

Isopropyl-methyl-pyridin-Pikrat $C_9H_{13}N$, $C_6H_3N_3O_7$ (364.24).

Ber. C 49.44, H 4.43, N 15.39. Gef. C 49.55, 49.17, H 4.23, 4.54, N 15.03.

Molekulargewichts-Bestimmung nach Rast in Campher: 0.0140 g Sbst. in 0.283 g Campher: Δ 5.5⁰, 5.5⁰.

Ber. Mol.-Gew. 364. Gef. Mol.-Gew. 360.

Chlorplatinat A. Beim Eindampfen der ätherischen Basenlösung mit Salzsäure im Vakuum hinterbleibt ein zerfließliches Chlorhydrat. Hierbei ist nie Salmiak-Bildung beobachtet worden. Aus der filtrierten Lösung des Chlorhydrats resultiert beim Einengen mit Platinchlorwasserstoffsäure das dem Pikrat 146⁰ zugehörige Platinsalz. Kugelige Aggregate. Schmp. 163–164⁰ unt. Zers. Platinsalmiak wurde nie gefunden.

Acetylierungsversuch mit der Base aus Pikrat A: 1.3 g des reinen Pikrats A wurden mit konz. Salzsäure übergossen und die Pikrinsäure abgesaugt. Aus dem salzsäuren Filtrat wurde eine ätherische Lösung der Base gewonnen, die durch Trocknen mit Kali von Wasser und Spuren von Pikrinsäure befreit wurde. Der Äther wurde vorsichtig abdestilliert und der stark pyridin-artig riechende Rückstand mit 5 ccm Essigsäure-anhydrid 1 Stde. zum Sieden erhitzt. Nach dem Abdampfen und Abrauchen mit Alkohol hinterblieb nichts.

Pikrat B, Schmp. 149⁰, leicht löslich in Alkohol.

2.385 mg Sbst.: 4.020 mg CO₂, 0.73 mg H₂O. — Gef. C 45.98, H 3.43.

Indiff. Körper C, Schmp. 79⁰, schwer löslich in Äther, unlöslich in Wasser.

I. 4.392 mg Sbst.: 10.700 mg CO₂, 2.06 mg H₂O. — II. 3.260 mg Sbst.: 0.232 ccm N (22⁰, 718 mm).

C₁₀H₁₆NCl (179.60). Ber. C 66.84, H 5.61, N 7.80. Cl 19.75. Gef. C 66.46, H 5.25, N 7.78.

304. Hans v. Euler und Allan Bernton: Phosphor-Derivate von Sterinen (I).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 4. Juli 1927.)

Die Übergänge zwischen den drei großen Gruppen der Lipoide, den Fetten, Sterinen und Phosphatiden, sind noch ungenügend untersucht, und besonders fehlen die chemischen Grundlagen für das Verständnis der vielfachen biologischen Beziehungen zwischen Sterinen und Fetten bzw. Phosphatiden. Erst in letzter Zeit hat man begonnen, die Wege der Sterin-Bildung im Pflanzen- und Tierkörper zu suchen, und hier hat der wichtige Nachweis (Bäumer), daß Cholesterin auch das Produkt der Synthese im Tierkörper sein kann, befruchtend gewirkt.

Der Umstand, daß Sterine nicht nur die ständigen Begleiter der Phosphatide in den Zellen sind, sondern daß sie in vielen Präparaten den Phosphatiden mehr oder weniger anhaften, ist auf die den beiden Stoffgruppen gemeinsamen kolloiden Eigenschaften zurückgeführt worden. Den Schwierigkeiten der analytischen Trennung der Lipoide ohne Spaltung leicht zersetzlicher Substanzen ist es wohl zuzuschreiben, daß auch über die Sterin-ester der höheren Fettsäuren und ihr Gleichgewicht erst wenige Daten vorliegen, obwohl den Sterin-estern in den Zellen zweifellos wichtige Rollen zukommen.

