

Hierbei fanden wir folgende Unterschiede: 1. Beim Schütteln einer Lösung von Carotin in Benzol mit Sauerstoff setzte nach 24 Stdn. Sauerstoff-Aufnahme durch den Farbstoff ein; nach 48 Stdn. war die Lösung stark ausgebleicht. Dieselbe Lösung, mit 1% Guajacol (bezogen auf die Menge des angewandten Carotins) versetzt, ließ im gleichen Apparat nach 6 Tagen nicht die geringste Sauerstoff-Aufnahme erkennen. 2. Eine Benzol-Lycopin-Lösung, mit Sauerstoff geschüttelt, entfärbte sich innerhalb 48 Stdn.; dieselbe Lösung, mit 1% Hydrochinon (bezogen auf gelöstes Lycopin) versetzt, war auch nach 8-tägigem Schütteln mit Sauerstoff unverändert.

Stockholm und Zürich, Chem. Institute d. Universitäten.

387. H. v. Euler, Anton Wolf und H. Hellström: Über Steryl-phosphorsäuren.

[Aus d. Biochem. Institut d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 7. August 1929.)

Noch immer entbehrt man chemischer Anhaltspunkte über die chemische Seite der D-Vitamin-Wirkung; man weiß nicht, welcher Art die Reaktion ist, in welche das D-Vitamin als Biokatalysator eingreift. Die quantitativ am exaktesten verfolgbare chemische Primärscheinung der antirachitischen Wirkung ist, wie besonders durch die ausgezeichneten Untersuchungen von Kramer gezeigt worden ist, die Konzentrations-Beeinflussung des gesamten und des freien Phosphates im Blutserum. Kombiniert man diesen Umstand mit anderen Teilvorgängen des antirachitischen Stoffwechsels und zieht die Tatsache in Betracht, daß Sterylphosphate enzymatisch gespalten werden, so wird man besonders den Ergosterylphosphaten ein biochemisches Interesse nicht absprechen wollen.

Es waren aber für die Inangriffnahme dieser Untersuchung noch zwei andere Probleme maßgebend: Schon seit längerer Zeit hat man nach den Beziehungen gesucht, welche zwischen Cholesterin einerseits und Lecithin oder überhaupt Phospholipiden andererseits bestehen, sei es in rein wäßrigem Medium, sei es im Serum bzw. in Gegenwart von Proteinen; es braucht nur an die Untersuchungen von White, von Hattori¹⁾, von Liebermann und an die neueren Studien von Macheboeuf²⁾ erinnert zu werden. Die Schwierigkeiten, die kolloiden Bestandteile des Serums durch Trennung zu isolieren, machen es wünschenswert, die Eigenschaft synthetischer Stoffe, welche aus Sterinen und Phosphor, Sterinen und Phospholipiden und schließlich aus Sterinen und Proteinen erhalten werden, näher zu studieren, um so mehr, als Probleme der Serum-Therapie aufs engste mit den zwischen Sterinen und Proteinen bestehenden Affinitätsgrößen zusammenhängen.

Schließlich tritt immer deutlicher zutage, daß die Bildung des D-Vitamins aus Ergosterin im ultravioletten Licht ein äußerst vielseitiger Vorgang ist, besonders wegen der Labilität des isolierten Ergosterins. Allem

¹⁾ Hattori, Biochem. Ztschr. **119**, 47 [1921].

²⁾ Macheboeuf, Recherches sur les lipides, les stérols et les protéides etc. Laval, 1928.

Anschein nach verläuft die photochemische Beeinflussung des Ergosterins in der Hefe anders als die des isolierten Ergosterins. Der Grund dieser Unterschiede, die zum Teil als Stabilisierungen angesprochen werden können, ist noch nicht näher bekannt; die Aufklärung dürfte über das systematische Studium der synthetischen Ergosterin-Derivate gehen. Als Ausgangspunkte hierfür waren aus oben angedeuteten Gründen Ergosterylphosphate gegeben.

