

Struktur eines aus Menschenharn isolierten C₁₉-Terpenoids — 2β-Hydroxy-15-oxoattractylan-4α-carbonsäure

Hugo Obermann^{a)}, Gerhard Spiteller^{a)*} und Georg-A. Hoyer^{b)}

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen,
D-3400 Göttingen, Windausweg 2^{a)*} und Schering AG, Berlin^{b)}

Eingegangen am 4. Juni 1973

Aus Menschenharn wurde eine als Glucuronid vorliegende Säure der Bruttoformel C₁₉H₂₈O₄ isoliert, die nach Abbauversuchen als Terpenoid-Carbonsäure vom Kaurantyp erkannt wurde. Der Methylester **10a** des Oxidationsproduktes der Säure ist identisch mit einem Abbauprodukt **10** des Atractyligenins (**9**). Die spektroskopische Untersuchung weiterer Reaktionsprodukte ermöglicht es, der Säure die Konstitution 2β-Hydroxy-15-oxoattractylan-4α-carbonsäure (**11**) zuzuschreiben. Sie wird in Tagesmengen von 2–40 mg im Urin des Menschen ausgeschieden.

Structure of a C₁₉-Terpenoid from Human Urine — 2β-Hydroxy-15-oxoattractylane-4α-carboxylic Acid

An acid with the molecular formula C₁₉H₂₈O₄ occurring as glucuronide was isolated from human urine. According to degradation reactions it was identified as a terpenoidcarboxylic acid of the kaurane-type. The methyl ester **10a** of the oxidation product of the acid is identical with a degradation product **10** of atractyligenin (**9**). Spectroscopic data of further reaction products allow to attribute to the acid the structure of 2β-hydroxy-15-oxoattractylane-4α-carboxylic acid (**11**). This acid is excreted in human urine in daily amounts between 2 and 40 mg.

Im Zuge unserer Untersuchungen über die Ausscheidung von Steroiden im Menschenharn interessierten wir uns besonders für C₁₉-Steroide mit 4 Sauerstoffatomen, von denen etliche bisher noch nicht in ihrer Struktur aufgeklärt worden sind.

Um Artefaktbildung zu vermeiden, verzichteten wir im Gegensatz zu üblichen Harnaufarbeitungsmethoden auf eine Reinigung der Extrakte mit Säuren oder Basen: Frischer mit Äther extrahierter Harn wurde über eine XAD 2-Säule laufen gelassen, an der die Steroidkonjugate adsorbiert wurden¹⁾. Diese wurden mit Methanol eluiert und anschließend in üblicher Weise mit β-Glucuronidase gespalten²⁾. Nach Extraktion der freien Steroide mit Essigester wurde zur Auftrennung der Steroide an Sephadex LH 20 chromatographiert. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel HR-Platten weiter aufgetrennt. Eluierte Zonen wurden ohne Herstellung von Derivaten in der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer untersucht. Bereits bekannte Steroide konnten auf diese Weise rasch identifiziert werden.

¹⁾ H. L. Bradlow, Steroids **11**, 265 (1968).

²⁾ C. G. Beling, Acta Endocrinol., Suppl. **79**, 46 (1963).

Zeigten die Spektren die Gegenwart unbekannter Steroide an, so wurden die betreffenden Fraktionen zur Anreicherung der interessanteren Verbindungen nochmals dünnenschichtchromatographisch zerlegt. Die Fortschritte bei der Anreicherung wurden hierbei massenspektroskopisch überprüft. Im Zuge dieser Untersuchungen konnten wir die Strukturen von mehr als 10 Steroiden, die bisher als natürliche Stoffwechselprodukte noch unbekannt waren, bestimmen. Die Beschreibung dieser Versuche bleibt einer folgenden Mitteilung vorbehalten.

Hier soll über das Vorkommen einer C₁₉-Terpenkarbonsäure berichtet werden, die in relativ großer Menge als Glucuronid ausgeschieden wird und wegen ihres ungewöhnlichen Baus unser besonderes Interesse erweckte.

