

Milchsäure Rot- bis Blaurot-Färbung ergibt, während Glykolsäure keine Färbung zeigt. Auf Glykolsäure ist ebenfalls nach *Eegriwe*¹⁰⁾ mit 2,7-Dioxy-naphthalin und 85proz. Schwefelsäure mit 20 min Erhitzen im Wasserbad zu prüfen. Sie gibt hierbei Violett- bis Violetrot-Färbung, während Milchsäure Schwarzbraun-Färbung erzeugt. Die Färbung durch Glykolsäure ist aber so intensiv, daß sie auch neben Milchsäure erkannt wird. Zur quantitativen Bestimmung von Glykol- und Milchsäure nebeneinander kann man sich der bereits geschilderten Oxydation mit Chromschwefelsäure bedienen, bei der nur Milchsäure Essigsäure bildet. Aus der Menge des zur Oxydation verbrauchten Sauerstoffs und der durch Oxydation entstandenen Essigsäure sind dann beide zu berechnen.

Die flüchtigen Fettsäuren aus den Estern sind in der Laugevorlage enthalten. Man destilliert sie mit Phosphorsäure und o-Dichlorbenzol, trennt das wässrige Destillat vom o-Dichlorbenzol ab und bindet die darin enthaltenen freien Fettsäuren mit Bariumcarbonat. Das ungelöst gebliebene Bariumcarbonat wägt man zurück und berechnet aus dem gelösten Bariumcarbonat-Anteil den Gehalt an Fettsäuren. Die im Filtrat gelösten Bariumsalze der Fettsäuren dampft man zur Trockne und bestimmt in einem Teil des Trockenrückstands durch Abrauchen mit Schwefelsäure den Barium-Gehalt. Aus ihm ist zu entnehmen, welche Fettsäure oder ob ein Gemisch mehrerer Fettsäuren vorliegt.

Ba-formiat	60,4 % Ba	Ba-acetat	53,8 % Ba
Ba-propionat	48,5 % Ba	Ba-butycat	44,1 % Ba

Im letzteren Fall trennt man durch mehrfaches Auskochen mit absolutem Alkohol, in dem die Bariumsalze der Ameisen- und Essigsäure unlöslich, die der höheren Fettsäuren löslich sind. Im löslichen Teil bestimmt man wieder den Barium-Gehalt und kann heraus auf Propion- oder Buttersäure oder ein Gemisch beider schließen. Den unlöslichen Teil destilliert man erneut mit Phosphorsäure und o-Dichlorbenzol, neutralisiert das Destillat ohne Indikatorzusatz mit Natronlauge fast völlig und dampft es ab. Einen Tropfen der eingedampften Lösung prüft man unter dem Mikroskop mit einem Kristall Cer(III)-nitrat. Ist Ameisensäure vorhanden, so bilden sich farblose Pentagondodekaeder, die sich nach und nach zu Kugeln vergrößern. Einen weiteren Tropfen prüft man mit Uranylformiat-Lösung, wobei sich farblose Tetraeder bilden, wenn Essigsäure vorliegt.

Äther

Von den Äthern (Tabelle 5) kommen technisch neben den bereits erwähnten Glykol-monoalkyläthern nur wenige Vertreter in Frage. Infolge ihrer chemischen Indifferenz gegenüber verseifenden, acylierenden oder oximie-

¹⁰⁾ Ebenda 89, 123 [1932].

Zuschriften

Zum biochemischen Syntheseweg der Steroide

Bemerkungen zum Aufsatz „Zur Eogenese der Steroide“ von A. Mondon¹⁾

Von Prof. Dr. R. TSCHESCHE und Dr. F. KORTE
Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts
der Universität Hamburg

A. Mondon¹⁾ hat in dieser Zeitschrift auf Grund rein theoretischer Erwägungen ein „Isosqualen“ als Cholesterin-Vorstufe postuliert. Diese bisher nicht in der Natur gefundene Verbindung soll zum Lanosterol cyclisiert werden, aus dem durch Oxydation von drei gegenüber Cholesterin überzähligen Methyl-Gruppen, Decarboxylierung und Umlagerung dieses Sterol entstehen soll.

