

## HERMANN EGGERER

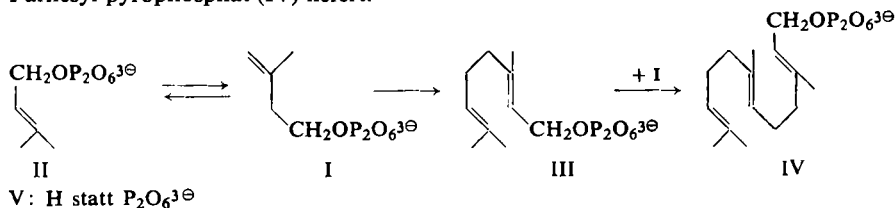
Zur Biosynthese der Terpene, X<sup>1)</sup>Synthese von  $\gamma,\gamma$ -Dimethylallyl-pyrophosphat und Geranyl-pyrophosphat<sup>2)</sup>

Aus dem Max-Planck-Institut für Zellchemie, München

(Eingegangen am 15. Juli 1960)

Durch Bromanlagerung geschützte Allylkohole werden mit  $\text{POCl}_3$  phosphoryliert und nach Reduktion zu Allylphosphaten über Allylphosphorsäureamide in Allylpyrophosphate umgewandelt. Die dargestellten Pyrophosphate des  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylkohols und Geraniols erwiesen sich auch in enzymatischen Versuchen als Zwischenprodukte der biologischen Terpensynthese.

Beim Studium der biologischen Squalensynthese im zellfreien Enzymsystem der Hefe konnte kürzlich der aus RUZICKAS „Isoprenregel“ abzuleitende  $\text{C}_5$ -Baustein isoliert und analytisch<sup>3,4)</sup> wie synthetisch<sup>4-6)</sup> mit  $\Delta^3$ -Isopentenyl-pyrophosphat (I) identifiziert werden. Außerdem wurde gefunden, daß die Synthese des Terpenkohlenwasserstoffs über Farnesyl-pyrophosphat (IV)<sup>4)</sup> als Zwischenprodukt führt und die Kondensation dreier  $\text{C}_5$ -Einheiten zum Sesquiterpen an die Gegenwart einer spezifischen Isomerase gebunden ist, die Isopentenyl-pyrophosphat (I) unter Verschiebung der Doppelbindung in  $\gamma,\gamma$ -Dimethylallyl-pyrophosphat (II)<sup>7)</sup> umwandelt. Es wurde daher angenommen<sup>4)</sup>, daß der Aufbau der Kohlenstoffkette stufenweise erfolgt und zunächst aus Dimethylallyl-pyrophosphat und Isopentenyl-pyrophosphat Geranyl-pyrophosphat (III) entsteht, das dann mit einem zweiten Isopentenyl-pyrophosphat Farnesyl-pyrophosphat (IV) liefert.



Um diese Annahme zu beweisen, war es nötig, Dimethylallyl-pyrophosphat und Geranyl-pyrophosphat darzustellen. Über diese Synthesen, die auf Anregung von

- 1) IX. Mittel.: J. KNAPPE, E. RINGELMANN und F. LYNEN, *Biochem. Z.* **332**, 195 [1959].
- 2) Vorläufige Mittel.: F. LYNEN, B. W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNING und E. M. MÖSLEIN, *Angew. Chem.* **71**, 657 [1959].
- 3) S. CHAYKIN, J. LAW, A. H. PHILLIPS, T. T. TCHEN und K. BLOCH, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **44**, 998 [1958].
- 4) F. LYNEN, H. EGGERER, U. HENNING und I. KESSEL, *Angew. Chem.* **70**, 738 [1958].
- 5) H. EGGERER und F. LYNEN, *Liebigs Ann. Chem.* **630**, 58 [1960].
- 6) C. YUAN und K. BLOCH, *J. biol. Chemistry* **234**, 2605 [1959].
- 7) B. W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNING und F. LYNEN, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 1254 [1959].

Herrn F. LYNEN ausgeführt und die bereits kurz mitgeteilt wurden<sup>2)</sup>, soll im folgenden berichtet werden. Inzwischen wurde von F. CRAMER und W. BÖHM<sup>8)</sup> ein elegantes Verfahren zur Darstellung von Allyl-pyrophosphaten beschrieben und für die Synthese von Geranyl- und Farnesyl-pyrophosphat verwendet.

In älteren Arbeiten wurde zur Darstellung von Allylphosphaten die Einwirkung von  $P_2O_5$  auf Allylalkohol<sup>9)</sup> und die Umsetzung von Allyljodid mit  $AgH_2PO_4$  in Phosphorsäure<sup>10)</sup> oder mit  $Na_3PO_4$  in wäßriger Lösung<sup>11)</sup> benutzt. Die hohe Säureempfindlichkeit der Allylphosphate, die in diesen Arbeiten nicht erwähnt wurde, macht wahrscheinlich, daß nur O. BAILLY mit der zuletzt angegebenen Reaktion Erfolg hatte. Orientierende Versuche, Dimethylallyl-phosphat in Anlehnung an diese Vorschrift zu gewinnen, ergaben keine präparativ brauchbaren Ergebnisse. Ebensowenig gelang die Darstellung aus dem Alkohol mit  $POCl_3$  durch nachfolgende Hydrolyse des Dichlorophosphorsäureesters<sup>12)</sup>.

Diese Erfahrungen führten dazu, die Reaktivität der Allylgruppierung durch die Bromierung der Doppelbindung vorübergehend aufzuheben. Dimethylallylalkohol (V), durch Reduktion von Dimethylacrylsäure mit  $LiAlH_4$  erhalten, wurde in 3-Methyl-2.3-dibrom-butanol (VI)<sup>13)</sup> übergeführt und nachfolgend zum Phosphorsäureester VII umgesetzt. In der festen Bindung der Phosphorsäure ist VII mit den gesättigten Alkylphosphaten vergleichbar. Die Bindung des Halogens jedoch ist labil; bereits Umkristallisieren des Dicyclohexylammoniumsalzes aus siedendem Wasser/Aceton führte zur Hydrolyse, wobei mutmaßlich  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-glycerin- $\alpha$ -phosphat entstand. Eine Stütze für diese Auffassung ist die von O. BAILLY<sup>14)</sup> beschriebene Hydrolyse des Allylphosphat-dibromids zu  $\alpha,\alpha'$ -Monoglycerinmonophosphorsäure.

