

27. Versuche zur Herstellung künstlicher Komplexantigene der Steroidreihe.

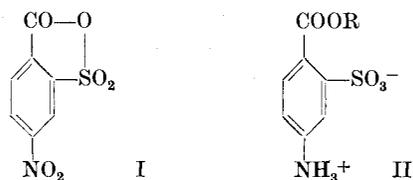
3. Mitteilung.

Die Kupplung von Δ^5 -3 β -Oxy-ätio-cholensäure-azid mit Eiweiss

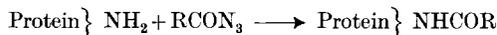
von C. A. Grob und W. A. Goldberg.

(18. XII. 48.)

Obschon im 4-Nitro-2-sulfo-benzoessäure-endoanhydrid (I) eine brauchbare Verbindung zur Synthese wasserlöslicher Steroidderivate gefunden wurde, eignet sich diese Methode nur in beschränktem Ausmasse zur Herstellung markierter Antigene nach der Diazoniummethode, indem die durch Reduktion erhaltenen Steroidester der 4-Amino-2-sulfo-benzoessäure (II, R = Steroidrest) nur schwer oder gar nicht zur Krystallisation zu bringen waren¹⁾. Die Verwendung der 4-Amino-phtalsäure als diazotierbare Komponente brachte auch keine Vorteile. Wir haben uns daher der Azidmethode²⁾ zugewandt, in der Meinung, auf diese Weise zu besser definierten Ausgangsmaterialien für die Kupplung mit Eiweiss zu gelangen.



Für diese Kupplungen, welche nach folgendem Schema verlaufen:



werden Säureazide benötigt, welche durch direkten Umsatz des entsprechenden Säurechlorids mit Natriumazid²⁾ oder durch Einwirkung von salpetriger Säure auf ein Säurehydrazid gewonnen werden können.

Da zunächst wiederum mit Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diol konjugierte Proteine gesucht wurden, war es nötig, ersteres in ein Derivat mit einer freien oder veresterten Carboxylgruppe überzuführen. Als solches haben wir den leicht zugänglichen Bernstein säure-halbesther III herangezogen. Diesen Δ^5 -Androsten-3 β , 17 β -diol-3-acetat-17-bernstein säurehalbesther³⁾ haben wir mit Thionylechlorid zum Säurechlorid IV

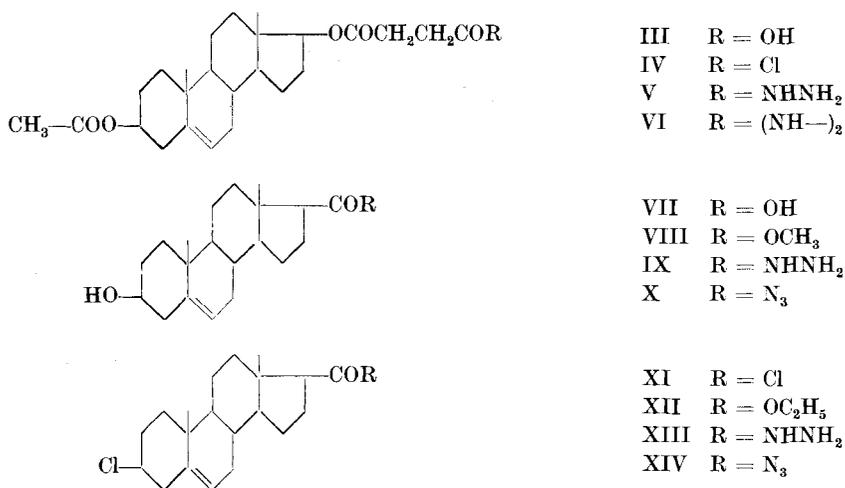
¹⁾ 1. und 2. Mitteilung, Helv. **32**, 172, 184 (1949).

²⁾ S. z. B. Butler, Harington und Yuill, Biochem. J. **34**, 831 (1940).