Cholesterylphosphat ist zuerst von Euler und Bernton³⁾ dargestellt worden, und in der gleichen Untersuchung war auch gezeigt worden, daß dieses Cholesterin-Derivat enzymatisch gespalten wird. Die damals isolierten Verbindungen waren: Monocholesteryl-phosphorsäure, $C_{27}H_{47}PO_4$, Dicholesteryl-phosphorsäure, $C_{54}H_{91}PO_4$, cholesteryl-phosphorige Säure, $C_{27}H_{47}PO_3$, ferner die Dibrom-Verbindung dieses Phosphites und schließlich sitosteryl-phosphorige Säure. Mono- und Dicholesterylphosphate sind später von Plimmer und Burch⁴⁾ beschrieben worden.

Bei der erneuten Darstellung der Cholesterylphosphate hat sich gezeigt, daß bei der Phosphorylierung des Cholesterins mit Phosphoroxchlorid zunächst die halogen-haltigen, gut charakterisierten Zwischenprodukte entstehen, welche bei der Verseifung in die halogen-freien Verbindungen übergehen. So wurde bei der Phosphorylierung in trockenem Pyridin nach der im experimentellen Teil gegebenen Vorschrift in guter Ausbeute das Dichlorid der Monocholesteryl-phosphorsäure, $C_{26}H_{44}:CH.O.POCl_2$ (Schmp. 122⁰), erhalten. Erhitzt man nun dieses Dichlorid 1 Stde. mit Wasser, so wird es in Salzsäure und Monocholesterylphosphat gespalten.

Stellte man andererseits nach der von Euler und Bernton gegebenen Vorschrift das Dicholesterylphosphat her, so wurde beim Umkrystallisieren aus Benzol-Alkohol teils ein halogen-haltiges Produkt, teils reines Diphosphat (Schmp. 204⁰) erhalten. Der erstere Körper erwies sich als das Chlorid der Dicholesteryl-phosphorsäure, $(C_{26}H_{44}:CH.O)_2POCl$ (Schmp. 171⁰). Diese Steryl-phosphorsäure-chloride bilden das Ausgangsmaterial zu weiteren Synthesen mit Glycerin- und Aminosäure-Resten.

Als neu hergestelltes Cholesteryl-phosphorsäure-Derivat ist hier noch zu erwähnen die Dicholesteryl- $[\beta\text{-chlor-äthyl}]$ -phosphorsäure, $(C_{27}H_{47})_2PO.CH_2.CH_2.Cl$ (Schmp. 158⁰), aus Cholesterin und $[\beta\text{-Chlor-äthyl}]$ -phosphorsäure-chlorid (dargestellt nach Plimmer und Burch, bzw. Renshaw und C. Y. Hopkins⁵⁾) in Pyridin.

Ergosteryl-phosphorsäure-Derivate.

Nach der im experimentellen Teil näher angegebenen Vorschrift wurde aus Ergosterin und Phosphoroxchlorid Diergosteryl-phosphorsäure, $(Ergosteryl)_2PO_4$ (Schmp. 180—182⁰), dargestellt. Die Monoergosteryl-phosphorige Säure, Ergosteryl. PO_3 (Schmp. 146⁰), entsteht aus Ergosterin und Phosphortrichlorid. Setzt man Ergosterin mit $[\beta\text{-Chlor-äthyl}]$ -phosphorylchlorid in Pyridin um, so bildet sich als beinahe farblose (ganz leicht gelbliche), krystallisierende Substanz vom Schmp. 168⁰ (Sinterung von 145⁰ an), das Diergosteryl- $[\beta\text{-chlor-äthyl}]$ -phosphorylchlorid.

³⁾ Euler u. Bernton, B. **60**, 1720 [1927].

⁴⁾ R. H. A. Plimmer u. W. J. N. Burch, Journ. chem. Soc. London **1929**, 279.

⁵⁾ Renshaw u. C. Y. Hopkins, Journ. Amer. chem. Soc. **51**, 953 [1929].

Ultraviolett-Bestrahlung des Diergosterylphosphates.