Von den zur Entfernung vicinaler Halogenatome brauchbaren Agenzien führt  $LiAlH_4$ <sup>15, 16)</sup>, wie P. KARRER und E. JUCKER an Cetylphosphat zeigen konnten<sup>17)</sup>, zur reduktiven Spaltung der Phosphorsäureester. Mit  $NaJ$  in Aceton<sup>18)</sup> wurde auch nach langem Kochen kein „säurelabiles Phosphat“ gebildet; VI gibt unter gleichen Bedingungen eine glatte Umsetzung. Für die Reduktion unbrauchbar waren auch  $Zn$  und  $Mg$ <sup>19)</sup> in inerten organischen Lösungsmitteln. Erst Natriumamalgam bei 0° in neutraler Lösung regenerierte die Doppelbindung. Das im Verlauf der Reduktion entstehende  $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allylphosphat (VIII) ist säurelabil. Der Fortgang der Entbromung läßt sich durch Messung des „labilen Phosphats“, d. i. des beim Ansäuern durch Hydrolyse rasch in Freiheit gesetzten anorganischen Phosphats verfolgen (vgl. Abbild. 1, S. 177).

Für den Nachweis, daß die Lösung VIII und nicht dessen Spaltprodukte enthält, dienen zwei Methoden: Die papierelektrophoretische Untersuchung, bei der sich VIII durch langsamere Wanderung zur Anode und die Entfärbung von  $KMnO_4$  vom anorganischen Phosphat

8) *Angew. Chem.* **71**, 775 [1959].

9) M. J. CAVALIER, *Bull. Soc. chim. France* [3] **13**, 885 [1895].

10) F. ZETSCHE und M. NACHMANN, *Helv. chim. Acta* **8**, 943 [1925].

11) O. BAILLY, *Bull. Soc. chim. France* [4] **26**, 254 [1919].

12) Vgl. L. N. WHITEHILL und R. S. BARKER, *Amer. Pat.* 2 394 829 [1946]; *C. A.* **1946**, 2454.

13) A. COURTOT, *Bull. Soc. chim. France* [3] **35**, 662 [1906].

14) *Bull. Soc. chim. France* [4] **29**, 280 [1921].

15) L. W. TREVOY und W. G. BROWN, *J. Amer. chem. Soc.* **71**, 1675 [1949].

16) W. J. ADAMS, V. PETROW und R. ROYER, *J. chem. Soc. [London]* **1951**, 678.

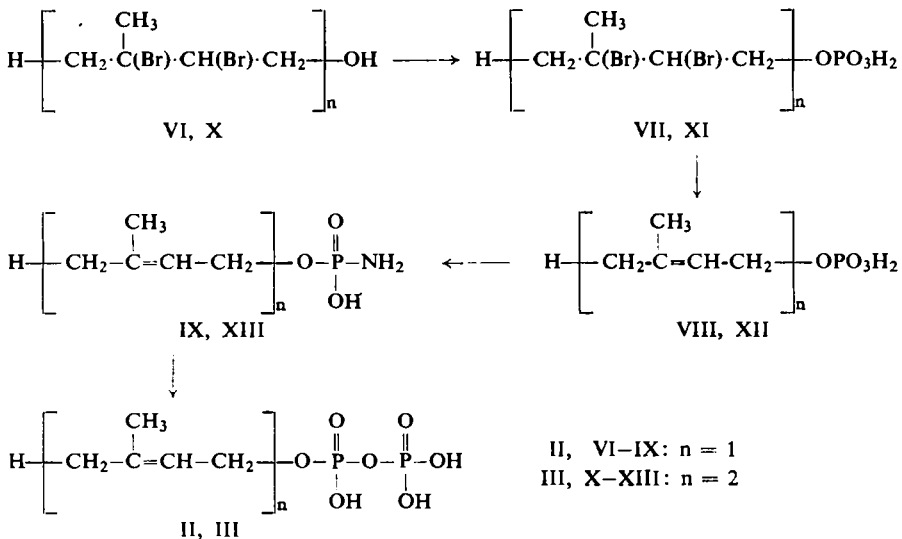
17) *Helv. chim. Acta* **35**, 1586 [1952].

18) Vgl. T. L. DAVIS und R. HEGGIE, *J. org. Chemistry* **2**, 470 [1937].

19) J. v. BRAUN, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **54**, 618 [1921].

unterschied, sowie die Bromierung der Reduktionslösung vor der Phosphatbestimmung, worauf kein „labiles Phosphat“ mehr nachweisbar war.

Der Ester VIII wurde als Na-Salz isoliert und nach der Methode von R. W. CHAMBERS und J. G. MOFFATT<sup>20)</sup> mit Dicyclohexylcarbodiimid und Ammoniak in Phosphorsäure- $[\gamma,\gamma$ -dimethyl-allylester]-amid (IX) umgewandelt. Dessen Reaktion mit Phosphorsäure analog zur Methode von J. G. MOFFATT und H. G. KHORANA<sup>21)</sup> ergab  $\gamma,\gamma$ -Dimethylallyl-pyrophosphat (II).



Während für die Darstellung von II der sterische Verlauf der Addition und Abspaltung des Halogens wegen der Symmetrie des Moleküls unwichtig ist, ist er für die des *trans*-konfigurierten Geranyl-pyrophosphats bedeutungsvoll. Die Halogenaddition<sup>22)</sup> an die olefinische Doppelbindung, wie auch die Abspaltung<sup>23)</sup>, nehmen einen *trans*-Verlauf, so daß sich Geranyl-pyrophosphat auf analogem Weg darstellen ließ: Tetrabromgeraniol (X)<sup>24)</sup> wurde mit  $\text{POCl}_3$  in Tetrabromgeranyl-phosphat (XI) übergeführt und nach Reduktion zu Geranyl-phosphat (XII) analog zur Darstellung von II über das Amid XIII in Geranyl-pyrophosphat (III) umgewandelt.

Die Identität von Dimethylallyl-pyrophosphat (II) mit der aus Isopentenyl-pyrophosphat (I) enzymatisch gebildeten Substanz gab sich im gleichen papierelektrophoretischen Verhalten und durch das Freiwerden von Pyrophosphorsäure beim Ansäuern zu erkennen. Mit der synthetischen Verbindung ließ sich die Reversibilität der enzymatischen Isomerisierung von I zu II<sup>25)</sup> und damit die Schlüsselstellung der Iso-

<sup>20)</sup> J. Amer. chem. Soc. **80**, 3752 [1958].

<sup>21)</sup> J. Amer. chem. Soc. **80**, 3756 [1958].

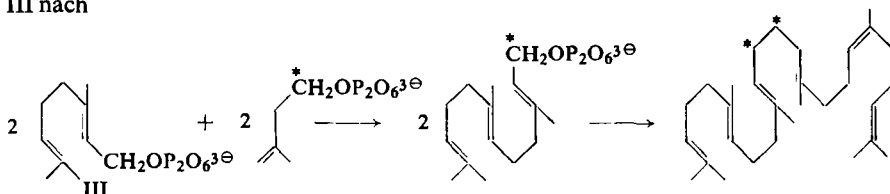
<sup>22)</sup> L. P. HAMMETT, Physical organic chemistry, S. 147 ff., McGraw-Hill Book Co., New York-London 1940.