³⁾ Ruzicka, Goldberg und Grob, Helv. **24**, 1151 (1941).

umgesetzt. Letzteres wollten wir über das Hydrazid V in ein Azid überführen. Durch Schütteln einer Chloroformlösung des Säurechlorids IV mit wässriger Hydrazinlösung konnte aber statt des erwarteten Monohydrazids V nur das symmetrische Diacyl-hydrazid VI isoliert werden. Nach *Nägeli*¹⁾ lassen sich allerdings einfache Hydrazide durch Eintropfen einer ätherischen Lösung des Säurechlorids in eine alkoholische Lösung von überschüssigem Hydrazin darstellen. Die Anwendung dieses Verfahrens führte im obigen Falle zur Verseifung des Bernsteinsäure-halbesters durch das Hydrazin unter Bildung von Androstendiol und Bernsteinsäure-dihydrazid.

Diese unerwünschte Reaktion fällt natürlich bei Verbindungen, in denen die Carboxylgruppe direkt am Steroidgerüst haftet, weg. Wir haben darum die Δ^5 -3 β -Oxy-ätio-cholensäure (VII), welche am ehesten der Konfiguration des Δ^5 -3 β -Oxy-androstens entspricht, in das Azid X übergeführt, das uns für die Kupplung mit Proteinen geeignet schien. Dies um so mehr, als die vollständig negativen Immunisierungsergebnisse mit den Azoproteinen aus Steroidester der 4-Amino-2-sulfo-benzoesäure sich auch so deuten liessen, dass die Ester im Tierkörper rasch verseift und damit antigen unwirksam wurden²⁾. Bei konjugierten Proteinen, in denen der Δ^5 -3 β -Oxy-ätio-cholensäure-rest in säureamidartiger Bindung an Eiweiss haftet, war eine Verseifung im Tierkörper weniger zu erwarten. Immerhin bildeten Kaninchen auch gegen das Kupplungsprodukt des Δ^5 -3 β -Oxy-ätio-cholensäure-azids (X) keinen Antikörper³⁾, was stark gegen die potentielle Antigenität von körpereigenen Steroiden spricht.



¹⁾ *Nägeli*, *Helv.* **11**, 622 (1928).

²⁾ *Mooser* und *Grilichess*, *Schw. Z. Path. Bakt.* **4**, 375 (1941).

³⁾ Privatmitteilung von Prof. *H. Mooser*, Zürich.

Nach *Steiger* und *Reichstein*¹⁾ wurde aus der 3-Acetoxy-Verbindung die Δ^5 -3 β -Oxy-ätio-cholensäure (VII) und daraus der Methyl-ester VIII hergestellt. Unter Einhaltung gewisser Bedingungen liess sich dieser Ester glatt in das Hydrazid IX überführen, welches bei der Behandlung mit salpetriger Säure das Azid X lieferte. Dieses bei höherer Temperatur zersetzliche Azid X konnte mit Alkohol in ein Urethan übergeführt und damit charakterisiert werden. Ferner wurde die Reinheit des Azids durch Titration mit Kaliumhydroxyd geprüft, wobei nahezu die theoretisch erforderliche Menge Alkali nach der Gleichung:



verbraucht wurde. Die Kupplung des Azids an Pferdeserum erfolgte durch Lösen des Azids in Dioxan und Zugabe dieser Lösung zu mit Dioxan verdünntem Pferdeserum, wobei die bei der Kupplung freiwerdende Stickstoffwasserstoffsäure neutralisiert wurde. In Vorversuchen hatte sich ergeben, dass nach ca. 10 Minuten die theoretische Menge Alkali verbraucht, resp. die theoretische Menge HN_3 abgespalten war.

Das Kupplungsprodukt des Δ^5 -3 β -Oxy-ätio-cholensäure-azids (X) an Pferdeserum ist nicht wie die Azoproteine dunkel gefärbt. Es ist jedoch viel zähflüssiger und opaleszierender als das verwendete Serum. Auch besitzt es gegenüber diesem einen anderen isoelektrischen Punkt, der bei einem höheren p_{H} -Wert liegt. Eine analoge Kupplung wurde auch mit Kaninchenserum durchgeführt.

Es war vom biologischen Standpunkt aus von besonderem Interesse, ein Steroid-Antigen herzustellen, dessen markierende Gruppe für das Versuchstier bestimmt körperfremd sein würde. Wir wählten zu diesem Zwecke den Δ^5 -3-Chlor-androsten-rest, welchen wir in Form des Δ^5 -3-Chlor-ätio-cholensäure-azids (XIV) an Protein zu kuppeln hofften.

