

schungen von isomeren Hexahydrochloriden, von denen zwei leicht kristallisierende Formen zur Identifizierung verwendet wurden⁴⁾.

1952 zeigten *R. G. Langdon & K. Bloch*⁵⁾, dass Squalen im tierischen Organismus (Maus) aus Acetat gebildet werden kann. Ersteres erwies sich als ein Intermediärprodukt der biologischen Cholesterinsynthese, indem die Verfütterung von ¹⁴C-signiertem Squalen zu radioaktivem Cholesterin führte. Ferner war die Aktivität des von Leberschnitten aus ¹⁴C-Acetat synthetisierten Cholesterins bedeutend geringer, wenn den Tieren zuvor Squalen verabreicht wurde. Unter solchen Bedingungen vollzog sich die Cholesterinbildung also bevorzugt aus dem Intermediärprodukt und nicht vornehmlich vom Acetat ausgehend. Ein aus den Hexahydrochloriden regeneriertes Squalen vermochte dagegen die Cholesterinsynthese nicht zu beeinflussen⁶⁾. Es besteht somit offenbar die Möglichkeit einer Differenzierung der isomeren Squalenverbindungen auf biologischem Wege, indem der Tierkörper nur Präparate zum Cholesterinaufbau verwenden kann, die mit dem Naturprodukt identisch sind. *W. G. Dauben* und Mitarb.⁷⁾ zeigten später, dass das aus den Hexahydrochloriden regenerierte Squalen und ein nach *J. Schmitt*⁸⁾ synthetisiertes Präparat sich vom Naturprodukt auch durch das Infrarotabsorptionsspektrum und durch das Verhalten im Papierchromatogramm unterscheiden.

1954 bewiesen *N. Nicolaidis & F. Laves*¹⁰⁾ durch Röntgenuntersuchungen am kristallinen Thioharnstoffaddukt, dass die vier Doppelbindungen des natürlichen Squalens, an denen cis-trans-Isomerie möglich ist, trans-Konfiguration aufweisen. Ein 1956 von *S. Trippett*¹¹⁾ synthetisiertes Squalen, bei dem cis-trans-Isomere zu erwarten sind, wurde noch nicht auf sein biochemisches Verhalten geprüft.

Wir haben in einer modifizierten Synthese nach *P. Karrer & A. Helfenstein*³⁾ aus synthetischem und natürlichem Nerolidol Squalenpräparate hergestellt, die nach Reinigung über das Thioharnstoffaddukt in ihren physikalischen und chemischen Konstanten sowie in ihrem biologischen Verhalten mit natürlichem Squalen übereinstimmen. Das benötigte synthetische Nerolidol haben wir ausgehend von Aceton nach dem Aufbauprinzip für Terpenketten von *L. Ruzicka* gewonnen¹²⁾.

Zu diesem Zwecke synthetisierten wir ausgehend von Aceton (II) nach den früher von *O. Isler* und Mitarb.¹³⁾ angegebenen allgemeinen Arbeitsvorschriften über 3-Methyl-3-hydroxy-butin-(1) (III), 3-Methyl-3-hydroxy-buten-(1) (IV), 3-Methyl-1-brom-buten-(2) (V), 6-Methyl-hepten-(5)-on-(2) (VI) und *d,l*-Dehydro-linalool (VII) das *d,l*-Linalool (VIII). Dieses wurde mit Phosphortribromid in Petroläther umgesetzt und das gebildete Geranyl bromid (IX) ohne Reinigung mit Natriumacetessigester kondensiert. Nach Verseifung des

⁴⁾ *P. Karrer*, *Helv.* **36**, 130 (1953).

⁵⁾ *R. G. Langdon & K. Bloch*, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 1869 (1952).

⁶⁾ *R. G. Langdon & K. Bloch*, *J. biol. Chemistry* **200**, 135 (1953).

⁷⁾ *W. G. Dauben, H. L. Bradlow, N. K. Freeman, D. Kritchevsky & M. Kirk*, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 4321 (1952).