<sup>23)</sup> S. WINSTEIN, D. PRESSMAN und G. W. YOUNG, J. Amer. chem. Soc. **61**, 1645 [1939].

<sup>24)</sup> H. v. SODEN und W. TREFF, Ber. dtsh. chem. Ges. **39**, 913 [1906].

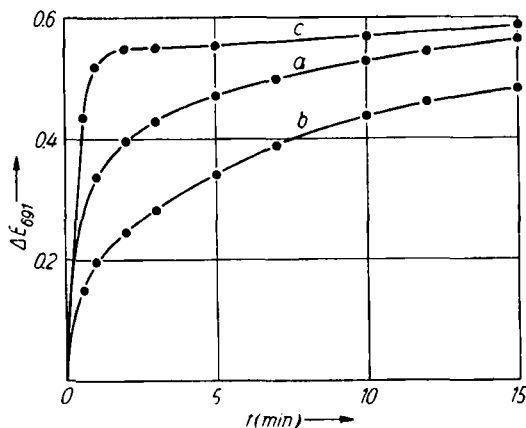
<sup>25)</sup> B. W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNING und F. LYNEN, J. biol. Chemistry **235**, 326 [1960].

merasereaktion für die biologische Terpensynthese beweisen<sup>2)</sup>. Bei der Inkubation von II mit  $\Delta^3$ -Isopentenyl-pyrophosphat-[1-<sup>14</sup>C] und Synthetase entstand neben Farnesyl-pyrophosphat auch der Pyrophosphorsäureester des Geraniols (III)<sup>2)</sup>. Synthetisches III ließ sich in Gegenwart von Isopentenyl-pyrophosphat-[1-<sup>14</sup>C] und Enzym, je nach den Versuchsbedingungen, in Farnesyl-pyrophosphat oder in Squalen umwandeln<sup>2)</sup>. Die enzymatische Synthese des Squalens aus Isopentenyl-pyrophosphat-[1-<sup>14</sup>C] und III nach



wurde auch zur Ermittlung der Verseifungskonstante von III herangezogen (vgl. Versuchsteil).

Das chemische Verhalten der Allylphosphate und -pyrophosphate ist durch die rasche saure Hydrolyse gekennzeichnet. Sie verläuft, wie mit II gezeigt werden konnte<sup>7)</sup>, unter teilweiser Allylumlagerung. Die Empfindlichkeit gegenüber Säuren gibt sich in der Phosphatbestimmung nach FISKE-SUBBAROW<sup>26)</sup> unmittelbar zu erkennen:



Abbild. 1. Kinetik der Farbentwicklung von Dimethylallyl-phosphat (VIII), Geranyl-phosphat (XII) und anorganischem Phosphat bei der Phosphatbestimmung nach FISKE-SUBBAROW, ausgeführt nach der Modifikation von FLYNN und Mitarbb.<sup>27)</sup>. (0.1 ccm Meßlösung, 0.25 ccm 2.5-proz. Ammoniummolybdat in 5*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.10 ccm Eiconogenlösung<sup>27)</sup>, 2.05 ccm Wasser. Vol. 2.50 ccm, Küvette: *d* = 2 cm,  $\lambda$  = 691 m $\mu$ , Photometer Eppendorf.)

Kurve a) 0.2  $\mu$ Mol VIII } bei unmittelbarer Entwicklung mit Eiconogen  
 Kurve b) 0.2  $\mu$ Mol XII }  
 Kurve c) 0.2  $\mu$ Mol anorganisches Phosphat, VIII oder XII bei der Entwicklung nach 5 Min. langer Vorinkubation mit der ammoniummolybdathaltigen Schwefelsäure

<sup>26)</sup> C. H. FISKE und Y. SUBBAROW, J. biol. Chemistry **66**, 375 [1925].

<sup>27)</sup> R. M. FLYNN, M. E. JONES und F. LIPMANN, J. biol. Chemistry **211**, 793 [1954].

Wie Phosphokreatin, Ribose-1-phosphat und die Acylphosphate<sup>28)</sup> werden die Allylphosphate mit dieser Methode wegen der raschen Hydrolyse als anorganisches Phosphat gemessen. Aus Abbild. 1 läßt sich dieser Befund aus dem kinetischen Vergleich der Farbentwicklung von Dimethylallyl- und Geranyl-phosphat mit anorganischem Phosphat ablesen.

Um die Verseifungskonstante zu ermitteln, wurde die Hydrolyse durch Bromierung (dabei werden die „säurelabilen“ Allylphosphate in die von der FISKE-SUBBAROW-Methode nicht erfaßbaren „säurestabilen“ Dibromverbindungen übergeführt) abgestoppt und die Konzentration des anorganischen Phosphats bestimmt.

RG-Konstanten der sauren Hydrolyse von Phosphorsäureestern

Ester	$n$ HCl	$k$ [min <sup>-1</sup> ] <sup>a)</sup>	$\tau_{1/2}$ [min]	$k_s = k/H^{\oplus}$
$\gamma$ , $\gamma$ -Dimethylallyl-phosphat (VIII)	1.0	1.06	0.65	1.06
$\gamma$ , $\gamma$ -Dimethylallyl-phosphat (VIII)	0.5	0.51	1.37	1.02
$\gamma$ , $\gamma$ -Dimethylallyl-phosphat (VIII)	0.1	0.10	6.70	1.03
Geranyl-phosphat (XII)	1.0	0.71	0.98	0.71
Geranyl-phosphat (XII)	0.5	0.33	2.12	0.66
Geranyl-phosphat (XII)	0.1	0.067	10.20	0.67
Geranyl-pyrophosphat (III)	0.1	0.41	1.71	4.05

<sup>a)</sup>  $k$  graphisch ermittelt.

Aus der Tab. läßt sich entnehmen, daß die Verseifungsgeschwindigkeit wie bei den meisten organischen Phosphorsäureestern<sup>28)</sup> unterhalb von  $p_H$  1 der Wasserstoffionenkonzentration praktisch proportional ist und daß Geranyl-phosphat etwas stabiler ist als die Dimethylallylverbindung. Mit der gleichen Meßanordnung ließ sich zeigen, daß die Verbindungen gegen Alkali stabil sind: In  $n/_{10}$  NaOH wurde bei 100° im Verlauf von 60 Min. kein anorganisches Phosphat freigesetzt. Aus der Tab. läßt sich auch ersehen, daß die mittels der erwähnten enzymatischen Kondensation gemessene Verseifung von III rund sechsmal rascher verläuft als die von XII.

Bemerkenswert ist, daß auch Geranyl-pyrophosphat in  $n/_{10}$  NaOH bei 100° im Verlauf von 30 Min. keine meßbare Verseifung erleidet, was für die Isolierung aus biologischem Material bedeutungsvoll sein kann. Die Allylphosphate schließen sich mit ihrer Beständigkeit gegenüber Alkali den normalen Alkylphosphaten<sup>29)</sup> an.