Aus früheren Versuchen²⁾ hatte sich ergeben, dass mit Thionylchlorid die Hydroxylgruppe in 3-Stellung des Androstengerüsts durch Chlor ersetzt werden kann. Es gelang auch Δ^5 -3 β -Oxy-ätio-cholensäure (VII) auf diese Weise direkt in das Δ^5 -3-Chlor-ätio-cholensäurechlorid (XI) überzuführen, welches ölig ist, dessen Identität aber durch Überführung in den Äthylester XII mit Äthanol belegt werden konnte. Das Säurechlorid XI wurde nach *Nägeli*³⁾ in das Hydrazid XIII übergeführt, welches aber zum Verlust von Chlorwasserstoff neigte und deshalb keine gut stimmenden Analysenwerte gab. Es liess sich ohne weiteres in der beschriebenen Weise mit salpetriger Säure in ein Azid XIV umwandeln, welches mit Eiweiss gekuppelt werden kann.

¹⁾ *Steiger* und *Reichstein*, *Helv.* **20**, 1049 (1937).

²⁾ S. 2. Mitteilung, *Helv.* **32**, 184 (1949).

³⁾ *Nägeli*, loc. cit.

Experimenteller Teil¹⁾.

Symmetrisches Hydrazid des Androstendiol-3-acetat-17-Bernsteinsäurehalbesters.

0,5 g Androstendiol-3-acetat-17-bernsteinsäurehalbester (III) wurden mit 1 g Thionylchlorid und 3 cm³ absolutem Chloroform 2 Stunden gelinde auf dem Dampfbad unter Rückfluss erwärmt. Der Überschuss des Thionylchlorids und das Chloroform wurden im Vakuum entfernt. Das Säurechlorid krystallisierte beim Stehen und schmolz bei 108—109°.

Dieses Säurechlorid wurde in 20 cm³ absolutem Chloroform gelöst und während einer Viertelstunde mit einem Gemisch von 1 g Hydrazinhydrat in 10 cm³ Wasser geschüttelt. Die Chloroformschicht wurde abgetrennt und mit einer Kaliumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen und Abdampfen des Chloroforms hinterblieben 0,4 g eines Produktes, welches nach fünfmaligem Umkrystallisieren aus Chloroform-Hexan bei 226,5—227,5° schmolz.

3,766 mg Subst. gaben 9,654 mg CO₂ und 2,840 mg H₂O
 C₅₀H₇₂O₁₀N₂ Ber. C 69,74 H 8,43% Gef. C 69,96 H 8,44%

Δ⁵-3 β-Oxy-ätio-choleensäure-hydrazid (IX).

3,85 g *Δ⁵-3 β-Oxy-ätio-choleensäure-methylester* wurden mit 10 cm³ reinem Hydrazinhydrat und 10 cm³ absolutem Alkohol versetzt und in einem Schliffrundkolben mit Rückflusskühler ohne Wasserdurchlauf im Ölbad erhitzt, wobei alles in Lösung ging. Die Temperatur des Ölbades wurde derart gesteigert, dass der Alkohol im Laufe von einer Stunde durch den Kühler entwich. Das Ölbad wurde dann 2 Stunden auf 160° gehalten, so dass das Hydrazin gelinde siedete. Nach dem Erkalten fiel die Hauptmenge des Hydrazides in Form prismatischer Stäbchen aus. Das überschüssige Hydrazinhydrat wurde im Vakuum abgedampft und der Rückstand aus 90-proz. Alkohol umkrystallisiert. Es wurden 3 g Hydrazid vom Smp. 247,5—248,5° erhalten. Zur Analyse wurde noch zweimal aus demselben Lösungsmittel umkrystallisiert. Die Substanz schmolz dann bei 249—250°.

3,702 mg Subst. gaben 9,27 mg CO₂ und 3,08 mg H₂O
 3,155 mg Subst. gaben 0,241 cm³ N₂ (16°, 718 mm)
 C₂₀H₃₂O₂N₂ Ber. C 72,25 H 9,70 N 8,43%
 Gef. „ 72,29 „ 9,59 „ 8,52%

Δ⁵-3 β-Oxy-ätio-choleensäure-azid (X).