⁸⁾ *J. Schmitt*, *Liebigs Ann. Chem.* **547**, 115 (1941).

⁹⁾ *W. G. Dauben & H. L. Bradlow*, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 5204 (1952).

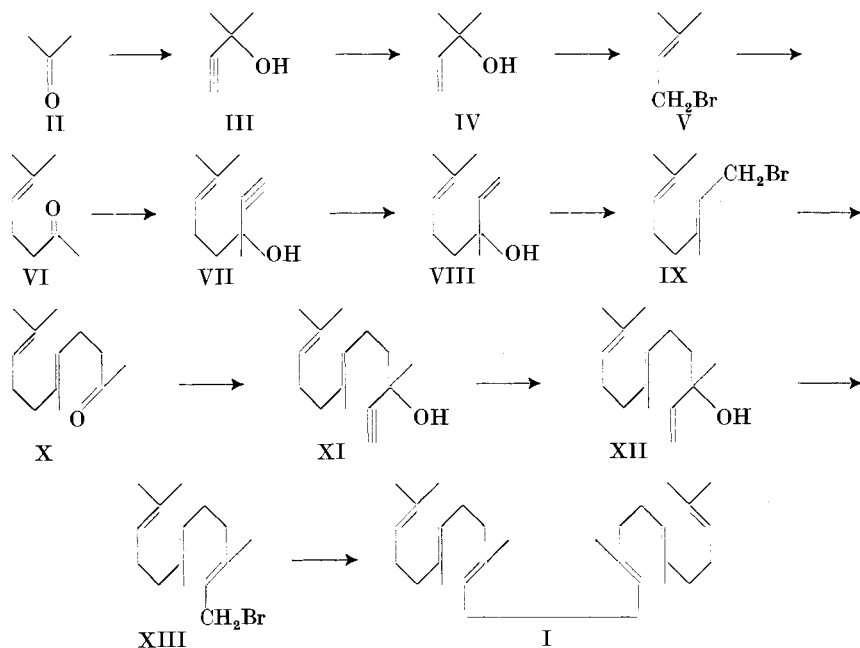
¹⁰⁾ *N. Nicolaidis & F. Laves*, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 2596 (1954).

¹¹⁾ *S. Trippett*, *Chemistry and Ind.* **1956**, 80.

¹²⁾ *L. Ruzicka*, *Helv.* **2**, 182 (1919); **6**, 492 (1923); **22**, 392 (1939); **28**, 590 (1945).

¹³⁾ *O. Isler, R. Rüegg, A. Studer & R. Jürgens*, *Z. physiol. Chem.* **295**, 290 (1953).

Kondensationsproduktes erhielten wir Geranylaceton (X), welches über das Semicarbazon vom Smp. 92–93° von dem Doppelbindungs-isomeren (Semicarbazon Smp. 90–91°) getrennt wurde. Kondensation mit Natriumacetylid in flüssigem Ammoniak und Partialhydrierung des gebildeten *d,l*-Dehydro-nerolidols (XI) ergab *d,l*-Nerolidol (XII). Dieses synthetische Nerolidol lieferte wie das Naturprodukt und in gleicher Ausbeute bei der Oxydation Farnesal, welches durch das 2,4-Dinitrophenylhydrazon identifiziert wurde.



Aus dem synthetischen *d,l*-Nerolidol sowie aus dem natürlichen Nerolidol wurde mit Phosphortribromid in Petroläther Farnesylbromid (XIII) hergestellt, dieses ohne Reinigung mit Lithium in siedendem Äther kondensiert und das Rohprodukt molekulardestilliert. Das erhaltene Squalenpräparat war bereits zur Cholesterinsynthese brauchbar. Die biochemische Prüfung, die in der Tab. resümiert ist, ergab, dass natürliches Squalen und unsere synthetischen Präparate in gleichem Ausmass von der Leberzelle zur Cholesterinsynthese herangezogen werden.