¹⁾ A. Mondon, diese Ztschr. 65, 333 [1953].

renden Reagenzien kann man sie im wesentlichen nur aus ihren physikalischen Konstanten identifizieren, ist also auf ihre Isolierung angewiesen. Beim Diäthyläther ist dies

Äther:	Kp	D ₂₀	n _D ²⁰
Diäthyläther	35 °C	0,714	1,353
Tetrahydrofuran	67 °C	0,887	1,407
Dioxan	101 °C	1,030	1,423
<i>N-haltige Lösungsmittel:</i>			
Acetonitril	82 °C	0,783	1,344
Dimethylcyanamid	163 °C		
Diäthylcyanamid	187 °C	0,872	1,422

Tabelle 5

wegen des niedrigen Siedepunktes durch Destillation ziemlich einfach und annähernd quantitativ möglich. Zur Abtrennung von Tetrahydrofuran und Dioxan kann man sich deren Wasserlöslichkeit zunutze machen. Aus der wässrigen Lösung salzt man sie mit Kaliumcarbonat wieder aus und trennt sie durch Fraktionierung. Für Dioxan hat Weber auch eine Farbreaktion angegeben: Wird die 100 °C-Fraktion mit 2,7-Dioxynaphthalin und 25proz. Salzsäure gekocht, so entsteht bei Dioxan-Gegenwart rot- bis rosa-braune Fällung mit grüner Fluoreszenz. Beim anschließenden Schütteln mit Nitrobenzol färbt sich dieses rot.

Stickstoff-haltige Verbindungen

Schließlich werden in neuerer Zeit noch einige Stickstoff-haltige Verbindungen als Lösungsmittel verwendet: Acetonitril und Dialkylcyanamide. Letztere sind an ihrem widerlichen (fauligen) Geruch kenntlich. Identifizieren lassen sie sich aus ihren Hydrolyseprodukten. Acetonitril gibt Essigsäure und Ammoniak, die Dialkylcyanamide: Kohlensäure, Ammoniak und Dialkylamin. Man hydrolysiert zweckmäßig durch Erhitzen mit verd. Salzsäure im Druckrohr, destilliert aus der Lösung mit Wasserdampf die Essigsäure über und identifiziert sie im Destillat. Den Destillationsrückstand übersättigt man mit Lauge und destilliert Ammoniak und Dialkylamin in vorgelegte Säure. Deren Rücktitration ergibt die Summe von Ammoniak und Dialkylamin. Dann dampft man die Lösung zur Trockne und bestimmt im Trockenrückstand den Kohlenstoff, woran zu erkennen ist, ob nur Ammoniak oder auch Dialkylamin als Spaltstück entstanden ist.

Nach der Untersuchung eines Lösungsmittelgemisches wird eine Kontrolle erwünscht sein. Sie kann darin bestehen, daß man ein Lösungsmittelgemisch gemäß dem Befund zusammenstellt und seine Eigenschaften, insonderheit seine Siedekurve, mit den entsprechenden Daten des Untersuchungsobjekts vergleicht.

Eingeg. am 8. September 1953 [A 529]

Mondon gibt für das „Isosqualen“ eine Verteilung von C aus Methyl und von C aus Carboxyl der Essigsäure an, die nicht übereinstimmt mit der neuen Feststellung von Woodward und Bloch²⁾, wonach das C-Atom 13 der Steroide aus einem Methyl und nicht aus dem Carboxyl stammt. Da bei der Cyclisierung einer Kette von 30 C-Atomen mit den bekannten Verzweigungen die Herkunftszuordnung der C-Atome ziemlich eindeutig festgelegt ist, dürfte damit der Hypothese von Mondon allein aus diesem Grunde wenig Raum bleiben.