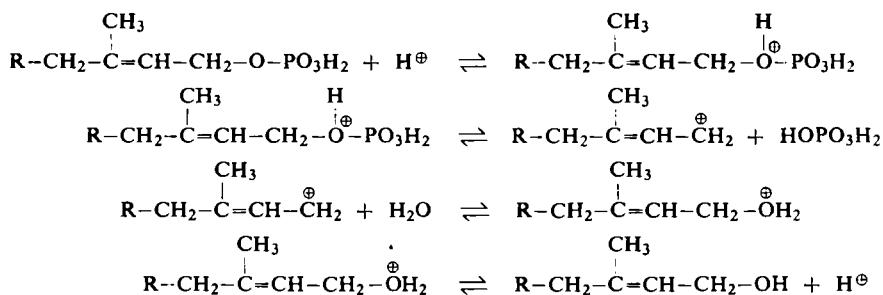
Die saure Hydrolyse organischer Phosphate kann mono- oder bimolekular und sowohl unter Lösung der P—O- als auch der C—O-Bindung erfolgen<sup>30)</sup>. Folgende experimentellen Befunde legen nahe, daß die saure Hydrolyse unimolekular unter Lösung der C—O-Bindung stattfindet: a) Säurekatalyse; b) Beeinflussung der Verseifungsgeschwindigkeit durch polare Gruppen (Erhöhung der Verseifungsgeschwindigkeit beim Übergang vom Geranyl-phosphat zum polareren Geranyl-pyrophosphat) c) Nachweis der Allylumlagerung, wie er an Dimethylallyl-pyrophosphat erbracht

<sup>28)</sup> L. F. LEOIR und C. E. CARDINI, „Characterization of phosphorous compounds by acid lability“ in S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 3, S. 840, Academic Press, New York 1957.

<sup>29)</sup> G. M. KOSOLAPOFF, *Organophosphorous Compounds*, John Wiley & Sons, New York 1950, S. 233.

<sup>30)</sup> C. A. VERNON, „The mechanism of hydrolysis of organic phosphates“ in „Phosphoric Esters and Related Compounds“, Special Publication No. 8, London: The Chemical Society 1957, S. 24 ff.

wurde<sup>7)</sup>. Für den Mechanismus der sauren Hydrolyse der Allylphosphate wird dadurch die Reaktionsfolge (Mechanismus  $A_{AL}$  nach INGOLD<sup>31)</sup>) wahrscheinlich gemacht:

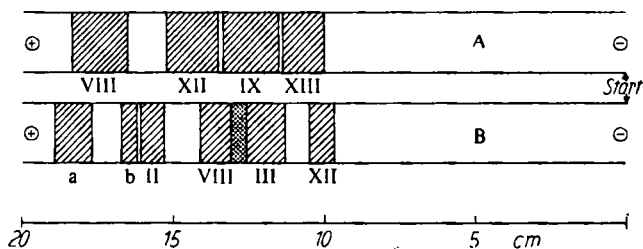


Nach VERNON<sup>30)</sup> erfolgt auch die saure Hydrolyse von  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat und einer Reihe von Glucosiden unter Heterolyse über ein Carboniumion.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Analysen wurden von Herrn Dr. E. PASCHER, Bonn und Herrn H. SCHULZ, Institut für Organische Chemie der Universität München, ausgeführt. Die Schmp. sind unkorrigiert. Für die Radioaktivitätsmessungen stand der Flüssigkeits-Scintillationszähler „Tri-Carb“, Packard Instrument Company, La Grange, Illinois, zur Verfügung. Papierelektrophoresen wurden mit dem von WIELAND und PFLEIDERER entwickelten Hochspannungspherograph, Modell „Frankfurt“, Fa. Hormuth-Vetter, Heidelberg, durchgeführt.

Die Phosphatanalysen erfolgten, wie bei Abbild. 1, S. 177 angegeben. Ein Gemisch von anorg. Phosphat, Allyl-phosphat und -pyrophosphat läßt sich wie folgt bestimmen: Die Analyse auf anorganisches Phosphat ( $P_a$ ) erfaßt auch das Allylphosphat ( $P_{al}$ ):  $P_x = P_a + P_{al}$ . Allylpyrophosphat wird beim Ansäuern unter Bildung von Pyrophosphorsäure hydrolysiert, die von der Messung nicht erfaßt wird. Bromiert man ein Aliquot vor der Phosphatbestimmung (vgl. S. 184), so wird nur das wirkliche anorganische Phosphat gemessen, woraus sich das Allylphosphat ergibt:  $P_{al} = P_x - P_a$ . Erhitzt man einen weiteren aliquoten Anteil in  $n$  HCl 10 Min. lang auf  $100^\circ$ , so wird die aus dem Allylpyrophosphat ( $PP_{al}$ ) freigesetzte



Abbild. 2. Papierelektrophoretische Trennung von Allylphosphorsäure-Derivaten. Die Fraktionen sind durch die röm. Formelnummern gekennzeichnet.

Streifen A: (Papiersorte: Whatman 1, Puffer:  $m/20$  Phosphat,  $p_H$  7.5, 48 Vcm<sup>-1</sup>, 60 Min., Entwicklung der Substanzen mit 0.1-proz. KMnO<sub>4</sub>-Lösung).

Streifen B: (Papiersorte: Schleicher & Schüll 2040 b mit HCl gewaschen, Puffer: Pyridin/Acetat,  $p_H$  6.2, 47 Vcm<sup>-1</sup>, 90 Min.). a = Pyrophosphorsäure; b = Orthophosphorsäure

<sup>31)</sup> C. K. INGOLD, Structure and Mechanism of Organic Compounds, Cornell University Press, Ithaca, New York 1953, S. 779.

Pyrophosphorsäure zur Orthophosphorsäure hydrolysiert<sup>26)</sup>. Die Phosphatanalyse dieser Probe ( $P_y$ ) erlaubt die Ermittlung des Allylpyrophosphats:  $P_{PPal} = P_y - P_x$ .

Die Papierelektrophorese bewährte sich als analytisches Hilfsmittel. In Abbild. 2 findet sich die Trennung zweier Substanzgemische schematisch abgebildet.

Für die Entwicklung wurde der Streifen B sowohl mit  $KMnO_4$ , wie auch nach C. S. HANES und F. A. ISHERWOOD<sup>32)</sup> mit Ammoniummolybdat/Perchlorsäure besprüht. Orthophosphorsäure gibt damit sofort einen gelben Fleck<sup>32)</sup>, die Allylphosphate werden durch das stark saure Reagenz rasch hydrolysiert und verhalten sich deshalb genau so, entfärben aber zusätzlich  $KMnO_4$ . Alkylphosphate werden erst im UV-Licht und zwar unter Blaufärbung sichtbar.