Die Versuche wurden in Anlehnung an die Angaben von *K. Bloch* und Mitarb.¹⁴⁾ so durchgeführt, dass stets 12 einheitliche Ratten verwendet wurden, von denen 4 synthetisches Squalen, 4 natürliches Squalen und 4 kein Squalen erhielten. Wir haben die Tiere nach 4 Tagen getötet, von jeder Leber Schnitte gewonnen und diese nach Zugabe von ¹⁴C-Acetat 2 Std. bei 37° in einer Pufferlösung geschüttelt. Die nach Verseifung erhaltenen

¹⁴⁾ *R. G. Langdon & K. Bloch*, *J. biol. Chemistry* **202**, 77 (1953).

Tabelle.

Beeinflussung der Cholesterinsynthese aus radioaktivem Acetat in der Rattenleber durch Fütterung von natürlichem und synthetischem Squalen.
Spezifische Aktivitäten des Cholesterins, bezogen auf die Aktivität des Cholesterins normaler Kontrollen (= 100).

Vers. Nr.	Fütterung von natürlichem Squalen	synthetischem Squalen	Gewinnung der synthetischen Squalenpräparate
1—3	8,7 15,0 0,8*	8,8 25,0 4,1	Rohprodukte aus natürlichem Nerolidol, molekulardestilliert.
4—6	11,3 18,0 9,1	82,0 90,3 93,8	Totalsynthetische Rohprodukte mit cis-Doppelbindungen, dargestellt aus einem Gemisch der stereoisomeren Geranylacetone.
* Gereinigt über das Thioharnstoffaddukt.			

gereinigten Cholesterinfraktionen unterwarfen wir zur Gewinnung der Kohlensäure einer feuchten Veraschung und bestimmten die Aktivität des gefällten Bariumcarbonates. Die in der Tab. angeführten Werte sind die Mittel der gemessenen Aktivitäten des Cholesterins aus je vier Lebern. In allen Fällen ergeben sich statistisch gesicherte Unterschiede zwischen der Radioaktivität des synthetisierten Cholesterins bei den Kontrolltieren und bei denjenigen, die natürliches Squalen erhielten. Bei den Versuchen 1—3 sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des verwendeten synthetischen Squalens gegenüber dem Verhalten des natürlichen Squalens vorhanden.

Das destillierte Syntheseprodukt, dessen IR.-Absorptionsspektrum noch Verunreinigung durch Doppelbindungsisomere anzeigte (Banden der Vinyl-Gruppe bei 6,05 μ , 10,00 μ und 11,00 μ sowie Banden der Methyliden-Gruppe bei 6,05 μ und 11,26 μ ; vgl. Fig. 1) wurde zur Reinigung in einer gesättigten methanolischen Thioharnstofflösung gelöst, wobei nach einigem Stehen das Thioharnstoffaddukt des Squalens auskristallisierte. Dieses wurde mit Wasser gespalten. Die Wiederholung der Reinigung über das Thioharnstoffaddukt führte zu einem synthetischen Squalen, dessen IR.-Absorptionsspektrum völlig mit dem IR.-Absorptionsspektrum von reinem natürlichem Squalen übereinstimmt (Fig. 1).

Natürliches und synthetisches Squalen zeigen auch im Papierchromatogramm gleiches Verhalten. Prof. *F. Laves* und Dr. *N. Nicolaides*¹⁵⁾ hatten die grosse Freundlichkeit, unsere Thioharnstoffaddukte im Mineralogischen Institut der ETH. in Zürich röntgenographisch zu messen. Sie fanden innerhalb der an die Methode geknüpften Fehlergrenzen gleiche Molekellänge für das aus natürlichem Nerolidol hergestellte und das aus Aceton totalsynthetisch gewonnene Squalen wie für das Naturprodukt¹⁶⁾.

¹⁵⁾ *N. Nicolaides*, Guggenheim Fellow, z. Zeit im Mineralogischen Institut der ETH., Zürich.

¹⁶⁾ Über die Methode und die genauen Befunde wird von *F. Laves & N. Nicolaides* in der Z. Kristallogr. und im J. Amer. chem. Soc. ausführlich berichtet werden.