Durch die Forschungen der letzten Jahre haben bekanntlich das Cholesterin und die Sterine überhaupt ein besonderes Interesse gewonnen, nach-

dem es sich gezeigt hatte, daß diejenigen Bestandteile des Lebertrans und ihm nahestehender, anti-rachitisch wirksamer Öle, welche sich im unverseifbaren Rest derselben finden und zu den Sterinen zu zählen sind, als die Träger der genannten Vitamin-Wirkung angesehen werden müssen.

Dieses Interesse hat sich dann noch erhöht durch den Nachweis, daß ein Sterin durch Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen in eine anti-rachitische Substanz verwandelt werden kann (Heß, Steenbock), und als es gelang, im Ergosterin eine Substanz mit so starker Aktivierbarkeit durch ultraviolette Strahlen zu finden, daß dieselbe als ein anti-rachitisch spezifisches Provitamin angesprochen werden muß (Windaus, Heß¹⁾, Rosenheim, Pohl). Damit ist eines der fett-löslichen Vitamine konstitutionell an das von Windaus weitgehend aufgeklärte Cholesterin angeschlossen.

Es bleibt nun einerseits das mit dem anti-rachitischen Vitamin oft vergesellschaftete fett-lösliche Wachstums-Vitamin (fett-löslicher Wachstumsfaktor) — auch dieses gehört vermutlich den Sterinen an — zu isolieren, und andererseits Anhaltspunkte über die Wirkungsweise des anti-rachitischen Vitamins zu gewinnen.

Zum Studium der Wirkungsweise des Ergosterins bzw. seines Umwandlungsproduktes liegen bis jetzt zwei Anhaltspunkte vor: Der eine liegt in der Tatsache, daß die am besten meßbare, vermutlich auch die primäre Wirkung dieses Vitamins in der Beeinflussung des Phosphat-Stoffwechsels des Blutes besteht, und zwar in der Weise, daß bei Mangel an anti-rachitischem Vitamin im Organismus höherer Tiere der Phosphatgehalt des Blutes stark abnimmt. Letzterer Zusammenhang legt die Frage nahe, ob und in welcher Weise fett-lösliche Vitamine (zusammen mit C-Vitamin) an der Einstellung des die Knochen-Bildung bestimmenden Phosphat-Gleichgewichtes beteiligt sind. Vom enzymchemischen Gesichtspunkt aus wird diese Frage an anderer Stelle besprochen; wir wollen hier nicht darauf eingehen, sondern uns gleich den hier mitzuteilenden präparativen Ergebnissen zuwenden.

Es schien uns zunächst wünschenswert, zu erfahren, ob Sterine selbst durch Bildung von Phosphorsäure-Estern am Phosphat-Gleichgewicht beteiligt sein können, und da unseres Wissens Phosphor-Derivate von Sterinen bis jetzt noch nicht bekannt waren, haben wir zunächst unternommen, die Cholesterin-Ester der Phosphorsäure und der phosphorigen Säure herzustellen.

Es ist uns gelungen, bei Einwirkung von Cholesterin (Merck; Schmp. 148.5⁰) auf Phosphoroxchlorid, in absolut wasser-freier Pyridin-Lösung das Mono-cholesteryl-phosphat, $C_{27}H_{47}PO_4$, darzustellen, während sich bei Zusatz von Phosphoroxchlorid zu einer äquivalenten Menge von Cholesterin ebenfalls in krystallinischer Form das Di-cholesteryl-phosphat vom Schmp. 186⁰ erhalten ließ. Ihre Spaltung durch Cholesterase wird an anderer Stelle besprochen.

Die Herstellung des Cholesteryl-phosphites geschah in erster Linie, um die physiologischen Eigenschaften dieses Körpers kennen zu lernen. Es war nämlich die Möglichkeit gegeben, daß dieses Phosphit die wirksame

¹⁾ Windaus u. Heß, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-phys. Kl. 1927, 175.

Substanz der in der veterinär-ärztlichen Praxis und bei der Zucht von Haustieren vielfach verwendeten Lösungen des Phosphors in Tran darstellt. Das Cholesteryl-phosphit erhielten wir als Reaktionsprodukt von Phosphor-trichlorid mit Cholesterin. Die aus Äther-Benzol umkrystallisierte, rein weiße Substanz zeigte den Schmp. 158—159°.