An Monocholesterylphosphat waren schon von Euler und Bernton einige orientierende physiologische Versuche ausgeführt worden. Dabei zeigten sich anti-rachitische Wirkungen und ferner die dem D-Vitamin eigentümlichen, etwa 4—6 Wochen anhaltenden Wachstums-Wirkungen. Daß solche Wirkungen an Cholesterylphosphaten auftraten, war an sich nicht auffallend, und es lag ja nahe, dieselben dem bei der Phosphorylierung des gewöhnlichen Cholesterins als Beimengung auftretenden Ergosterylphosphat zuzuschreiben. Ein physiologischer Vergleich mit dem als Ausgangsmaterial verwendeten Cholesterin zeigte aber, daß die anti-rachitische Wirkung, beurteilt nach den Epiphysen-Schnitten und z. T. auch nach Röntgen-Aufnahmen, merkwürdig groß war. In der weiteren Verfolgung dieses Befundes ergab sich dann eine auffallende Stabilität des Cholesterylphosphates gegenüber Überbestrahlung, und das gleiche Resultat wurde erhalten, als mit reiner Diergosteryl-phosphorsäure gearbeitet wurde.

In diesem Zusammenhang muß nun zunächst an die auffallend verschiedenen Ergebnisse erinnert werden, welche bezüglich der Aktivierbarkeit bzw. der Wirksamkeit von Ergosteryl-estern überhaupt erhalten worden sind. Mit Cholesteryl-estern fanden Rosenheim und Webster⁶⁾, Euler und Bernton⁷⁾, sowie Bills und Mc Donald⁸⁾ keinen Unterschied im Vergleich mit dem Cholesterin⁹⁾. Hinsichtlich Ergosteryl-estern schreiben Rosenheim und Webster¹⁰⁾: „we established the interesting fact, that both ergosterol acetate and benzoate can be activated to the same degree as ergosterol itself“. Dagegen fanden Windaus und Rygh¹¹⁾, daß sich die von ihnen untersuchten Ester als physiologisch schwach oder gar nicht aktiv erwiesen, daß dagegen diese inaktiven Ester nach der Verseifung in Produkte von hoher anti-rachitischer Wirksamkeit übergehen. Die genannten Forscher schließen daraus, „daß die Ester durch ultraviolettes Licht zwar dieselbe chemische Umwandlung erleiden wie Ergosterin, daß aber für die physiologische Aktivität das Vorhandensein der unversehrten sekundären Alkoholgruppen notwendig erscheint.“

In Übereinstimmung mit Rosenheim und Webster und im Gegensatz zu Windaus und Rygh steht unser Befund, daß Diergosterylphosphat noch in Tagesdosen von γ anti-rachitisch wirksam ist.

Erst in letzter Zeit wurde erwogen, daß dieser Widerspruch auf der verschiedenen Geschwindigkeit der Hydrolyse der organischen Ester und des Phosphorsäure-esters beruhen kann, bei welchem letzterem wir ziemlich rasche Spaltung beobachteten¹²⁾. Diese relativen enzymatischen Spaltungsgeschwindigkeiten sollen noch an Ergosterylacetat und -phosphat verglichen werden. Bisher haben wir unsere Aufmerksamkeit auf die Verschiedenheit der Aktivierungskurven gerichtet, welche gefunden werden, wenn man nach

⁶⁾ Rosenheim u. Webster, *Biochem. Journ.* **20**, 537 [1926].

⁷⁾ Euler u. Bernton, l. c., S. 1722 Anm.

⁸⁾ Bills u. Mc Donald, *Journ. biol. Chem.* **72**, 13 [1927].