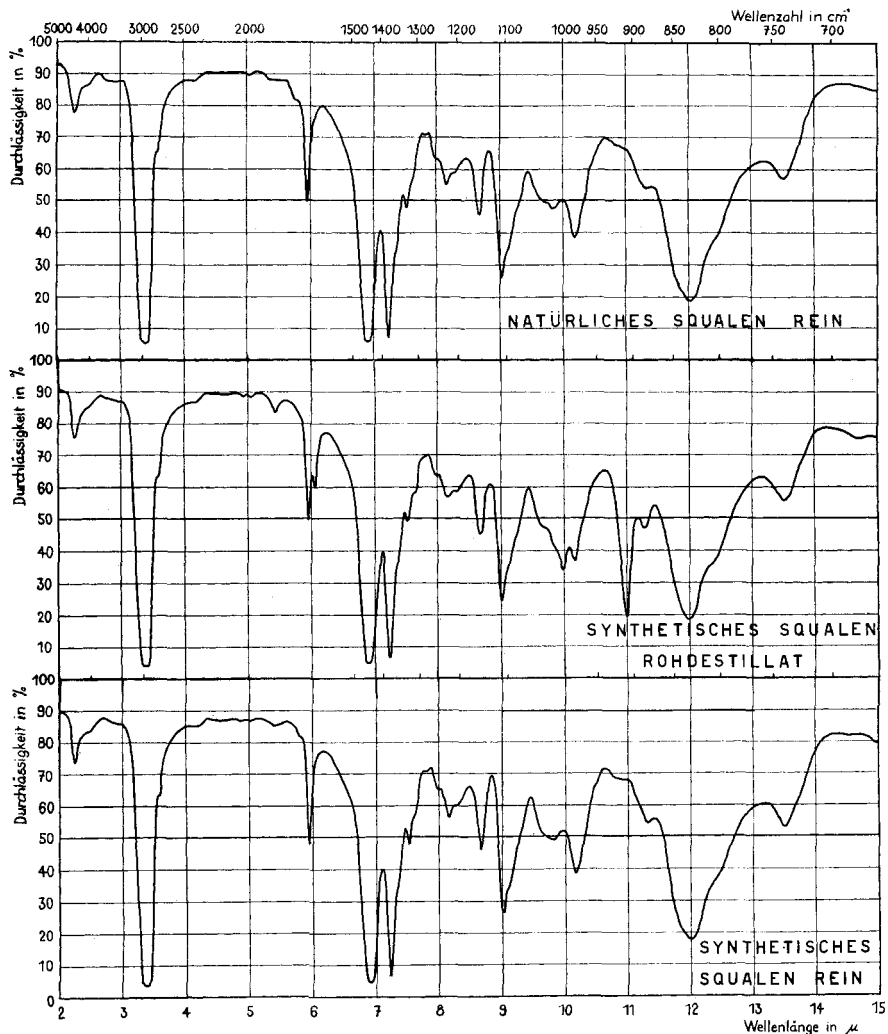


Fig. 1.

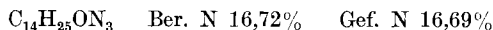
IR.-Absorptionsspektren, mit einer 0,03-mm-Zelle aufgenommen.

Experimenteller Teil.

Chemische Versuche.

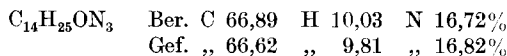
Geranylaceton (X). In eine Lösung von 308 g *d,l*-Linalool (VIII)¹³ in 570 cm³ Petroläther (Siedebereich 30–60°) und 48 cm³ Pyridin werden bei –7° in 2 Std. 242 g Phosphortribromid in 320 cm³ Petroläther getropft. Man rührt die Mischung noch 20 Min. bei –7°, giesst auf Eis und Wasser und rührt 15 Min. Dann gibt man noch 600 cm³ Petroläther zu, trennt die wässrige Schicht ab und wäscht die Petrolätherlösung zweimal mit Wasser und einmal mit verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen erhält man 390–400 g Geranylbromid. Dieses wird mit 330 g Acetessigester gemischt und auf –15° abgekühlt. Unter gutem Rühren und