Von den untersuchten Phytosterinen lieferte bis jetzt das Sitosterin (ein aus Weizen-Keimlingen hergestelltes Präparat vom Schmp. 137°) reine Produkte. Das mit Phosphor-trichlorid dargestellte Sitosteryl-phosphit schmilzt bei 153°.

Was die physiologischen Wirkungen des Mono-cholesteryl-phosphates betrifft, so haben wir uns zunächst für die Fähigkeit dieser Substanz interessiert, nach Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen Wachstums-Wirkungen an jungen Ratten hervorzurufen, während das unbestrahlte Phosphat keinen Zuwachs der A-frei²⁾ ernährten Tiere hervorbrachte.

Die Versuchsanordnung³⁾ war dabei die bei der Untersuchung des fett-löslichen Wachstums-Vitamines A übliche: Der verwendete Stamm weißer Ratten lieferte Junge, welche im Alter von etwa 4—5 Wochen unter Vorbehandlung mit A-freier Grundnahrung nach Mc Collum und bei Zusatz von B-Vitamin (Marmite) und C-Vitamin (Citronensaft) bei einem Körpergewicht von 40—50 g zu wachsen aufhörten. Die zu untersuchenden bestrahlten oder unbestrahlten Substanzen wurden in Arachisöl gelöst bzw. homogen emulgiert und mittels Pipette quantitativ eingegeben.

Nach den seit einiger Zeit begonnenen Versuchen ist das Wachstum der bei A-freier Ernährung ins Gleichgewicht gekommenen Tiere unter dem täglichen Zusatz des bestrahlten Cholesterin-monophosphates (2 mg per Tag) auffallend groß, nämlich im Mittel 16 g in 10 Tagen; die gleiche Menge des nicht bestrahlten Phosphates rief keine Wachstums-Wirkung hervor. Da aber auch Ergosterin (ein uns von Hrn. Prof. A. Windaus freundlichst überlassenes Präparat) Wachstums-Wirkungen hervorruft, und zwar in noch kleineren Mengen, wollen wir uns, bis quantitative Vergleiche mit dem Ausgangsmaterial vorliegen, über die Wachstums-Wirkung der reinen Cholesteryl-phosphate noch nicht endgültig aussprechen. Sollte indessen die beobachtete Wachstums-Wirkung mit einem dem Phosphat in kleinen Mengen anhaftenden, nach Bestrahlung wachstums-fördernden Stoff zusammenhängen, so hat derselbe jedenfalls die Einwirkung des Phosphoroxychlorids ohne Zerstörung durchgemacht und dürfte ebenfalls in Phosphat umgewandelt worden sein. Zunächst wird nun Cholesteryl-phosphat aus dem nach Windaus von Provitamin befreitem Cholesterin untersucht⁴⁾.

²⁾ Der Einheitlichkeit wegen schließen wir uns der in der englischen und amerikanischen Literatur nunmehr üblichen Bezeichnung A für das Wachstums-Vitamin und D für das anti-rachitische Vitamin an; vergl. hierzu Euler, Myrbäck, Fink und Hellström, Ztschr. physiol. Chem. **168**, 11 [1927]. — Welche Menge von bestrahltem Ergosterin bei A-Prüfungen der Grundnahrung zuzusetzen ist, wird in diesem Institut eingehender untersucht.

³⁾ Zu den Einzelheiten der Methodik siehe die Monographie von Euler, Vitaminer o. Tillväxtfaktorer, Stockholm 1924.

⁴⁾ Bestrahltes (ungereinigtes) Cholesteryl-acetat verhält sich bezüglich seiner anti-rachitischen und bezüglich seiner Wachstumswirkungen wie das betr. Cholesterin. Ergosteryl-acetat und Ergosteryl-phosphit haben wir noch nicht verglichen.

Beschreibung der Versuche.

