Typen von Sterolen in der Seitenkette unschwer ableiten lassen. Durch Absättigung aller Doppelbindungen in der Seitenkette würden je nach Substitution an C₂₄ und im Ringsystem entstehen: Campesterol, β - und γ -Sitosterol, α -Stellasterol und Clionasterol. Durch Hydrierung der Doppelbindungen C₂₅—C₂₇ und C₂₄—C₂₈ ergäben sich Ergosterol, Brassicasterol, α -Spinasterol, Porriasterol und Neospongosterol. Dabei läßt sich ferner noch erklären, daß je nach der Art der Wasserstoff-Anlagerung an C₂₄—C₂₈ die sterisch unterschiedliche Angliederung der Seitenkette an C₂₄ in der a- oder b-Form möglich ist. Im Hefesterol Fäcosterol, vermutlich auch im Episterol, sowie im Fucosterol sind die beiden anderen Doppelbindungen abgesättigt und nur noch die von C₂₄ nach C₂₈ erhalten geblieben. Die Doppelbindung C₂₃—C₂₄ im Ascosterol könnte entweder durch 1,4-Addition des Wasserstoffs oder durch spätere Verlagerung der Doppelbindung C₂₂—C₂₃ oder C₂₄—C₂₈ an diese Stelle gedeutet werden³¹⁾.

Eine wichtige Erklärung erlaubt auch noch die Konstitution des Zymosterols (XIII), das im Gegensatz zu

²⁷⁾ Das Intermediärprodukt VIII ist nach seinem Aufbau geeignet, die Aromatisierung des Ringes A im weiblichen Sexualhormon Östron unschwer verstehen zu lassen. Es bedarf nur einer Wasserabspaltung an C₃ und einer Formaldehyd-Abtrennung an C₁₀, wenn C₁₉ als Aldehydgruppe vorliegt, um eine phenolische Hydroxylgruppe an C₃ auszubilden.

²⁸⁾ A. Zaffaroni, O. Hechter u. G. Pincois: refer. von L. T. Samuels u. H. Reich in Ann. Rev. Biochem. 21, 159 [1952].

²⁹⁾ R. O. Brady: dgl. wie ⁵⁾.

³⁰⁾ Bei der Umkehrbarkeit biochemischer Prozesse wäre eine Entstehung dieser Steranderivate sowohl auf dem hier diskutierten Synthesewege als auch durch Abbau von Cholesterol her denkbar.

³¹⁾ Vgl. F. Fieser u. M. Fieser: Natural Products related to Phenanthrene. Reinhold Publish. Corp. New York [1949].

den anderen Hefesterolen 27 C-Atome enthält. Bei ihm ist die Kondensation an C₂₄ nicht eingetreten. Man kann dies so erklären, daß in ihm durch Wanderung der Doppelbindung C₂₂—C₂₃ in Konjugation zu der in C₂₅—C₂₇, die zur Kondensation an C₂₄ notwendige CH₂-Gruppe verschwand, so daß das Zymosterol im Gegensatz zu allen anderen Hefesterolen auf der C₂₇-Stufe verbleibt. Durch Hydrierung in 1,4-Stellung oder durch nachträgliche Verschiebung einer bei der biochemischen Hydrierung verbleibenden Doppelbindung nach C₂₄—C₂₅ könnte so die Seitenkette des Zymosterols gebildet werden. Für das tierische Cholesterol dürfte entweder der Mangel an geeigneten C₇- oder C₂-Partnern in der Zelle oder eine zu schnelle Absättigung der Doppelbindungen die Ursache sein, daß in ihm die Seitenkette nicht weiter substituiert wird.

Schlußbemerkung

Die letzten Jahrzehnte haben auf dem Steroidgebiet eine Fülle von neuen Erkenntnissen und Entdeckungen gebracht, und das Tatsachenmaterial wird sich, vermutlich

vornehmlich aus dem Pflanzenreich, in den nächsten Jahren noch weiter vermehren. Es wird sich zeigen, wie weit die hier gezogenen Folgerungen eine Grundlage zur Klärung des biochemischen Syntheseweges der Sterole sein werden. Es wurde versucht, die bisherigen Ergebnisse unter dem übergeordneten Gesichtspunkt dieser Synthese zu ordnen und so Anregungen zu geben, sich mit diesem Gebiet durch weitere Versuche zu befassen.

Daß es möglich war, schon so weitgehende Folgerungen zum Syntheseweg der Steroide zu ziehen, wurde einmal durch das große Tatsachenmaterial auf dem Gebiet der Cardenolide und Bufadienolide erreicht, das vor allem durch *T. Reichstein* in den letzten Jahren angesammelt worden ist, sowie bei den Spirostanolen durch *R. E. Marker*. Dann aber war es die glückliche Auffindung des Mesogentiogins und Picrotoxinins mit ihrer Konstitution, die sehr befruchtend auf die Bemühungen zur Klärung des biochemischen Syntheseweges der Steroide wirken.