500 mg Hydrazid wurden in 15 cm³ Eisessig gelöst, mit 15 cm³ 2-n. Salzsäure versetzt und mit Eis auf 0° gekühlt. Dann wurde unter Rühren tropfenweise 1-n. Natriumnitritlösung zugegeben. Der Verbrauch an Nitrit wurde mit Jod-Kalium-Stärkepapier verfolgt. Nach Zugabe der theoretisch erforderlichen Menge von 1,5 cm³ 1-n. Nitritlösung war der Endpunkt erreicht und das Azid als amorphe Masse ausgefallen. Zur vollständigen Fällung des Azids wurde etwas Eiswasser zugegeben. Dann wurde abgenutscht und mit Eiswasser gut gewaschen.

Für die Kupplung an Eiweiss kann das Azid in feuchtem Zustand weiter verarbeitet werden. Zur Charakterisierung als Urethan wurde das Azid im Vakuum bei Zimmertemperatur vollständig getrocknet. Es bildet dann ein weisses Pulver, das sich beim Erhitzen im Schmelzpunktsblock bei 78° unter Gasentwicklung zersetzt und in eine feste, glasige Masse übergeht.

Δ⁵-Androsten-3 β-ol-17-carbaminsäure-äthylester.

Das trockene Azid wurde mit 10 cm³ absolutem Alkohol versetzt und auf dem Dampfbad zum Sieden erhitzt, wobei lebhaftere Stickstoffentwicklung eintrat. Es wurde zwei

¹⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

Stunden unter Rückfluss gekocht und nach dem Abkühlen der Alkohol im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde zweimal aus Benzol umkristallisiert und schmolz dann konstant bei 193,5–195,5°.

3,633 mg Subst. gaben 9,72 mg CO₂ und 3,21 mg H₂O
 C₂₂H₃₅O₃N Ber. C 73,08 H 9,76% Gef. C 73,01 H 9,89%

Titration des Δ^5 -3-Oxy-ätio-cholensäure-azids (X) mit KOH.

350 mg getrocknetes Azid wurden in 15 cm³ Dioxan gelöst und mit 5 cm³ Wasser und einigen Tropfen Phenolphthalein versetzt. In die farblose Lösung wurden aus einer Bürette 23 cm³ 0,1-n. KOH zulaufen gelassen, bis dauernde Rotfärbung eintrat. Theoretischer Verbrauch 22 cm³ 0,1-n. KOH.

Kupplung an Pferdeserum.

Kontrollversuch. Zur Kontrolle der Kupplung des Azides mit dem Serum wurde die gebildete Stickstoffwasserstoffsäure titriert. In je einem Erlenmeyerkolben wurden eingefüllt:

Blindversuch	Azidversuch
13 cm ³ Pferdeserum . . .	13 cm ³ Pferdeserum
13 cm ³ Wasser	13 cm ³ Wasser
35 cm ³ Dioxan	35 cm ³ Dioxan, enthaltend 500 mg Azid

Die beiden Versuche wurden nebeneinander aufgestellt und beide Kolben gleichzeitig mit je 3 cm³ 1-n. NaOH versetzt und umgerührt. In jedem Kolben befanden sich 64 cm³ Lösung. In bestimmten Zeitabständen wurden jedem Kolben 5 cm³ Lösung entnommen und durch Titration mit 0,1-n. Essigsäure der Verbrauch an NaOH bestimmt (Indikator Phenolphthalein).

Minuten	Blindversuch cm ³ 0,1-n. Essigsäure	Minuten	Azidversuch cm ³ 0,1-n. Essigsäure
1	1,7	1	0,7
5	1,9	5	0,7
10	1,9	10	0,6
30	1,9	30	0,5

Im Azidversuch sind somit gegenüber dem Blindversuch von 5 cm³ der Serumlösung innert 10 Minuten 1,3 cm³ 0,1-n. NaOH mehr verbraucht worden, von der Gesamtlösung von 64 cm³ somit 1,65 cm³ 1-n. NaOH (theoretisch 1,45 cm³ 1-n. NaOH).