Die Fraktion 350–370 ml des Äthanol-Eluates der Sephadex-Säule (siehe exp. Teil) enthielt nach Aussage des Massenspektrums (Abb. 2) neben anderen Verbindungen eine Komponente mit der Molekülmasse 320. Uns fiel die Verbindung deshalb auf, weil ihr Spektrum durch das Auftreten eines (M – 58)-Schlüssel-Ions (M – C₃H₆O, bestimmt durch Hochauflösung) gekennzeichnet war. Unserer Steroidspektrkartei, in der sämtliche publizierten Daten über Steroidmassenspektren in Form von Schlüsselbruchstücken und Schlüsseldifferenzen gespeichert sind³⁾, konnten wir entnehmen, daß (M – 58)-Abspaltungen in größerem Ausmaß bisher nur bei einem sonst unsubstituierten Androstan-2-on⁴⁾ beobachtet wurden. Die hochauflösende Massenspektrometrie dieser offenbar noch unbekannten Verbindung ergab als Bruttoformel C₁₉H₂₈O₄, so daß wir zunächst vermuteten, es handle sich um ein Androstanlderivat mit 4 Sauerstoffsubstituenten. Aus der Bruttoformel ließ sich unter Annahme eines tetracyclischen Ringskeletts ableiten, daß die Verbindung noch 2 Doppelbindungsäquivalente enthalten müsse.

Bestimmung der funktionellen Gruppen

Da uns zunächst nur mit der Verbindung C₁₉H₂₈O₄ angereicherte Fraktionen zur Verfügung standen, konnten wir bei den folgenden Untersuchungen weder IR- noch NMR-spektroskopische Untersuchungen anwenden. Wir mußten vielmehr versuchen, durch Umsetzungen von Fraktionen, in denen die Verbindung C₁₉H₂₈O₄ angereichert war, die Art der funktionellen Gruppen zu ermitteln, um dann nach ihrer Kenntnis eine bessere Methode zur Anreicherung und Reindarstellung zu finden.

Ein mit 0.1 mg ausgeführter Versuch der katalytischen Hydrierung (Pd/C oder PtO₂ in Äthanol bei Raumtemperatur) zeigte bei der Analyse im Massenspektrometer, daß keine Umsetzung erfolgt war. Mono-, di- oder trisubstituierte Doppelbindungen konnten daher nicht im Molekül enthalten sein.

Zum Nachweis offenbar vorhandener Hydroxylgruppen wurde 0.1 mg mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert. Die Analyse des Reaktionsproduktes in der Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer ergab das Vorhandensein einer acetylierbaren Hydroxylgruppe [Molekülmasse 362, Zunahme gegenüber der Ausgangsverbindung um 42 ME (Masseneinheiten), Abspaltung von Essigsäure, erkennbar an einem Ion der Masse 302]. Bei der Trimethylsilylierung [0.1 mg, Pyridin/Hexamethyl-disilazan/Trimethylchlorsilan (3:2:1)] zeigte die GC-MS-Analyse hingegen den Eintritt von zwei Trimethylsilylgruppen an (Molekülmasse 464, Zunahme gegenüber der Ausgangsverbindung um 144 ME).

³⁾ Die auf Magnetband gespeicherten Schlüsselbruchstücke und Schlüsseldifferenzen sind demnächst über die Schering AG, Berlin, beziehbar.

⁴⁾ J. E. Gurst und C. Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 5542 (1964).

0.2 mg wurden zur Bestimmung vorhandener Carbonylgruppen einer LiAlH_4 -Reduktion in THF unterworfen. Das Spektrum des Reaktionsproduktes **14** (Abb. 4) zeigte eine Masse von 308 an. Bei Reduktion einer Carbonylgruppe erfolgt eine Massezunahme um 2 ME. Da wir eine Masseverminderung um 12 ME beobachteten, mußte neben der Reduktion einer Carbonylgruppe gleichzeitig die Reduktion einer Carboxylgruppe (Masseverminderung um 14 ME) stattgefunden haben.