Kühlen wird dazu eine Lösung von 44,8 g Natrium in 970 cm³ absolutem Alkohol in 80 Min. bei -7 bis -12° getropft, die Mischung noch weitere 3 Std. bei -5 bis -10° und schliesslich 14 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Hierauf erwärmt man auf 80° und tropft unter Rühren 3100 cm³ 10-proz. Natronlauge in 1,5 Std. bei 80° zu und rührt die Mischung noch weitere 4 Std. bei dieser Temperatur. Nach dem Abkühlen trennt man die obere, ölige Schicht ab, schüttelt die wässrige Lösung einmal mit 1000 cm³ Petroläther (Siedebereich 30—60°) aus, gibt das Öl zur Petrolätherlösung und wäscht dreimal mit Wasser. Nach dem Trocknen und Abdampfen erhält man 300 g rohes Geranylaceton, das im Wasserstrahlvakuum destilliert wird, Sdp. 122—127°/12 mm. Man erhält 240-260 g Destillat ($n_D^{22} = 1,4660$), das in 170 cm³ Methanol gelöst wird. Man gibt dazu eine Semicarbazidlösung aus 165 g Semicarbazid-hydrochlorid und 200 g kristallisiertem Natriumacetat (hergestellt durch Zusammenreiben, Filtrieren und Verdünnen mit 300 cm³ Methanol und 120 cm³ Wasser), lässt 12 Std. bei Zimmertemperatur stehen und filtriert das auskristallisierte Semicarbazon ab. Durch 4—5maliges Umkristallisieren aus 465 cm³ Methanol unter Zugabe von 150 cm³ Wasser werden ca. 190 g reines Geranylacetonsemicarbazon, Smp. 92—93°, erhalten.



Zur Spaltung wird das Produkt mit 700 cm³ Petroläther (Siedebereich 30—60°) und 500 cm³ 3-n. Schwefelsäure bei Zimmertemperatur 48 Std. geschüttelt, wobei alles in Lösung geht. Man trennt die wässrige Schicht ab, wäscht die Petrolätherlösung einmal mit verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit Wasser. Das nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen erhaltene Produkt wird im Wasserstrahlvakuum destilliert, Sdp. 124°/10 mm. Man erhält ca. 135 g reines, farbloses Geranylaceton, $n_D^{23} = 1,465$.

Aus der ersten Mutterlauge der Semicarbazonherstellung kann durch Chromatographieren an Aluminiumoxyd aus den ersten Chromatogrammfraktionen das isomere Geranylacetonsemicarbazon, Smp. 90—91°, erhalten werden. Misch-Smp. mit dem Semicarbazon vom Smp. 92—93° stark erniedrigt.



d,l-Dehydro-nerolidol (XI). 23 g Natrium werden in 750 cm³ flüssigem Ammoniak gelöst. In die blaue Lösung wird trockenes, reines Acetylen bis zur Entfärbung eingeleitet. Dann werden unter weiterem schwachem Einleiten von Acetylen 90 g Geranylaceton in 120 cm³ absolutem Äther in 20 Min. unter Rühren zugetropft. Man schüttelt hierauf die Mischung 16 bis 18 Std. in einem Autoklaven bei Zimmertemperatur. Dann lässt man das Ammoniak verdampfen, giesst den Rückstand auf 750 g Eis, 200 cm³ konz. Salzsäure und 200 cm³ Äther und rührt die Mischung 10 Min. Nun wird die wässrige Schicht abgetrennt, mit 500 cm³ Äther ausgeschüttelt und die Ätherlösungen mit verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen des Äthers über Natriumsulfat und Abdampfen wird das Rohprodukt im Hochvakuum destilliert. Man erhält 91 g farbloses *d,l*-Dehydro-nerolidol, Sdp. 84—85°/0,02 mm, $n_D^{22} = 1,4795$.