Diese Schwierigkeit haben Woodward und Bloch²⁾ dadurch umgangen, daß sie von vornherein das Squalen selbst als Vorstufe diskutieren; es ist dann die Wanderung einer Methyl-Gruppe, des späteren C-Atoms 18, bei der Cyclisierung notwendig. Nur dann

²⁾ R. B. Woodward u. K. Bloch, J. Amer. Chem. Soc. 75, 2023 [1953].

ist es möglich, den Befunden der Herkunftsanalyse gerecht zu werden, nach der C₁₃, C₁₇ und C₁₈ aus dem Methyl der Essigsäure herrühren. Jedoch treten auch so Schwierigkeiten auf. Z. B. ist das von Woodward und Bloch sowie Mondon herangezogene Lanosterol bisher nur aus dem Wollfett der Schafe bekannt. Das Vorkommen in der Hefe ist äußerst problematisch, da die Hefeindustrie seit Weltkrieg I Wollfettalkohole allgemein als Schaum-dämpfungsmittel verwendet. Das von H. Wieland und Mitarb.³⁾ isolierte Kryptosterin (= Lanosterol) braucht also nicht aus der Hefe zu stammen, da es aus den Rückständen der Ergosterin-Fabrikation gewonnen wurde. Da Squalen in der Leber vieler Tiere, in Hefe und in Pflanzenölen vorkommt, erscheint es merkwürdig, daß dem Lanosterol keine weitere Verbreitung zukommen soll, wenn es ein so wichtiges Zwischenprodukt bei der Steroid-Synthese darstellt. Ein wesentliches Argument für die Squalen-Lanosterol-Cholesterin-Hypothese ist die nahe sterische Verwandtschaft der beiden letztgenannten Verbindungen, aber es weisen auch die Triterpene gleiche räumliche Verhältnisse auf und ebenso zeigen die bicyclischen Terpene trans-Verknüpfung der Ringe^{1),} obwohl für sie Squalen keinesfalls als Vorstufe in Frage kommt. Ferner ist die Herausnahme von drei Methyl-Gruppen aus dem primären Cyclisierungsprodukt des Squalens erforderlich. Bisher sind keine Abkömmlinge des Lanosterols in der Natur bekannt, die ein oder zwei dieser C-Atome weniger enthalten; das gleiche gilt an den geforderten Stellen in der Molekel für die nahe verwandten Triterpene. Die Herausnahme solcher geminalen oder an Ringverknüpfungen stehenden tert. Methyl-Gruppen, auch nach Überführung in Carboxyl, scheint biologisch doch nicht so leicht zu verlaufen wie Mondon annimmt^{3a)}. Das ist um so bemerkenswerter, als das Tatsachenmaterial auf dem Gebiet der Triterpene schon relativ reich ist. Die natürlich vorkommenden Verbindungen dieses Typs haben im allgemeinen noch alle 30 C-Atome.

Mondon nimmt das „Isosqualen“ deswegen an, weil die biologische Ausbeute an Endprodukt größer sein müßte, wäre Squalen selbst Vorstufe des Cholesterins. Nach unserer Auffassung⁴⁾ wird Squalen zerlegt, wobei vorerst offen bleiben muß, ob es allein die Seitenkette des Cholesterins mit 8 C-Atomen liefert (wäre bei der Symmetrie der Molekel zweimal möglich) oder aber auch C₅-Stücke gebildet werden, die später zu der früher diskutierten C₁₀-Säure vereinigt werden. Letztere kann heute nicht mehr als Ganzes aus Squalen abgeleitet werden, da einer solchen Auffassung die Befunde der Herkunftsanalyse der C-Atome des Cholesterins entgegenstehen^{2, 5, 6)}. Eine Methyl-Wanderung ist auch bei dieser Annahme nicht zu umgehen.