Die Verbindung **11** enthielt also im Einklang mit dem oben abgeleiteten Vorhandensein von zwei Doppelbindungsäquivalenten eine Hydroxylgruppe, eine Carboxylgruppe und eine Carbonylgruppe. Bei der Trimethylsilylierung war offenbar die vorhandene Hydroxylgruppe veräthert und gleichzeitig die Carboxylgruppe verestert worden.

Untermauert wurden diese Befunde durch weitere Mikroreaktionen: Bei der Oxidation von 1 mg der Verbindung **11** mit CrO_3 in Essigsäure entstand nach dem Massenspektrum eine Verbindung der Molekülmasse 318 (**12**, Abb. 3) (Oxidation von CHOH zur Carbonylgruppe). Bei der Veresterung mit Diazomethan in Diäthyläther wurde der entsprechende Ester **13** (Molekülmasse 334, Zunahme um 14 ME) erhalten.

Kombination von chemischen Reaktionen und der Massenspektrometrie zur Lokalisierung der funktionellen Gruppen

Die Erkenntnis, daß es sich bei der Verbindung $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$ um eine Säure handelt, ermöglichte uns, die Aufarbeitung einfacher zu gestalten: Nach der enzymatischen Spaltung der Konjugate wurde auf Säuren aufgearbeitet und diese dann zunächst an Sephadex LH 20 (Abtrennung von Fettsäuren und Benzoesäure), dann an Dünnschichtplatten weiter aufgetrennt. Die Reindarstellung der Säure erwies sich aber als diffizil: Die Verbindung $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$ ist nämlich von etlichen sehr ähnlich gebauten Säuren begleitet, die sich von der gesuchten Verbindung nur sehr wenig in ihren Eigenschaften unterscheiden. Eine Reinsolierung gelang daher erst nach mehrfacher Dünnschichtchromatographie. Die in ersten Ansätzen erhaltenen Mengen an reiner Säure reichten deshalb zunächst nur zur Aufnahme eines IR-Spektrums und zur Ausführung weiterer Mikroumsetzungen aus, deren Erfolg massenspektrometrisch kontrolliert wurde.

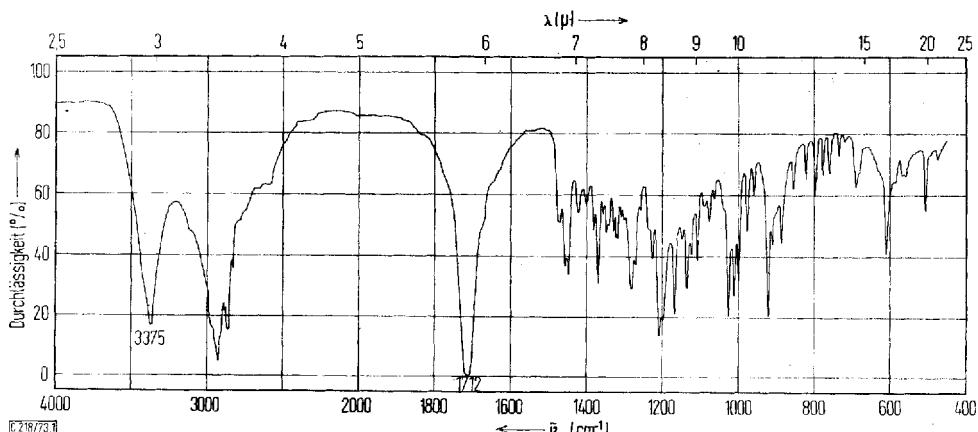


Abb. 1. IR-Spektrum der 2 β -Hydroxy-15-oxoactrylan-4 α -carbonsäure (**11**)

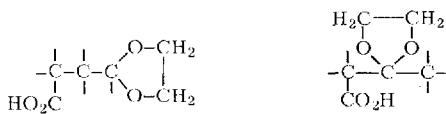
Das IR-Spektrum (Abb. 1) zeigte in Übereinstimmung mit den abgeleiteten funktionellen Gruppen eine OH-Bande (3375 cm⁻¹), eine für CO₂H-Gruppen typische breite OH-Bande zwischen 3200 und 2400 cm⁻¹ sowie eine Carbonylbande bei 1712 cm⁻¹.