I. Versuche mit Phosphortrichlorid.

Versetzt man Cholesterin in einem Reagensglas mit Phosphortrichlorid, so löst es sich unter lebhafter Salzsäure-Entwicklung allmählich auf. Beim Eintragen in viel Wasser fällt das Produkt aus, und nach mehreren Stunden kann man abfiltrieren, mit Wasser waschen und im Vakuum-Exsiccator trocknen. Krystallisiert man die Substanz aus einer Mischung von Äther und Benzol um, so erhält man ein rein weißes Präparat vom Schmp. 158—159°, löslich in Chloroform, Benzol, Alkohol und Äthylacetat.

6.056 mg Sbst.: 0.0286 g Molybdat. — 8.121 mg Sbst.: 0.0388 g Molybdat. — 7.880 mg Sbst.: 0.0374 g Molybdat.

$C_{27}H_{47}PO_3$ (450.4). Ber. P 6.89. Gef. P 6.86, 6.94, 6.89.

Die erhaltene Substanz war durch methylalkoholisches Kali verseifbar, allerdings schwer. Durch Kochen mit konz. Salpetersäure wurde sie ebenfalls gespalten.

Anilin-Salz.

Cholesteryl-phosphit wurde in Benzol gelöst und mit einer Lösung von Anilin in Benzol versetzt, wobei das Anilin-Salz augenblicklich ausfiel. Die Fällung wurde abgesaugt, mit Äther gewaschen und aus Alkohol, der mit etwas Anilin versetzt wurde, umkrystallisiert. Die Substanz wurde nun in Form verfilzter Nadeln erhalten, welche den Schmp. 170° zeigten.

7.166 mg Sbst.: 0.0283 g Molybdat. — 8.687 mg Sbst.: 0.0341 g Molybdat.

$C_{33}H_{52}NPO_3$ (541.5). Ber. P 5.73. Gef. P 5.74, 5.70.

Dibromverbindung des Cholesteryl-phosphites.

1.13 g Cholesteryl-phosphit wurden in 5 ccm Benzol gelöst und mit 4 ccm einer 10-proz. Brom-Lösung in Essigsäure versetzt, wobei sich augenblicklich nadelförmige Krystalle bildeten. Sie waren in Benzol, Äthyl- und Methylalkohol löslich, dagegen in Äthylacetat ziemlich schwer löslich. Sie wurden deshalb aus Äthylacetat umkrystallisiert und hatten dann einen Schmelzpunkt von 148°.

8.728 mg Sbst.: 0.0300 g Molybdat. — 8.356 mg Sbst.: 0.0288 g Molybdat.

$C_{27}H_{47}Br_2PO_3$ (610.3). Ber. P 5.09. Gef. P 5.00, 5.01.

Um die Konstitution dieser Substanz zu kontrollieren, wurde Cholesterin bromiert, mit Phosphortrichlorid versetzt, in Wasser gegossen, nach 2 Stdn. abgesaugt, gewaschen und aus Äthylacetat umkrystallisiert. Schmp. 147°. Eine Mischprobe mit dem oben gefundenen Bromid gab 147—148°. Die Substanzen waren also identisch.

Einwirkung von Essigsäure-anhydrid.

Etwas Cholesteryl-phosphit wurde unter Rückfluß mit der 10-fachen Menge Essigsäure-anhydrid gekocht. Sie ging allmählich in Lösung, aber nach einigen Minuten färbte sich die Lösung schnell dunkelbraun. Durch Eintauchen in kaltes Wasser wurde die Lösung abgekühlt, wobei im Kolben eine Krystallmasse ausfiel. Die Krystalle wurden abgesaugt und aus Äthylacetat 2-mal, sodann aus Aceton 1-mal umkrystallisiert und im Vakuum getrocknet. Die Substanz erwies sich als phosphorfrei und hatte einen Schmelzpunkt von 114°. Da vorauszusehen war, daß der Phosphorrest aus dem Molekül durch das Essigsäure-anhydrid abgespalten worden war, und daß die Substanz nichts anderes als Cholesteryl-acetat sei, wurde eine

Mischprobe gemacht; dabei wurde keine Schmelzpunkts-Erniedrigung beobachtet. Es war also damit bewiesen, daß die Phosphorgruppe an der sekundären Alkoholgruppe des Cholesterins gebunden war, daß die oben beschriebene phosphor-haltige Substanz ein wahrer Ester der phosphorigen Säure ist, und daß es sich nicht, wie anfangs in Frage kommen konnte, um ein Anlagerungsprodukt an die Doppelbindung des Cholesterins handelt.