Wir wollten zunächst abwarten, bis weitere Befunde eine Entscheidung zwischen den beiden Auffassungen ermöglichen würden; einmal Aufbau des Steroid-Systems als Ganzes aus einer längeren Kohlenstoffkette im Sinne von Woodward und Bloch oder aus mehreren Teilstücken mit dem Kohlenstoff-Skelett des Mesogenotogenins und Pierotoxinins, sowie biologisch möglichen C₆-Carbonsäuren unter Decarboxylierung. Es erscheint uns wenig wahrscheinlich, daß Variationen an diesen Hypothesen auf Grund rein theoretischer Erwägungen das Problem wesentlich fördern können, sondern es bedarf neuer experimenteller Befunde, um eine Klärung herbeizuführen.

Wir sind uns bewußt, daß unsere Vorstellungen⁴⁾ in Bezug auf Einzelheiten Revisionen erfahren werden, doch finden wir in der Arbeit von Mondon keine Angaben, die zwingend unsere Grund-Auffassung erschüttern. Bei einem Aufbau der Steroide aus mehreren Teilstücken sind von vornherein eine Reihe von Möglichkeiten der Kombination und Variation an den Teilen möglich. So muß auch die früher diskutierte Möglichkeit der Bildung von Ring A und B im Lichte der neuen Feststellungen der Herkunftsanalyse revidiert werden. Dies ist aber relativ leicht möglich. Die in Zukunft zu erwartende Aufklärung der Herkunft der noch fehlenden C-Atome C₇, C₈, C₉, C₁₁, C₁₂, C₁₄, C₁₅ und C₁₆ wird eine weitere Einschränkung der gegebenen Möglichkeiten bringen.

Eingeg. am 14. Juli 1953

³⁾ H. Wieland u. W. M. Stanley: Liebigs Ann. Chem. 489, 31 [1931]; H. Wieland, H. Pasedach u. A. Ballauf, ebenda 529, 65 [1937].

^{3a)} Die Abspaltung der angulären Methyl-Gruppe im Östron und Equulin mag mit der Aromatisierung des Ringes A in Zusammenhang stehen.

⁴⁾ R. Tschesche u. F. Korte, diese Ztschr. 64, 633 [1952]; s. a. W. Voser, M. Montavon, Hs. G. Gunthard u. L. Ruzicka, Helv. chim. Acta 33, 1893 [1950].

⁵⁾ J. Wiersch, R. L. Huang u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 195, 439 [1952].

⁶⁾ J. W. Cornforth, G. D. Hunter u. G. Popjak, Biochemic. J. 53, XXIV [1953].

Entgegnung

Von Dozent Dr. A. MONDON

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Kiel

Die Kenntnis vom biologischen Einbau markierter Essigsäure in das Kohlenstoffgerüst des Cholesterins ist durch neue Arbeiten erweitert worden. Cornforth, Hunter und Popjak⁸⁾ haben den Ring A des Cholesterins abgebaut und gefunden, daß die C-Atome 1, 3, 5^{a)} und 10 aus Methyl-, die C-Atome 2, 4, 6 und 10 aus Carboxyl-Kohlenstoff hervorgehen. Die von mir theoretisch abgeleitete Verteilung ist damit identisch, ausgenommen für das C-Atom 13, das nach Woodward und Bloch⁸⁾ sowie Dauben und Mitarb.⁷⁾ aus Methyl-Kohlenstoff der Essigsäure gebildet wird. Dieses Ergebnis ist sehr auffallend, da beim normalen Aufbau der Isopren-Kette die Methyl-Verzweigung stets mit einem C-Atom verknüpft ist, das aus der Carboxyl-Gruppe der Essigsäure hervorgeht.

Der Widerspruch kann durch einen Platzwechsel der Methyl-Gruppe gedeutet werden. Zu der gleichen Folgerung gelangen auch die amerikanischen Autoren^{8, 7)}. Da der Platzwechsel der Methyl-Gruppe — nach den Gesetzmäßigkeiten der Cyclisierung — der Ringbildung vorausgehen muß, wird in diesem Stadium die Squalen-Hypothese mit der Isosqualen-Hypothese identisch.

Wir können vorerst keine Erklärung für diese Methyl-Wanderung geben, doch scheint sich die Vermutung zu bestätigen, daß im Squalen die stabile, im Isosqualen die labile Vorstufe der Steroide vorliegt.