#### Entwicklung des Streifens B

	0.1-proz. $KMnO_4$ -Lösung	Ammoniummolybdat/UV Licht
a	—	blau
b	—	blau
II	+	blau
VIII	+	gelb
III	+	blau
XII	+	gelb

#### Darstellung des $\gamma,\gamma$ -Dimethylallyl-pyrophosphats (II)

*Dimethylallylalkohol (V)*: Die Lösung von 30 g (0.3 Mol) *Dimethylacrylsäure* in 100 ccm absol. Tetrahydrofuran wurde unter Rühren innerhalb von  $1\frac{1}{2}$  Stdn. mit 236 mMol  $LiAlH_4$  in 295 ccm Tetrahydrofuran versetzt, anschließend  $\frac{1}{2}$  Stde. unter Rückfluß erhitzt und nach Kühlen auf 0° mit 50 ccm Wasser langsam hydrolysiert. Das Hydrolysat enthielt Spuren Aldehyd, erkenntlich an der Reaktion mit 2.4-Dinitro-phenylhydrazin und  $NaOH$ <sup>33)</sup>; zur Entfernung wurde durch einstündiges Rühren mit 10 ccm wäßr. 0.1 M  $KBH_4$  bei Raumtemperatur nachreduziert. Nach Zusatz von 50 g Ammoniumchlorid, Neutralisation mit verd. Salzsäure, Dekantieren und Waschen mit 50 ccm Äther, löste man den Hydroxydniederschlag in verd. Salzsäure, schüttelte mit 3 mal 50 ccm Äther aus und trocknete die vereinigten Extrakte nach Waschen mit Natriumcarbonatlösung und Wasser über Natriumsulfat. Abddestillieren des Lösungsmittels und Fraktionierung des Rückstandes lieferte 15.5 g mit Sdp. 137–140°, die, durch Destillation gereinigt, 13.5 g (52% d. Th.) vom Sdp. 139–140° ergaben. Das *Phenylurethan* schmolz nach Umkristallisieren aus Petroläther bei 64–65° (Lit.<sup>13)</sup>: Sdp. 140°; Phenylurethan-Schmp. 65°).

*2.3-Dibrom-3-methyl-butanol-(1) (VI)*: Der Lösung von 4.3 g (50 mMol) *V* in 10 ccm absol. Chloroform ließ man bei  $-10^\circ$  innerhalb von 15 Min. unter Rühren 8.0 g (50 mMol) *Brom* in 10 ccm absol. Chloroform zutropfen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abgezogen, der Rückstand mit absol. Petroläther digeriert. 10.1 g farblose Nadeln (90% d. Th.), die nach Umlösen aus Petroläther Schmp. 35–38° zeigten (Lit.<sup>13)</sup>: Schmp. 37–38°).

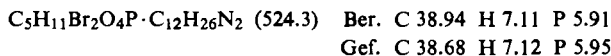
*2.3-Dibrom-3-methyl-butyl-phosphat (VII)*: Die Lösung von 2.46 g (10 mMol) *VI* und 4.55 g absol. Triäthylamin (45 mMol, 6.28 ccm) in 10 ccm absol. Chloroform wurde innerhalb von 15 Min. unter Feuchtigkeitsabschluß und Rühren mit 4.6 g  $POCl_3$  (30 mMol, 2.73 ccm) in 5 ccm absol. Chloroform versetzt. Nach weiteren 10 Min. bei  $-50^\circ$  und 5 Stdn. Rühren bei Raumtemp. ließ man den braunen Kolbeninhalt auf 50 g Eis tropfen und machte bei 0° mit 5 N KOH eben phenolphthaleinalkalisches. Das Triäthylamin wurde mit 5 mal 30 ccm Äther ausgeschüttelt, wobei der  $pH$ -Wert mit 5 N KOH jeweils nachgestellt wurde. Dann wurde mit

<sup>32)</sup> Nature [London] 164, 1107 [1949].

<sup>33)</sup> T. E. FRIEDEMANN und G. E. HAUGEN, J. biol. Chemistry 147, 415 [1943].

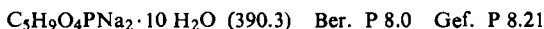
Ammoniumchlorid gesättigt und bei 0° mit 5 *n* HCl angesäuert, wobei Trübung und Ölabscheidung erfolgte. Nach Aufnehmen in insgesamt 150 ccm Essigester wurde die organische Phase gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde tropfenweise mit *Cyclohexylamin* neutralisiert, wobei das *Bis-cyclohexylammoniumsalz von VII* in Nadeln kristallisierte. Absaugen, Waschen mit Äther und Trocknen i. Vak. gab 3.0 g (57% d. Th.) mit Schmp. 148–155° (Zers.).

Das Salz löst sich leicht in Methanol und wasserfreiem Aceton, schwer in Wasser und Alkohol, gar nicht in Essigester, Äther, Petroläther. Mit salpetersaurer AgNO<sub>3</sub>-Lösung wird rasch AgBr gefällt. Zur Umkristallisation wurde die gesättigte, wäbr. Lösung mit Aceton bis zur Trübung versetzt und auf 0° gekühlt, oder die acetonische Lösung mit einigen Tropfen Wasser versetzt.



In siedendem Aceton/Wasser (6:1) kommt es zur Hydrolyse des Bromids, der Schmp. steigt auf 200° (Zers.), der Phosphatgehalt nimmt zu. Die Reduktion ergab nur noch 25% VIII.

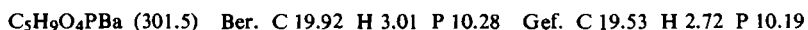
*γ,γ-Dimethylallyl-phosphat (VIII)*: Die auf 0° gekühlte Suspension von 2.63 g (5 mMol) VII in 40 ccm Wasser wurde unter Rühren und Einleiten von CO<sub>2</sub> nach und nach mit 69 g (60 mg-Atome Na) 2-proz. Natriumamalgam versetzt, der Verlauf der Reduktion durch Phosphatanalyse kontrolliert. Bei Reduktionsende: Gef. 4.82 mMol VIII (96% d. Th.). Nach Abtrennen des Quecksilbers wurde das vierfache Vol. Alkohol zugesetzt, zentrifugiert und das abgeschiedene NaHCO<sub>3</sub> mit 3 mal 20 ccm Alkohol gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden i. Vak. auf ca. 15 ccm eingeengt, mit Aceton bis zur Trübung versetzt und über Nacht bei 0° gehalten, wobei das Dinatriumsalz von VIII in Blättchen kristallisierte. Isolierung im Kühlraum, Waschen mit Aceton und Umkristallisieren aus Wasser/Aceton gab 1.72 g (79% d. Th.) Blättchen (Sint. bei 100°, Zers.-P. 200°), die nach Phosphatanalyse 10 Kristallwasser enthielten.



Verwittert beim Trocknen i. Vak. und ist dann hygroskopisch.