Es wurde nach 10 Minuten schon die theoretische Menge Lauge verbraucht, resp. die erforderliche Menge HN₃ abgespalten. Die Kupplung ist also nach 10 Minuten beendet, was auch daraus ersichtlich ist, dass die anfänglich mehr oder weniger klare Pferdeserumlösung plötzlich stark opaleszierend wird.

Kupplung von Δ^5 -3 β -Oxy-ätio-cholensäure-azid mit Pferdeserum.

664 mg (2 Millimol) Oxy-ätio-cholensäure-hydrazid wurden in 10 cm³ 50-proz. Essigsäure gelöst und nach dem Abkühlen auf 0° mit einer eben bereiteten Mischung von 4 cm³ 1-n. Salzsäure und 2 cm³ 1-n. Natriumnitritlösung versetzt. Nach wenigen Minuten war die Nitritreaktion nur noch schwach. Es wurde noch eine halbe Stunde kalt stehen

gelassen, das Azid abgenutscht, mit Wasser gewaschen und trocken gesaugt. Das Azid wurde dann in 10 cm³ Dioxan gelöst und gekühlt.

26 cm³ Pferdeserum wurden mit 26 cm³ Wasser verdünnt und mit 1-n. NaOH bis zum Umschlagspunkt von Phenolphthalein versetzt, was 2,4 cm³ erforderte. Die Lösung wurde mit 25 cm³ Dioxan versetzt und gekühlt. Im Laufe von 20 Minuten wurde die Azidlösung unter Rühren zutropfen gelassen und in kurzen Abständen 1-n. NaOH, jedesmal wenn Entfärbung des Indikators eintrat, zugefügt. In ganzen wurden 3,2 cm³ 1-n. NaOH verbraucht. In dem Masse wie die Kupplung fortschritt, wurde die ursprünglich klare Serumlösung dickflüssig und opaleszierend, ohne jedoch einen Niederschlag auszuscheiden. Die Eiweisslösung wurde durch Zutropfen von verdünnter Salzsäure auf p_H 3 eingestellt, das ausgeflockte Eiweiss abzentrifugiert, über Nacht gegen laufendes Leitungswasser dialysiert und für die Injektionen wieder aufgelöst.

Kupplung des Azids mit Kaninchenserum.

332 mg (1 Millimol) *A*⁵-3β-Oxy-ätio-cholensäure-hydrazid wurden in 10 cm³ Eisessig gelöst und mit 1 cm³ 1-n. Natriumnitritlösung versetzt. Dann wurde tropfenweise bei 0° mit 5 cm³ 1-n. Salzsäure angesäuert, wobei sich das Azid auszuscheiden begann. Nach 5 Minuten war die Nitritreaktion negativ, der Nitritverbrauch somit theoretisch. Es wurde soviel Eiswasser zugegeben, bis alles Azid ausgefallen war. Nach dem Abnutschen wurde es gründlich mit Eiswasser gewaschen und trocken gepresst. Das Azid wurde dann in 15 cm³ reinem Dioxan klar gelöst.

26 cm³ Kaninchenserum wurden mit 26 cm³ Wasser verdünnt und mit 20 cm³ Dioxan versetzt. Zu dieser auf 0° abgekühlten Lösung wurde die Dioxanlösung des Azids gegossen und unter gutem Rühren tropfenweise 2 cm³ 1-n. NaOH einlaufen gelassen. Die Lösung wurde rasch undurchsichtig, ohne aber einen Niederschlag abzuscheiden. Nach halbstündigem Stehen bei 0° wurde mit verdünnter Salzsäure auf p_H 7 eingestellt.

*A*⁵-3-Chlor-ätio-cholensäure-chlorid (XI).

500 mg *A*⁵-3β-Oxy-ätio-cholensäure wurden mit 2,5 cm³ absolutem Benzol und mit 2,5 cm³ Thionylchlorid 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Dann wurde im Vakuum zur Trockne verdampft, wobei das Säurechlorid als gelbliches Öl zurückblieb, das nicht krystallisierte.

*A*⁵-3-Chlor-ätio-cholensäure-äthylester (XII).