Nach der neuesten Arbeit von Langdon und Bloch⁸⁾ ist der Wirkungsfaktor des biologisch markierten Squalens bei der Biosynthese des Cholesterins entgegen früheren Angaben⁹⁾ 6 mal größer als der des Isovalerats. Damit ist die Annahme der direkten Umwandlung des Squalens in Cholesterin über das hypothetische Isosqualen auf das beste gestützt.

Das Lanosterin habe ich nicht als Zwischenprodukt der Cholesterin-Biogenese formuliert, wie Tschesche und Korte angeben. Es wurde vermutet, daß diese Verbindung aus einer Umlagerung des cyclisierten Isosqualens hervorgeht, also in ihrer Entstehung vom normalen Weg der Steroid-Bildung abweicht.

Ob Kryptosterin (= Lanosterin) ein natürlicher Bestandteil der Hefe ist, kann hier nicht entschieden werden. Die Annahme der Einschleppung von Tschesche und Korte verliert sehr an Wahrscheinlichkeit, da auch aus anderen Pilzen tetracyclische Triterpene vom Typ des Kryptosterins isoliert wurden¹⁰⁾. Auffallend bleibt auch die Beziehung zum Zymosterin, das in der Hefe in reichlicher Menge vorkommt und dessen Bildung sehr gut durch oxydative Abbau des Kryptosterins erklärt werden kann.

Die Möglichkeit des biologischen Abbaus der überzähligen Methyl-Gruppen wird von Tschesche und Korte bezweifelt, weil bisher keine Zwischenprodukte aufgefunden wurden, bei denen partielle Abspaltung beobachtet worden ist. Für die pentacyclischen Triterpene trifft dieses zu, doch gibt es gerade hier Verbindungen, die in ihrer Struktur große Ähnlichkeit mit den von mir angenommenen Zwischenstufen der Cholesterin-Bildung haben¹¹⁾. Andererseits kennen wir im Chamazulen eine Verbindung aus der Reihe der Sesquiterpene, bei der eine Methyl-Gruppe oxydativ entfernt wird¹²⁾. Die Entstehung der aromatischen Steroide vom Typ des Östrons und Equolins, an deren genetischer Beziehung zu den hydroaromatischen Steroiden nicht gezweifelt werden kann, ist gleichfalls mit der Abspaltung einer Methyl-Gruppe verbunden.

Die Bedenken, die von Tschesche und Korte im Hinblick auf die sterischen Verhältnisse angeführt werden, teile ich nicht.

Die Synthese des Isosqualens ist inzwischen gelungen. Die Verbindung ist eine luftempfindliche Flüssigkeit, die bei einer Badtemperatur von 180 °C/0,002 mm überdestilliert, d₄²¹ 0,8685, n_D²¹ 1,4968; sie bildet zwei isomere Hexahydrochloride mit den Fpp. 98 °C und 115–118 °C. Damit ist die Grundlage zur experimentellen Prüfung der Isosqualen-Hypothese gegeben.

Eingeg. am 7. September 1953 [Z 88]

^{8a)} Anmerk. bei der Korr.: ebenso das C-Atom 7; vgl. K. Bloch, Helv. chim. Acta 36, 1611 [1953].

⁷⁾ W. G. Dauben, S. Abraham, S. Hotta, I. L. Chaikoff, H. L. Bradlow u. A. H. Soloway, J. Amer. chem. Soc. 75, 3038 [1953].

⁸⁾ R. G. Langdon u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 200, 135 [1953].

⁹⁾ R. G. Langdon u. K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 74, 1869 [1952].

¹⁰⁾ Z. B. Eburonsäure und die Polyporensäuren A, B und C.

¹¹⁾ Z. B. Echinocyst-, Quillaja- und Chinovasäure.

¹²⁾ A. Meisels u. A. Weizman, J. Amer. chem. Soc. 75, 3865 [1953].