Ausgehend von der naheliegenden Annahme, daß die Verbindung C₁₉H₂₈O₄ ein Androstanderivat sei, dessen eine anguläre Methylgruppe zu einer Carboxylgruppe aufoxidiert ist, versuchten wir durch geeignete Reaktionen die Stellung der Carbonyl- und Hydroxylgruppe zu ermitteln.

Die Stellung von Carbonylgruppen in Steroiden läßt sich fast immer aus den Massenspektren der entsprechenden Äthylenacetale bestimmen^{5,6)}, da diese zur Bildung strukturspezifischer Bruchstücke neigen. Alle Versuche, von der Verbindung C₁₉H₂₈O₄ oder deren Methylester ein Äthylenacetal herzustellen, schlugen jedoch fehl — offenbar war also die Carbonylgruppe sterisch stark behindert.

Um die Stellung der Hydroxylgruppe zu ermitteln, wurde die Säure **11** mit CrO₃/Essigsäure zur Diketosäure **12** oxidiert und diese mit Diazomethan zu **10a** verestert. Bei der Umsetzung von **10a** mit Äthylenglycol/p-Toluolsulfonsäure in Toluol entstand ein Monoäthylenacetal **15**. Dessen Massenspektrum war gekennzeichnet durch das Auftreten eines Schlüsselbruchstückes der Masse 157 C₇H₉O₄. Das alkalische Verseifungsprodukt von **15** zeigte in seinem Massenspektrum (Mol.-Masse 362) ein Schlüssel-Ion C₆H₇O₄ der Masse 143. Es war also um 14 ME leichter als das entsprechende Schlüssel-Ion der Masse 157 des Methylesters **15**. Das Spaltstück mußte demnach die ursprünglich vorhandene Carboxylgruppe enthalten.

Damit war die Funktion zweier Sauerstoffatome im Fragment C₆H₇O₄ bekannt. Die restlichen beiden Sauerstoffatome steuerte die Äthylenacetalgruppierung bei. Zwei Kohlenstoffatome sind in der Äthylenacetalgruppierung, eines in der Carboxylgruppe, eines in der ursprünglichen Carbonylgruppe enthalten. Die Carboxylgruppe konnte also nur durch eine Ein- oder Zweikohlenstoffbrücke von der Carbonylgruppe getrennt sein. Als Teilstrukturen kamen daher **1** und **2** in Frage.



1

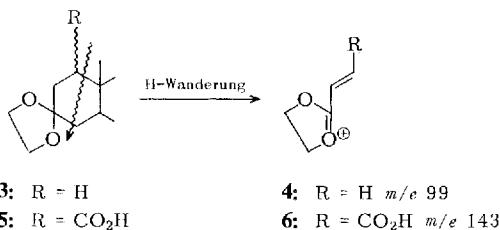
2

2 schied aus, weil dann bei der Oxidation eine instabile und unter den angewandten Reaktionsbedingungen nicht isolierbare β -Ketosäure entstanden wäre.

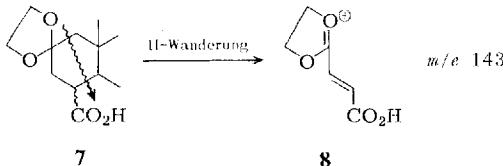
Äthylenacetale von Steroiden mit einer Carbonylgruppe in der Stellung 3 (**3**) bilden ein Schlüssel-Ion der Masse 99 (**4**). Berücksichtigt man, daß das Vorhandensein einer zusätzlichen Carboxylgruppe eine Masseerhöhung um 44 ME bedingt, so ist die Bildung des Schlüssel-Ions der Masse 143 in folgender Weise deutbar:

⁵⁾ H. Audier, A. Diara, M. J. Durazo, M. Fétizon, P. Foy und W. Vetter, Bull. Soc. Chim. France 1963, 2827.

⁶⁾ G. v. Mutzenbecher, Z. Pelah, H. D. Williams, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, Steroids 2, 475 (1963).