[A 465/456]

Die Anwendung von radioaktiven und stabilen Isotopen in der pharmakologischen Forschung

Von Dr. MAX FRIMMER, Mainz

Aus dem Max-Planck-Institut für Chemie

Die große Anzahl der heute verfügbaren Isotopen gestattet, zusammen mit neuen Untersuchungen, Trennungs- und Meßverfahren Umsetzung und Verbleib von zahlreichen Pharmazeutika im Körper messend zu verfolgen. Aus analytischen Gründen bisher oft überhöhte, unphysiologische Dosen sind nicht erforderlich. Damit ergeben sich neue Ergebnisse über Wirkungsort, Wirkungsweise, den Verbleib der Abbauprodukte usw. Da die Literatur des Gebietes schon sehr umfangreich ist, sei hier versucht, einen Einblick in die prinzipiellen Möglichkeiten zu geben.

Einleitung

Die Indikatormethoden bedeuten für fast alle Zweige der experimentellen Medizin und Biologie eine wesentliche Bereicherung der methodischen Möglichkeiten. Dies gilt besonders für die Biochemie und Pharmakologie. Der quantitative Nachweis von Substanzen geringer Konzentration stellt hier häufig Probleme, die entweder nur mit erheblichem Arbeitsaufwand oder unter Benutzung biologischer Testverfahren, nicht selten aber unzureichend oder gar nicht gelöst werden können. Oft hilft man sich dadurch, daß man die betr. Stoffe in unphysiologisch hohen oder therapeutisch ungebräuchlichen Konzentrationen anbietet. Dieses Zugeständnis auf Kosten der physiologischen bzw. normalen therapeutischen Verhältnisse muß zwangsweise zu Trugschlüssen führen. Viele dieser Fehlermöglichkeiten werden durch Markierung der betreffenden Substanzen mit radioaktiven Isotopen vermieden. Es sollen hier eine Reihe von Beispielen aus der Pharmakologie aufgeführt werden, welche die genannten Vorteile der Indikatormethode veranschaulichen.

Urethan

1946 wurde die Urethan-Therapie der Leukämien und malignen Lymphdrüsentumoren bekannt¹⁾. Das Fehlen analytisch leicht erfaßbarer Gruppen in der Molekel des Äthylurethans ließ eine Mikrobestimmung mit hinreichender Genauigkeit und Spezifität nicht zu. Die einzige brauchbare Methode war die Verseifung des Urethans

und Bestimmung des Alkohols²⁾. Um einigermaßen reproduzierbare Analysenergebnisse zu erhalten, mußte man beispielsweise Mäusen 1400 mg/kg injizieren, während die therapeutische Dosis beim Menschen etwa bei 15 mg/kg liegt. Von einer exakten analytischen Erfassung in Organen oder Exkrementen konnte bei dieser Methode keine Rede sein. Da ein Abbau des Urethans vermutlich zu körpereigenen Stoffwechselprodukten führen mußte, war die Verfolgung der Substanz im Organismus unmöglich. Diese Schwierigkeiten konnten durch Markierung des Äthylurethans mit ¹⁴C an der Carbaminsäure-Komponente umgangen werden³⁾. Es zeigte sich, daß nahezu das ganze ¹⁴C innerhalb 24 h nach der Injektion als ¹⁴CO₂ ausgeatmet wurde.

Ein besonderer Vorzug der radioaktiven Markierung liegt darin, daß das markierte Atom an verschiedenen Stellen einer Molekel eingebaut werden kann. Im Falle des Urethans kam also nicht nur eine Carbonyl-Markierung in Frage, sondern auch eine solche am Alkohol⁴⁾. Die Versuche ergaben, daß das Äthylurethan in vivo vermutlich zu CO₂, Äthylalkohol und Ammoniak hydrolysiert wird. Alle drei Komponenten kommen im Organismus schon physiologisch vor und könnten also in der vorliegenden Größenordnung chemisch-analytisch nicht erfaßt werden. ¹⁴C aber, das aus dem Abbau einer organischen Verbindung stammt, ist als ¹⁴CO₂ in der Atemluft nachzuweisen.

²⁾ H. E. Ascher, L. Campman, E. Rhoden u. F. L. Warren, Biochemic. J. 42, 58 [1948].

³⁾ C. E. Bryan, H. E. Skipper u. L. White jun., J. biol. Chemistry 177, 941 [1949].

⁴⁾ H. E. Skipper, L. L. Bennet, C. E. Bryan, L. White jr., M. A. Newton u. L. Simpson, Cancer Res. 11, 46 [1951].

¹⁾ Paterson, Haddow, Thomas u. Watkinson, Lancet 1946, 677.