Obiges Säurechlorid aus 500 mg Oxysäure wurde mit 10 cm³ absolutem Äthanol 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach dem Verdampfen des überschüssigen Äthanol krystallisierte der Rückstand schlecht und wurde deshalb an Aluminiumoxyd chromatographiert. Mit Petroläther wurden 350 mg eines Produktes eluiert, das nach dreimaligem Umlösen aus Hexan konstant bei 143—143,5° schmolz und den gesuchten Ester darstellte.

3,430 mg Subst. gaben 9,10 mg CO₂ und 2,76 mg H₂O
 C₂₂H₃₃O₂Cl Ber. C 72,40 H 9,11% Gef. C 72,40 H 9,00%

*A*⁵-3-Chlor-ätio-cholensäure-hydrazid (XIII).

Das 3-Chlor-ätio-cholensäure-chlorid aus 500 mg Oxysäure wurde in absolutem Äther gelöst und diese Lösung tropfenweise zu einer gekühlten Lösung von 500 mg Hydrazin in 10 cm³ Alkohol gegeben, wobei gut gerührt wurde. Nach 1,5 Stunden wurden die Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand in Benzol aufgenommen. Nach dem Waschen mit Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Benzol abgedampft. Es blieben 500 mg einer glasigen Masse zurück, welche nicht krystallisierte und an Aluminiumoxyd chromatographiert wurde. Mit Benzol wurden 320 mg Krystalle eluiert, welche nach zweimaligem Umlösen aus Benzol-Petroläther bei 221,5—222,5° schmolzen. Das Hydrazid neigte stark zum Verlust

von Chlorwasserstoff, so dass bei der Analyse stets zu hohe C-Werte und zu tiefe Cl-Werte erhalten wurden.

3,973 mg Subst.	gaben 10,10 mg CO ₂	und 3,17 mg H ₂ O
0,388 mg Subst.	gaben 3,478 mg AgCl	
C ₂₀ H ₃₁ ON ₂ Cl	Ber. C 68,45	H 8,90 Cl 10,10%
	Gef. „ 69,38	„ 8,93 „ 9,16%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Herrn *W. Manser* ausgeführt.

Zusammenfassung.

Es wird die Synthese des Δ^5 -3 β -Oxy-ätio-cholensäure-azids und dessen Kupplung mit Pferde- und Kaninchenserum beschrieben. Ein entsprechendes Δ^5 -3-Chlor-ätio-cholensäure-derivat konnte nicht in reiner Form isoliert werden. Allgemein aber erwies sich die Azidmethode als zur Herstellung von steroidkonjugierten Proteinen gut geeignet.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

28. Über den enzymatischen Abbau des Alliins und die Eigenschaften der Alliinase.

2. Mitteilung über Allium-Substanzen¹⁾

von **A. Stoll** und **E. Seebeck**.

(13. XII. 48.)

In unserer ersten Mitteilung haben wir die Reindarstellung und die Eigenschaften des Alliins, der kristallisierten Muttersubstanz des Knoblauchöls, beschrieben und dessen Konstitution aufgeklärt. Wir konnten ferner auf die Beziehung dieser neuen schwefelhaltigen α -Aminosäure zum antibakteriell wirkenden Allicin²⁾, das aus ihr durch enzymatischen Abbau entsteht, hinweisen. In der vorliegenden Arbeit wollen wir auf diesen Abbau durch das spezifische Enzym Alliinase und seine Eigenschaften näher eingehen.

Enzyme, die schwefelhaltige Aminosäuren abzubauen vermögen, sind erst in neuerer Zeit untersucht worden, so die Cysteinase³⁾, die in *Proteus vulg.* und im *Bac. coli* vorkommt und die Cystin in Schwefelwasserstoff, Essigsäure und Kohlendioxyd spaltet, und die

¹⁾ *A. Stoll* und *E. Seebeck*, *Helv.* **31**, 189 (1948).

²⁾ *C. J. Cavallito*, *J. Bailey* und *J. Buck*, *Am. Soc.* **67**, 1032 (1945).

³⁾ *H. L. Tarr*, *Biochem. J.* **27**, 759 (1933); **28**, 192 (1934). *P. Desnuelle* und *C. Fromageot*, *Enzymologia* **6**, 80 (1939). *P. Desnuelle*, *Enzymologia* **6**, 242 (1939).