d,l-Nerolidol (XII). 91 g *d,l*-Dehydro-nerolidol werden in 250 cm³ Petroläther (Siedebereich 80—105°) mit 2,2 cm³ Chinolin und 2,7 g Lindlar-Katalysator¹⁷⁾ in einer Wasserstoffatmosphäre geschüttelt, wobei zeitweise Kühlung durch kaltes Wasser notwendig ist. Die Hydrierung ist nach Aufnahme von 1 Mol. Wasserstoff beendet und kommt von selbst zum Stillstand. Man filtriert vom Katalysator ab und wäscht mit wenig Petroläther nach. Die Petrolätherlösung wird einmal mit verdünnter Schwefelsäure, zweimal mit Wasser, dann mit verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung und nochmals mit

¹⁷⁾ H. Lindlar, Helv. **35**, 446 (1952).

Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen des Petroläthers wird das Rohprodukt im Hochvakuum destilliert. Man erhält 86 g farbloses *d,l*-Nerolidol, Sdp. 75–76°/0,1 mm, $n_D^{22} = 1,4782$.

Farnesylbromid (XIII). Zu einer Lösung von 100 g synthetischem *d,l*-Nerolidol oder natürlichem Nerolidol in 270 cm³ Petroläther (Siedebereich 30–60°) und 10,5 cm³ Pyridin werden bei –7° in 2 Std. 53 g Phosphortribromid in 60 cm³ Petroläther getropft. Man rührt die Mischung noch 30 Min. bei –7°, giesst hierauf auf Eis und Wasser und rührt die Mischung 30 Min. Dann gibt man noch 500 cm³ Petroläther zu, trennt die wässrige Schicht ab und wäscht die Petrolätherlösung zweimal mit Wasser und einmal mit verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen erhält man 122 g beinahe farbloses Farnesylbromid, $n_D^{22} = 1,5060$, welches ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet wird.

Squalen (I). 122 g rohes Farnesylbromid löst man in 1 l absolutem Äther, gibt 4 g Lithium in 4–6 Stücken zu und kocht die Mischung unter Rühren in einer Stickstoffatmosphäre unter Rückfluss 40 Std. Nach dem Erkalten filtriert man die Ätherlösung durch Glaswatte und wäscht sie dreimal mit Wasser. Das nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen des Äthers erhaltene Rohprodukt (88 g) wird in einer Kurzwegdestillationsapparatur (D. P. I. CMS 5) destilliert, wobei das Squalen (55 g) bei 115°/0,02 mm übergeht.

Je 20 g dieser Squalenfraktion werden in 3,3 l einer gesättigten methanolischen Thioharnstofflösung gelöst, hierauf wird 50 g sehr fein pulverisierter Thioharnstoff zugegeben, die Mischung ca. 10 Min. gut gerührt und dann 3–4 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der Niederschlag wird nun abfiltriert, pulverisiert und mit 500 cm³ Wasser unter öfterem Umschütteln schwach erwärmt, bis keine Kristalle mehr vorhanden sind. Nach dem Abkühlen schüttelt man das Squalen mit Petroläther (Siedebereich 30–60°) aus. Nach dem Trocknen und Abdampfen des Petroläthers werden 5 g Squalen erhalten, welche nochmals über das Thioharnstoffaddukt gereinigt werden, wobei 3,5 g Squalen regeneriert werden, die noch durch eine Säule aus 100 g Aluminiumoxyd (*Woelm*, Akt.-Stufe I mit 4% Wasser desaktiviert) in Petroläther filtriert werden. Man erhält schliesslich 3,3 g farbloses, reines Squalen, $n_D^{23} = 1,494$, das im Hochvakuum bei 162°/0,01 mm siedet.

C₃₀H₅₀ Ber. C 87,73 H 12,27% Gef. C 87,59 H 12,46%

Dieses synthetische Squalen zeigt im Papierchromatogramm, das von Dr. *W. Huber* ausgeführt wurde, gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie das Naturprodukt (Papier: *Schleicher & Schüll* 2043 b, imprägniert mit Paraffinöl. Mobile Phase: Methanol gesättigt mit Paraffinöl. Nachweis mit Joddampf).

Die Analysen wurden in der mikroanalytischen Abteilung der *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.* in Basel ausgeführt (Leitung Dr. *H. Waldmann*).