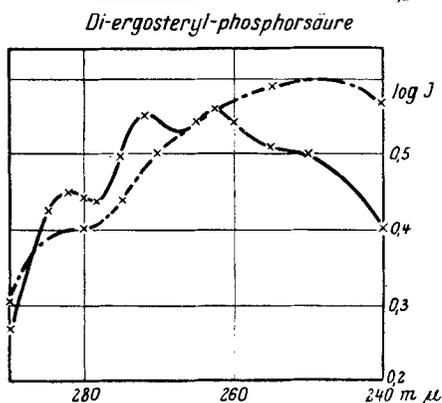
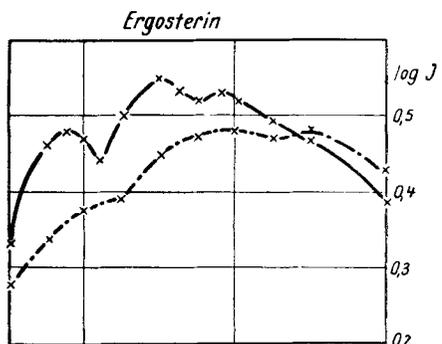
⁹⁾ Bezüglich anderer Ester siehe auch Windaus u. Smakala (*Götting. Nachr.*), sowie Shriner u. Ko, *Journ. biol. Chem.* **80**, 1 [1928].

¹⁰⁾ Rosenheim u. Webster, *Lancet* **1927**, 622.

¹¹⁾ Windaus u. Rygh, *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen* **1928**, 202.

¹²⁾ Siehe hierzu auch Neuberg u. Jacobsohn, *Biochem. Ztschr.* **199**, 198 [1928].

verschieden langer Bestrahlung freies Ergosterin und Diergosterylphosphorsäure hinsichtlich der anti-rachitischen Wirkung vergleicht¹³⁾. Auf



dann aufgenommen und die Absorption im Gebiet 240–290 μ bestimmt. Die so erhaltenen Kurven sind in obiger Figur wiedergegeben, in welcher die ganz ausgezogenen Linien den unbestrahlten, die gestrichelten den bestrahlten Substanzen entsprechen.

Ein Vergleich zwischen den beiden ersteren zeigt, daß man bei beiden die gleichen Maxima findet, und zwar bei sehr angenähert den gleichen Wellenlängen. Die Absorptionen der bestrahlten Substanzen unterscheiden sich dagegen erheblich mehr voneinander. Das photochemische Produkt des Ergosterins besitzt eine niedrigere Absorption als die Grundsubstanz (das unbestrahlte Ergosterin), mit Ausnahme des Gebietes 240–250 μ . Die entsprechende Kurve des bestrahlten Diergosterylphosphates weist ein ausgeprägtes Maximum bei etwa 250 μ auf, welches bedeutend höher liegt als der abfallende Ast der Grundsubstanz.

Die zuletzt diskutierten Kurven des Bestrahlungsproduktes bzw. der Bestrahlungsprodukte werden natürlich von nicht umgesetzter Grundsubstanz

die hierbei erhaltenen histologischen Befunde wollen wir später an anderer Stelle eingehen. Es hat sich zunächst als notwendig erwiesen, die optischen Absorptionskurven, welche nach verschiedener Belichtungsdauer an Ergosterin und Ergosterylphosphat erhalten werden, zu vergleichen.

Hier soll nur ein Versuch beschrieben werden, welcher die bei einer Belichtungsdauer von 30 Min. beobachteten Unterschiede zeigt.

13 mg Ergosterin und 12.9 mg Diergosterylphosphat wurden in je einem Meßkolben in 100 ccm absol. Alkohols gelöst. Von jeder der beiden Lösungen wurden 50 ccm in je eine 13 cm weite Krystallisationschale gegossen und darin 30 Min. der gleichförmigen Bestrahlung einer in 10 cm Abstand brennenden Quecksilber-Quarzlampe ausgesetzt. Der hierbei verdunstete Alkohol wurde hierauf quantitativ ersetzt. Die Spektren der unbestrahlten und der bestrahlten Lösungen wurden

¹³⁾ Wie Euler und Steffenburg, Ztschr. physiol. Chem. **149**, 202 [1925], fanden, „besitzt die wachstums-befördernde Wirkung der Ultraviolett-Bestrahlung ein Optimum, das nach einer gewissen Bestrahlungszeit bzw. nach einer gewissen Menge absorbierter Energie auftritt.“ Hinsichtlich der anti-rachitischen Wirkung ist dieses Maximum aus methodischen Gründen schwierig festzulegen.

beeinflußt, da dieselbe ja vor der Absorptions-Bestimmung nicht abge-
schieden wurde; dieser Einfluß tritt indessen hauptsächlich im Gebiet 260 bis
290 $m\mu$ hervor.