2. Versuche mit Phosphoroxychlorid.

A. Benzol-Lösung: 3.86 g Cholesterin wurden mit 1.53 g Phosphoroxychlorid in 10 ccm Benzol gelöst und unter Rückfluß gekocht, wobei eine starke Entwicklung von HCl-Gas beobachtet wurde. Beim Ausgießen in viel Wasser wurde eine äußerst schleimige Masse erhalten, die zuerst im Vakuum-Exsiccator von Benzol und Wasser befreit und dann aus einer Mischung von Alkohol und Benzol umkrystallisiert wurde. Sie hatte einen Schmelzpunkt von 195—199° und war vollständig phosphorfrei. Der beobachtete Schmelzpunkt stimmt mit dem des Di-cholesteryl-esters, der von Mauthner und Suida⁵⁾ zu 195.5° angegeben wird, überein.

Diese Substanz wurde noch durch Herstellung des Bromids identifiziert. Zu diesem Zweck wurde sie in Äther gelöst und mit Brom in Essigsäure versetzt, wobei eine Fällung erhalten wurde. Aus einer Mischung von Benzol und Alkohol umkrystallisiert, zeigte die Substanz den Schmp. 175°, während Minovici⁶⁾ 174.5° angibt.

In benzolischer Lösung des Cholesterins ließ sich somit die Phosphatgruppe nicht einführen.

B. In Pyridin: Zwei verschiedene Methoden wurden angewandt. Entweder wurden äquivalente Mengen Cholesterin und Phosphoroxychlorid verwendet und das POCl₃ in die Cholesterin-Lösung eingetropf, oder es wurde ein großer Überschuß von Oxychlorid genommen und umgekehrt das Cholesterin der POCl₃-Lösung langsam zugesetzt.

3.86 g Cholesterin wurden in 20 ccm vakuum-destilliertem Pyridin gelöst und unter guter Kühlung durch eine Kältemischung sehr langsam in eine Lösung von 6 g ebenfalls im Vakuum destilliertem Phosphoroxychlorid in 25 ccm Pyridin eingetropf. Nachdem alles Cholesterin zugegeben war, wurde die Kühlung entfernt; das Gemisch blieb nach längerem Rühren über Nacht bei Zimmer-Temperatur stehen, dann wurde die Substanz in viel Wasser gegossen und nach mehrstündigem Stehen abgesaugt. Die Masse ist äußerst schleimig, das Absaugen und Waschen geht deshalb äußerst langsam. Es wird dann auf dem Tonteller und zuletzt im Vakuum-Exsiccator getrocknet. Die Substanz wird aus Chloroform umkrystallisiert, am besten nach Filtrieren mit etwas Tierkohle. Schmp. 195—196°. Löslich in Benzol und Chloroform.

4.800 mg Sbst.: 0.0224 g Molybdat. — 5.238 mg Sbst.: 0.0244 g Molybdat.

C₂₇H₄₇PO₄ (466.4). Ber. P 6.66. Gef. P 6.78, 6.76.

Wurde umgekehrt die äquivalente Menge Phosphoroxychlorid zu einer Lösung von Cholesterin in Pyridin zugegeben, so wurde eine Substanz vom Schmp. 186° erhalten, welche der Phosphor-Bestimmung zufolge als Di-cholesteryl-phosphat aufgefaßt werden muß. Auch diese Substanz ist in Benzol und Chloroform löslich.

9.483 mg Sbst.: 0.0244 g Molybdat. — 6.076 mg Sbst.: 0.0157 g Molybdat.

C₅₄H₉₁PO₄ (834.8). Ber. P 3.72. Gef. P 3.75, 3.75.

⁵⁾ Monatsh. Chem. **17**, 36 [1896].

⁶⁾ B. **41**, 1564 [1908].