Das Salz löst sich leicht in Wasser und Methanol, nicht in Äthanol, Aceton, Essigester, Äther. Die wäbr. Lösung verbraucht KMnO<sub>4</sub> und Brom, mit Magnesiumuranylacetat bildet sie die Prismen des Na-Salzes. Löst man aliquote Anteile VIII in Wasser, *n*/<sub>10</sub> und *n* HNO<sub>3</sub> und neutralisiert die Lösungen anschließend, so fällt bei Einwirkung von AgNO<sub>3</sub> aus der nicht angesäuerten Lösung das farbl. Ag-Salz von VIII, aus der schwach angesäuerten ein gelbliches Salz und aus der stark angesäuerten ausschließlich Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Das wasserlösliche Li-Salz von VIII ist mit Alkohol fällbar.

*Bariumsalz*: Die Lösung von 1.56 g (4 mMol) Na-Salz von VIII in 10 ccm Wasser wurde tropfenweise mit 6 ccm *m* Bariumacetat versetzt, wobei das Ba-Salz von VIII in Blättchen kristallisierte. Zusatz von 15 ccm Alkohol, 1/2 stdg. Kühlen auf 0°, Absaugen, Waschen mit 75-proz. Alkohol, 96-proz. Alkohol, Aceton und Äther ergab silbrigglänzende Blättchen, die beim Trocknen i. Vak. zu 1.2 g (4 mMol) voluminösem Pulver, Schmp. > 250°, zerfielen. Schwerlösl. in Wasser.



*Phosphorsäure-[γ,γ-dimethyl-allylester]-amid (IX)*: 302 mg (1 mMol) Ba-Salz von VIII wurden in 1 ccm Wasser mit 145 mg (1.1 mMol) Ammoniumsulfat digeriert und zentrifugiert; das abgeschiedene Bariumsulfat wurde mit 3 mal 0.2 ccm Wasser gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden mit 0.33 ccm (5 mMol) 25-proz. Ammoniak, 1.03 g (5 mMol) Dicyclo-



hexylcarbodiimid und 10 ccm tert.-Butylalkohol 10 Stdn. im Druckgefäß bei 80° gehalten, über Nacht bei Raumtemp. aufbewahrt und vom abgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff durch Absaugen befreit. Nach Abziehen des tert.-Butylalkohols i. Vak. und Ausschütteln mit 3 mal 20 ccm Äther wurde die wäßr. Lösung i. Vak. zur Trockene eingeeengt, der Rückstand mit 2 mal 10 ccm Aceton i. Vak. eingedampft, dann bei 0.5 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> scharf getrocknet. Beim Anreiben mit wenig Aceton kristallisierte das *Dicyclohexylguanidiniumsalz von IX*. Absaugen, Waschen mit Äther und Trocknen i. Vak. ergab 235 mg (60% d. Th.) mit Schmp. 156–161°. Das Salz, das erst nach kurzem Erwärmen mit verd. Salzsäure positive Nebler-Reaktion ergab, löst sich in Wasser und Alkohol, nicht in Aceton, Essigester, Äther und läßt sich aus Tetrahydrofuran zu Blättchen, Schmp. 162–163° umkristallisieren.

C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>P·C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub> (388.5) Ber. N 14.42 P 7.98 Gef. N 14.39 P 8.18

*γ,γ-Dimethylallyl-pyrophosphat (II)*: Die homogene Lösung von 389 mg (1 mMol) *IX*, 1.15 g (10 mMol) 85-proz. *Phosphorsäure*, 3 ccm *o*-Chlorphenol und 4 ccm Pyridin (*p<sub>H</sub>* ca. 5) wurde 4 Tage bei Raumtemp. aufbewahrt, dann mit konz. Ammoniak bei 0° schwach alkalisch gemacht und mit Aceton auf 100 ccm aufgefüllt. Das dabei gefällte Ammoniumsalzmischung (1.3 g anorg. Phosphat, VIII und II) wurde zur Entfernung des anorg. Phosphats in 25 ccm Wasser gelöst und tropfenweise mit 10 ccm 4 *n* LiOH versetzt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert, mit 5 mal 3 ccm Wasser gewaschen; nach Einengen der Lösungen i. Vak. auf ca. 5 ccm wurden die Allylphosphate VIII und II mit 50 ccm Alkohol gefällt. Zentrifugieren, Waschen mit 90-proz. Alkohol bis zur Neutralreaktion des Eluats und Trocknen i. Vak. gab 180 mg Li-Salzmischung, das durch Digerieren in 2 ccm Wasser, Zentrifugieren und Waschen mit 3 mal 0.3 ccm Wasser in Lösung gebracht und vollständig vom anorg. Phosphat getrennt wurde. Neutralisieren der Lösung bei 0° mit 2 *n* Essigsäure bis zum Umschlag von Phenolphthalein, tropfenweiser Zusatz von 2 ccm *m* Bariumacetat, Zentrifugieren und Waschen mit 5 mal 0.5 ccm Wasser, 50-proz. Alkohol, 96-proz. Alkohol und dann Äther gab nach dem Trocknen i. Vak. 165 mg Ba-Salz, das 225 μMol (22.5 % d. Th.) von *II*, das als Verunreinigung 49 μMol VIII und etwas BaCO<sub>3</sub> enthielt. (Die Mutterlauge enthielt 330 μMol VIII und 42 μMol II.)

### *Darstellung des Geranyl-pyrophosphats (III)*

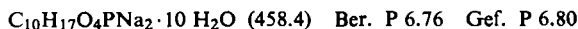
*Tetrabromgeraniol (X)*: Käufliches Geraniol (Light & Co., Hamburg) wurde über die Calciumchloridverbindung gereinigt und destilliert. Sdp.<sub>12</sub> 110–112°. Die Lösung von 4.62 g (30 mMol) *Geraniol* in 20 ccm Chloroform wurde mit 9.6 g (60 mMol, 3.06 ccm) *Brom* in 10 ccm absol. Chloroform, wie bei VI angegeben, umgesetzt und aufgearbeitet. Der Bromverbrauch betrug 85% d. Th. Die Kristallisation aus Äther/Petroläther<sup>24</sup>) gab 6.1 g (43% d. Th.) Nadeln, Schmp. 65–68° (Lit<sup>24</sup>): Schmp. 70–71°).

*Tetrabromgeranyl-phosphat (XI)*: Die Lösung von 4.74 g (10 mMol) *X* und 4.55 g (45 mMol, 6.28 ccm) absol. Triäthylamin in 10 ccm absol. Chloroform wurde mit 4.6 g (30 mMol, 2.73 ccm) POCl<sub>3</sub> in 5 ccm absol. Chloroform, wie bei VII angegeben, umgesetzt und aufgearbeitet. Nach Aufnahme in 60 ccm Essigester und Waschen wurde über Natriumsulfat kurz getrocknet, die wassergesättigte Lösung mit Cyclohexylamin neutralisiert und auf 0° gekühlt, wobei das *Bis-cyclohexylammoniumsalz von XI* in Nadeln kristallisierte. Absaugen, Waschen mit Petroläther und Trocknen i. Vak. gab 4.3 g (57% d. Th.) mit Schmp. 125–129°.