Der allgemeine Verlauf der von uns für bestrahltes Ergosterin erhaltenen
Kurve und noch mehr die Kurve für bestrahlte Diergosteryl-phosphorsäure
stimmt recht gut überein mit derjenigen, welche Webster und Bourdillon¹⁴⁾
in ihrer sehr bemerkenswerten Mitteilung für bestrahltes Ergosterin angegeben
haben.

Beschreibung der Versuche.

Monocholesteryl-phosphorsäure.

Das schon früher beschriebene Produkt wurde nach folgendem Verfahren
in guter Ausbeute erhalten: Man löst 10 g Cholesterin in 50 ccm trockenem
Pyridin und trägt dieses langsam unter Wasser-Kühlung in eine Lösung
von 8.8 ccm Phosphoroxychlorid in 50 ccm trockenem Aceton ein. Unter
starker Wärme-Entwicklung scheidet sich ein farbloser, krystallinischer
Niederschlag ab. Dieser wird abfiltriert, mit Aceton gewaschen und getrocknet.
Ausbeute 13 g. Prismatische Nadeln vom Schmp. 122⁰ (Rotbraunfärbung).
Diese aus Äther umkrystallisierte Substanz ist nach der Analyse das Di-
chlorid der Monocholesteryl-phosphorsäure.

$C_{22}H_{45}O_2Cl_2P$ (503.36). Ber. C 64.37, H 9.02. Gef. C 64.68, H 9.28.

Nach der Spaltung dieses Dichlorids, welche bei 1-stdg. Kochen mit
Wasser eintritt, fällt die Monocholesteryl-phosphorsäure als volumi-
nöse, gallert-artige Masse aus. Dieselbe wird auf Ton im Vakuum getrocknet
und schmilzt dann bei 193⁰. Beim Verdunsten ihrer Lösung in absol. Alkohol,
von welchem sie ziemlich leicht aufgenommen wird, schießt die Monochole-
steryl-phosphorsäure in kleinen Nadeln an.

Dicholesteryl-phosphorsäure.

Bei einer Wiederholung des nach der früher gegebenen Vorschrift aus-
geführten Versuches wurde aus 9 g Cholesterin, in 40 ccm trockenem
Pyridin gelöst und mit 2.5 g Phosphoroxychlorid versetzt, eine Roh-
ausbeute von 8.5 g phosphorylierter Substanz erhalten. Das beim Um-
krystallisieren aus Benzol-Alkohol neben der Diphosphorsäure entstehende,
halogen-haltige Produkt (Schmp. 171⁰) ergab folgende Zusammensetzung:

$C_{54}H_{90}O_3ClP$ (853.3). Ber. C 75.94, H 10.64, P 3.64, Cl 4.2.
Gef. „ 76.86, „ 10.19, „ 3.34, „ 4.6.

Die Substanz ist mit Spuren von verseiften Dicholesteryl-phosphorsäure
verunreinigt. Kocht man das Chlorid mit Wasser unter Zugabe von einigen
Tropfen Pyridin 6 Stdn., so erhöht sich der Schmp. auf 186⁰, nähert sich also
dem der Dicholesteryl-phosphorsäure.

Wendet man aber folgende Methode an, so tritt das halogen-haltige
Produkt nicht auf: 9 g Cholesterin, gelöst in 30 ccm Aceton + 10 ccm
Pyridin, werden mit 2.5 g Phosphoroxychlorid versetzt. Man gewinnt
an Rohausbeute 8 g Dicholesteryl-phosphorsäure (Schmp. 182—186⁰):
diese ergeben, in gleicher Weise aus Benzol-Alkohol umkrystallisiert, 4.5 g
reine Dicholesteryl-phosphorsäure vom Schmp. 204⁰.