Biochemische Versuche.

Als Versuchstiere dienten weisse, männliche Ratten von 200–250 g Gewicht. Sie erhielten (mit Ausnahme der Kontrollen) mit einem normalen Futter an 4 aufeinanderfolgenden Tagen je 0,25 cm³ natürliches oder synthetisches Squalen mit der Schlundsonde und wurden am fünften Tag durch Dekapitieren getötet. Die Aufarbeitung der Squalentiere erfolgte gleichzeitig mit denjenigen der 4 normalen Kontrollen. Nach Ausbluten brachten wir die Leber sofort in eiskalte Pufferlösung (pH 7,4). Etwa 1,5 g Leberschnitte schüttelten wir in speziellen Gefässen während 2 Std. bei 37° in 10 cm³ Puffer mit 0,25 μ C Acetat-[1-¹⁴C]. Dann verseifen wir die Schnitte durch Zugabe von 5 g KOH und 40 cm³ Äthanol und isolierten die Fettsäuren und das Unverseifbare in üblicher Weise. Das Cholesterin wurde durch Chromatographieren an Aluminiumoxyd und Digitoninfällung erhalten. Die Resultate sind in der Tabelle auf S. 900 zusammengestellt.

SUMMARY.

Squalene was synthesized in a modified procedure according to *P. Karrer & A. Helfenstein* starting from natural and from synthetic nerolidol. After purification through the thio-urea adduct the synthetic products were found to be identical with pure natural squalene in their chemical and physical properties as well as in their biological behaviour.

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.*, Basel, und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Basel.

109. Die Konstitution von Sarmutogenin.

Glykoside und Aglykone 161. Mitteilung¹⁾

von **H. Kündig-Hegedüs** und **O. Schindler**.

(13. III. 56.)

Für Sarmutogenin, das Aglykon von Sarmutosid²⁾, Musarosid²⁾ und Ambosid³⁾, wurde die Konstitution II vorgeschlagen⁴⁾. Diese Formulierung stützte sich vor allem auf die Eigenschaften des daraus durch milde Oxydation mit CrO₃ unter Verbrauch von ca. 2 Mol CrO₃ herstellbaren Dehydrierungsproduktes, das als Sarmutogenon bezeichnet wurde⁴⁾. Dieses hellgelbe Keton IV zeigte im UV.-Absorptionsspektrum neben der Absorption des Butenolidringes Maxima, deren Lage und Extinktionswerte mit denen der 11,12-Diketochohlan-säure grosse Ähnlichkeit besaßen. Da ortho-Diketone am Steroid-Gerüst mit Ausnahme der 11,12-Diketone⁵⁾⁶⁾ als Diosphenole mit wesentlich anderer UV.-Absorption und positiver FeCl₃-Reaktion vorliegen, so war damit die Lokalisation von zwei der sechs Sauerstoffatome in Sarmutogenin wahrscheinlich gemacht. Aus Analogiegründen wurde Sarmutogenin als ein Cardenolid-Derivat betrachtet und die Verteilung der vier weiteren Sauerstoffatome in die Stellungen 3 und 14 sowie zwei in den Butenolid-Ring vorgenommen.

¹⁾ 160. Mitteilung: *D. H. R. Barton, K. Mohr, T. Reichstein & O. Schindler*, *Helv.* **39**, 413 (1956).

²⁾ *R. Richter, K. Mohr & T. Reichstein*, *Helv.* **36**, 1073 (1953).

³⁾ *H. Hegedüs, Ch. Tamm & T. Reichstein*, *Helv.* **37**, 2204 (1954).

⁴⁾ *R. Richter, O. Schindler & T. Reichstein*, *Helv.* **37**, 76 (1954); *O. Schindler & T. Reichstein*, *Helv.* **37**, 674, Fussnote 4 (1954).

⁵⁾ *H. Wieland & Th. Posternak*, *Z. physiol. Chem.* **197**, 20 (1931).

⁶⁾ *J. Barnett & T. Reichstein*, *Helv.* **21**, 926 (1936).