Das Salz löst sich leicht in Methanol, Äther, Aceton, wasserfreiem Essigester, schwer in Äthanol, nicht in Wasser, Petroläther. Zum Umlösen wurde die Essigesterlösung mit Wasser gesättigt: Nadeln mit Schmp. 131–132°.

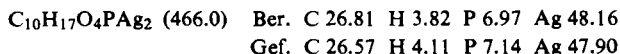
C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>4</sub>P·C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub> (752.2) Ber. C 35.13 H 6.03 P 4.12  
Gef. C 34.93 H 6.24 P 4.14

*Geranyl-phosphat (XII)*: 3.76 g (5 mMol) *XI* wurden, in 100 ccm Methanol gelöst, mit 128 g (120 mg-Atome Na) 2-proz. Natriumamalgam, wie bei VIII angegeben, reduziert. Einengen der Lösung und scharfes Trocknen i. Vak. gab ca. 8 g Rückstand, der dreimal aus Wasser, nachfolgend aus Wasser/Aceton umkristallisiert, 1.45–1.61 g (65–70% d. Th.) papierelektrophoretisch reiner Blättchen ergab, die nach Phosphatanalyse wie VIII als Decahydrat vorlagen.



Das Salz löst sich leicht in Methanol, schwer in Wasser und Äthanol, nicht in Chloroform, Äther. Aus seiner wäbr. Lösung wird das Ba- und Ca-Salz amorph, das Li-Salz kristallin abgeschieden.

*Silbersalz*: In die Lösung von 1.38 g (3 mMol) des *Na-Salzes von XII* in 30 ccm Wasser ließ man 2 ccm 5 n  $\text{AgNO}_3$  eintropfen, saugte das auskristallisierte Salz ab, wusch mit Wasser, 50-proz. Alkohol, 96-proz. Alkohol, dann mit Äther und trocknete i. Vak.: 1.42 g (95% d. Th.).

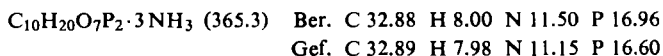


*Phosphorsäure-geranylester-amid (XIII)*: 466 mg (1 mMol) *Ag-Salz von XII* wurden mit 118 mg (2.2 mMol)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 1.5 ccm Wasser digeriert, zentrifugiert, das abgeschiedene  $\text{AgCl}$  mit 3 mal 0.2 ccm Wasser gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden wie bei IX mit Dicyclohexylcarbodiimid und *Ammoniak* umgesetzt und aufgearbeitet. Bei der Entfernung des tert.-Butylalkohols i. Vak. schied sich XIII als Schmiere ab. Anreiben mit Aceton, Absaugen von Dicyclohexylharnstoff und Einengen der Lösung i. Vak. ergab XIII als glasigen Lack. Eine Probe davon wurde in alkoholischer NaOH gelöst und mit Aceton bis zur Trübung versetzt: Blättchen, die aus 90-proz. Alkohol/Aceton umkristallisiert wurden.



Das Salz löst sich leicht in Wasser, Methanol, aber nicht in Aceton oder Essigester. Rohprodukt und krist. Salz verhalten sich papierelektrophoretisch und gegen Neßler-Reagenz identisch. In der Phosphatbestimmung nach FISKE-SUBBAROW verhält sich XIII wie XII. Für die Darstellung des Pyrophosphats III wurde das Rohprodukt des Bis-cyclohexylammoniumsalzes von XIII verwendet.

*Geranyl-pyrophosphat (III)*: Der Amidrückstand XIII (theor. 1 mMol) wurde, wie bei II angegeben, mit *Phosphorsäure* umgesetzt und zu 1.5 g Ammoniumsalzgemisch (anorg. Phosphat, XII und III) aufgearbeitet. Die Li-Salze von XII und XIII sind in Wasser schwerlöslich, die bei II angewandte Trennung ist deshalb unbrauchbar. Die Reinigung gelang durch Fällung mit Methanol und Aceton: 1.5 g Salzgemisch in 4 ccm Wasser,  $p_{\text{H}}$  8, wurden zur Entfernung des anorg. Phosphats mit 20 ccm Methanol versetzt, zentrifugiert und mit 3 mal 2 ccm Methanol gewaschen. Die Lösung (25 ccm) enthielt 135  $\mu\text{Mol}$  anorg. Phosphat, 340  $\mu\text{Mol}$  XII und 354  $\mu\text{Mol}$  III. Durch Fällung mit 100 ccm Aceton wurde in Lösung verbleibendes XII abgetrennt. Wiederholung der Fällung aus Wasser/Methanol (1 : 10) entfernte das anorg. Phosphat; Zusatz des vierfachen Vol. Aceton zur methanol. Lösung führte zur Fällung von III. Anschließendes wiederholtes Umkristallisieren aus schwach ammoniakalischem Wasser/Aceton gab 72 mg (20% d. Th.) *Triammoniumsalz von III*: Blättchen mit Schmp. 120° (Kofler-App.).



Das Salz löst sich leicht in Wasser, gar nicht in Aceton, Äther, Petroläther.

*Messung der sauren Verseifung der Allylphosphate durch Phosphatbestimmung*

Gleiche Volumina auf 25° thermostatisierter Lösungen des Allylphosphats (ca. 3  $\mu\text{Mol}/\text{ccm}$ ) und der verwendeten Säure wurden zur Zeit  $t_0$  vereinigt, je 0.10 ccm davon zur Zeit  $t$  in 0.05 ccm 0.5  $m$  Bromlösung<sup>34)</sup> pipettiert und der Phosphatgehalt nachfolgend bestimmt:  $E_0$  = Leerwert;  $E_t$  = Extinktion, die der Hydrolyse zur Zeit  $t$ ,  $E_e$  = Extinktion, die ihr zur Zeit  $t_\infty$  entspricht.

$E_0$ : Das überschüssige Brom wird durch die Entwicklerlösung reduziert, so daß die Extinktion bei  $t_0$ , durch Bromierung von 0.05 ccm der nicht angesäuerten Allylphosphatlösung ermittelt, dem Leerwert (ohne Brom und Allylphosphat) gleich ist.

$E_t$ : Ist dem verseiften Anteil  $x$  der Gleichung  $kt = \ln [a/(a-x)]$  proportional.