¹⁴⁾ Webster und Bourdillon, *Biochem. Journ.* **22**, 1223 [1928].

Diergosteryl-phosphorsäure:

Die Darstellung schließt sich ganz an die für Dicholesteryl-phosphorsäure gegebene an. Umkrystallisation aus Pyridin.

Dicholesteryl-[β -chlor-äthyl]-phosphorylester.

Nachdem Versuche, diesen Körper durch Einwirkung von [β -Chlor-äthyl]-phosphorylchlorid auf Cholesterin in Tetrachlorkohlenstoff-Lösung und Erwärmen darzustellen, nicht das gewünschte Produkt, sondern den Cholesteryläther vom Schmp. 194⁰ (Dibromverbindung: Schmp. 138⁰, Misch-Schmp. keine Depression) ergeben hatten, wurde die Reaktion in Pyridin-Lösung vorgenommen: 9 g Cholesterin werden in 40 ccm trockenem Pyridin gelöst und unter Kühlung 2.5 g [β -Chlor-äthyl]-phosphorylchlorid zutropfen gelassen. Unter Erwärmung und Violettfärbung, die aber bald verschwindet, tritt die Reaktion ein, und es scheidet sich das Pyridin-Chlorhydrat aus. Nach Stehen über Nacht wird die Lösung in Eiswasser gegossen, wobei sich zuerst farblose Flocken abscheiden, die aber bald krystallin erstarren. Ausbeute an Rohprodukt 12 g. Man krystallisiert aus Äthylalkohol um, dem man einige Tropfen Benzol zugesetzt hat. Perlmutterglänzende Prismen vom Schmp. 158⁰.

0.1523 g Sbst.: 0.4166 g CO₂, 0.1465 g H₂O. — 0.3244 g Sbst.: 0.0477 g AgCl.
C₅₆H₉₆O₄PCl (899.3). Ber. C 74.73, H 10.76, Cl 3.94. Gef. C 74.60, H 10.76, Cl 3.64.

Diesen Körper mit Trimethylamin in Toluol-Lösung in den Cholin-ester umzuwandeln, gelang bis jetzt nicht.

Diergosteryl-[β -chlor-äthyl]-phosphorylester.

1.8 g Ergosterin werden in 15 ccm trockenem Pyridin gelöst und mit 0.5 g [β -Chlor-äthyl]-phosphorylchlorid versetzt. Unter starker Erwärmung und Gelbfärbung der Lösung tritt erst nach längerem Stehen Ausscheidung des Pyridin-Chlorhydrats ein. Man gießt in Eiswasser, wobei eine gelbliche Gallerte ausfällt. Diese wird abgesaugt und auf Tonscherben im Vakuum getrocknet. Zur Reinigung löst man sie aus Äthylalkohol unter Zusatz von wenig Benzol um. Submikroskopische Krystalle vom Schmp. 165—167⁰.

0.1472 g Sbst.: 0.4024 g CO₂, 0.1434 g H₂O. — 0.2836 g Sbst.: 0.0478 g AgCl.
C₅₆H₉₆O₄PCl (899.3). Ber. C 74.73, H 10.76, Cl 3.94. Gef. 74.56, H 10.90, Cl 4.17.

388. P. Lipp und H. Seeles: Neue Bildungsweise des 2-Phenyl-pyrrolins.

[Aus d. Organ.-chem. Laborat. d. Techn. Hochschule Aachen.]

(Eingegangen am 8. August 1929.)

Im Verlauf einer Untersuchung über die Bildungs-Bedingungen des Cyclopropanons¹⁾, über die später im Zusammenhang berichtet werden soll, benötigten wir Phenyl-cyclopropyl-ke-ton (I) in größeren Mengen. Zu

1) vergl. P. Lipp und C. Padberg, B. 54, 1316 [1921]; Seeles, Dissertat. Techn. Hochschule Aachen, 1929, noch nicht veröffentlicht.