$E_e$ : Der nach vollständiger Verseifung erhaltene Wert. Er ist gleich dem gemessenen „Gesamtposphat<sup>28)</sup>“ und entspricht der Anfangskonzentration  $a$  des Esters. Die Konstante  $k$  ist von der Konzentration unabhängig, für ihre Ermittlung können daher die korrigierten Extinktionen eingesetzt werden:

$$kt = 2.303 \log [E_e/(E_e - E_t)]$$

Verseifung von Dimethylallyl-phosphat in 0.1  $n$  HCl

$t$ [min]	$E_t$	$E_t$ (korr.)	$E_e - E_t$	$\log (E_e - E_t)$	$\log [E_e/(E_e - E_t)]$	$k$ [ $\text{min}^{-1}$ ]
0	130	0	430	2.633	0	
4	278	148	282	2.450	0.183	0.105
8	374	244	186	2.269	0.364	0.103
12	435	305	125	2.096	0.537	0.103
16	477	347	83	1.919	0.714	0.103
20	520	390	40	1.602	1.031	0.118
25	540	410	20	1.301	1.331	0.123
30	560	430	0			
40	560	430	0			

Die *alkalische Verseifung* wurde in gleicher Weise gemessen: 0.1 ccm der 0.1  $n$  alkalischen Lösung des Allylphosphats (ca. 2  $\mu\text{Mol}/\text{ccm}$ ) wurden zur Zeit  $t$  in 25  $\mu\text{Mol}$   $\text{Br}_2$  enthaltende 0.1 ccm 0.1  $n$  HCl pipettiert und der Phosphatbestimmung zugeführt. Bei 100° wurde innerhalb von 60 Min. kein anorgan. Phosphat freigesetzt.

*Messung der Verseifung von Geranyl-pyrophosphat (III) durch enzymatische Inkorporation in Squalen*

0.5 ccm wäßr. Lösung von Ammonium-geranyl-pyrophosphat (2  $\mu\text{Mol}/\text{ccm}$ ) und 0.5 ccm 0.2  $n$  HCl von 25° wurden zur Zeit  $t_0$  vereinigt und je 0.1 ccm davon zur Zeit  $t$  in 0.22 ccm einer als Stopper dienenden Lösung, enthaltend 20  $\mu\text{Mol}$  Trispuffer (HCl,  $p_H$  8), 6  $\mu\text{Mol}$   $\text{MgCl}_2$ , 6  $\mu\text{Mol}$   $\text{Mg}$ -Trilonat<sup>35)</sup>, 3  $\mu\text{Mol}$  Jodacetamid und 10  $\mu\text{Mol}$  NaOH, eingetragen. Die Proben wurden nach Zusatz von 0.04 ccm (0.38  $\mu\text{Mol}$ , 2840 Ipm)  $\Delta^3$ -Isopentenyl-pyrophosphat-[1-<sup>14</sup>C] mit 1 mg Serumalbumin, 0.4  $\mu\text{Mol}$  TPN, 2  $\mu\text{Mol}$  Glucose-6-phosphat, 20  $\gamma$  Zwischenferment, 0.1 ccm Hefepartikel und 75  $\gamma$  Synthetase zu dem für die Squalensynthese erforderlichen Ansatz ergänzt<sup>2)</sup> (Vol. 0.66 ccm) und 35 Min. bei 37° inkubiert. Dabei wurden die einzelnen Proben auf 37° thermostatisiert, im Abstand von je 30 sec durch Einpipettieren der Synthetase und der Hefepartikel gestartet, nach der Inkubation mit 0.05 ccm  $m/_{10}$  Squalen

<sup>34)</sup> R. ROTH in Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), Bd. II, S. 305, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1953.

<sup>35)</sup>  $\text{MgK}_2$ -Äthylendiamin-tetraacetat.

(in Petroläther) als Träger versetzt und mit 1 ccm 10-proz. Kalilauge in 70-proz. Methanol abgestoppt. Nach Zugabe von 3 ccm Methanol wurde jeder Ansatz mit 3 + 2 ccm Petroläther ausgeschüttelt und abpipettiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 2 ccm Wasser gewaschen, abpipettiert und in ihrer Radioaktivität nach Zusatz von 8 ccm Toluollösung (100 mg 2.5-Diphenyl-oxazol und 4 g 1.4-Bis-[5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol<sup>36)</sup> pro l) im Scintillationszähler gemessen.

Zur Ermittlung des Wertes bei  $t_0$  ( $I_{pm_0}$ ) wurde die angeführte Stopperlösung mit 0.05 ccm 0.2 *n* HCl neutralisiert und nach Zusatz des Isopentenyl-pyrophosphats-[1-<sup>14</sup>C] mit 0.1  $\mu$ Mol Geranyl-pyrophosphat, für die des Leerwertes (LW) die neutralisierte Lösung mit Isopentenyl-pyrophosphat-[1-<sup>14</sup>C], aber ohne Geranyl-pyrophosphat inkubiert. In der zur Bestimmung der Verseifungskonstante dienenden Gleichung  $kt = 2.303 \log (c_0/c)$  entspricht  $c_0$  dem Wert  $I_{pm_0}$  und  $c$  dem zur Zeit  $t$  gemessenen  $I_{pm_t}$ :  $kt = 2.303 \log (I_{pm_0}/I_{pm_t})$ .

$t$ [min]	1/5 min	korr.	$I_{pm_t}$	$\log I_{pm_t}$	$\log (I_{pm_0}/I_{pm_t})$	$k$ [ $\text{min}^{-1}$ ]
0	3333	3229	646	2.810	0	
0.5	2922	2818	564	2.751	0.059	0.272
1.0	2383	2279	455	2.658	0.152	0.350
1.5	1863	1759	352	2.546	0.264	0.405
2.0	1468	1364	273	2.436	0.374	0.430
2.5	1287	1183	237	2.374	0.436	0.402
3.0	1053	949	190	2.278	0.532	0.408
5.0	577	473	94.6	1.975	0.835	0.384
10.0	178	74	14.8	1.170	1.640	0.377
LW	104	0				

Die graphische Auswertung der Meßpunkte ergab  $k = 0.405$  [ $\text{min}^{-1}$ ], entspr.  $\tau_{1/2} = 1.71$  min. Unter der Annahme, daß die Beziehung  $k = k_s[\text{H}^{\oplus}]$ , die für die Allylphosphate in dem verwendeten  $p_{\text{H}}$ -Bereich Gültigkeit besitzt (s. Tab. S. 178), auch für die Allylpyrophosphate richtig ist, folgt für  $k_s = 4.05 \text{ min}^{-1}$  und für die Halbwertszeit in *n* Säure  $\tau_{1/2} = 28.5$  sec. Geranyl-pyrophosphat wird nach diesen Daten rund sechsmal rascher verseift als Geranylphosphat.

Die *alkalische Verseifung* wurde in  $n_{10}$  NaOH bei 100° ausgeführt und in gleicher Weise gemessen. Im Verlauf von 30 Min. konnte jedoch keine Abnahme der Squalensynthese gemessen werden. Geranyl-pyrophosphat ist also unter diesen Bedingungen stabil.

<sup>36)</sup> D. G. OTT in C. G. BELL und N. F. HAYES, Liquid Scintillation Counting, Pergamon Press, New York 1958, S. 101.