Analoge Spaltstücke müssen bei Gegenwart der Acetalgruppierung in der Stellung 2 und der CO_2H -Gruppe in der Stellung 4 entstehen:



Deuteriumaustauschversuche (D_3PO_4/ DCl in D_2O/CH_3OD) stützten die Annahme, daß die Verbindung die Teilstruktur **5** oder **7** enthält: Während **11** bei der Austauschreaktion nur ein D austauschte, zeigte das Massenspektrum des Austauschproduktes des Dioxomethylesters **10a** den Austausch von 5 Wasserstoffatomen an. Der bei der Oxidation entstandenen Carbonylgruppe mußten also zwei Methylengruppen benachbart sein, während die ursprüngliche Carbonylgruppe nur einer CH-Gruppe benachbart sein sollte.

Zu diesem Zeitpunkt hatten wir genügend Material zur Aufnahme eines NMR-Spektrums gesammelt. Das NMR-Spektrum des Esters **13** zeigt die Gegenwart von zwei Methylgruppen an. Eine davon (δ 0.94 ppm s) ist an ein quartäres Kohlenstoffatom gebunden, die zweite (δ 1.10 ppm d) muß an ein Kohlenstoffatom gebunden sein, das noch ein Wasserstoffatom trägt. Das zugehörige Proton wurde durch Entkopplungsexperimente bei δ 2.20 ppm gefunden. Das Signal bei δ 4.25 ppm als Triplet von Triplets mit $J = 11; 11; 4.5$ und 4.5 Hz zeigt ein axiales Proton geminal zu einer Hydroxygruppe und benachbart zu 2 Methylengruppen an.

Damit ließ sich die Hypothese, daß die Säure $C_{19}H_{28}O_4$ ein Steroid ist, nicht länger halten. Mit den gewonnenen Daten wurde eine Literatursuche nach Verbindungen, die die von uns bisher ermittelten funktionellen Gruppen enthalten, vorgenommen. Dabei stießen wir auf die Strukturableitung des Atractyligenins (9) von Piozzi et al. 7,8).

| δ in ppm (J in Hz) | | Zuordnung |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Methylester von 11 | Methylester von 9 | |
| 0.94 s | 0.92 s | 10α -CH ₃ |
| 4.25 tt (11, 4.5) | 4.23 tt (10, 4) | 2α -H _{ax} |
| 3.67 s | 3.68 s | CO ₂ CH ₃ |
| 2.67 dt (2, 5, 5) | 2.66 dt (2, 5, 5) | 4β -H _{eq} |

⁷⁾ *T. Ajello, F. Piozzi, A. Quilico und V. Sprio, Gazz. Chim. Ital. 93, 867 (1963).*

8) *F. Piozzi, A. Quilico, R. Mondelli, T. Ajello, V. Sprio und A. Melera, Tetrahedron* **22**, Suppl. 8, Teil 2, 515 (1966).

9 hat die gleiche Summenformel wie unsere Verbindung **11** und enthält auch ein Strukturelement, das in das von **7** überführbar ist.

Die von *Piozzi* et al.⁸⁾ für die Protonen des A/B-Ringes angegebenen NMR-Daten stimmten so gut mit den von uns gemessenen überein, daß am gleichen Bau dieses Strukturteiles unserer Verbindung **11** und des Atractyligenins (**9**) nicht zu zweifeln war.

Piozzi et al.^{7,8)} haben im Zuge von Abbaureaktionen den Dioxomethylester **10** hergestellt (75–85% 16 β -CH₃, 15–25% 16 α -CH₃).

Der aus unserer Säure durch Oxidation und Veresterung mit Diazomethan erhaltene Diketomethylester **10a** stimmt mit dieser Verbindung in Bezug auf Schmelzpunkt, Drehwert und IR-Spektrum nahezu überein. Die geringen Abweichungen in den physikalischen Konstanten von **10**^{7,8)} und **10a** sind begründet, denn *Piozzi* et al. hatten eine sterisch nicht einheitliche Verbindung erhalten. Demnach mußte sich die von uns aus Harn isolierte Säure **11** vom Atractyligenin (**9**) durch Ersatz der 15-ständigen Hydroxylgruppe durch eine Carbonylgruppe und Absättigung der Doppelbindung unterscheiden. Da *Piozzi* et al.⁸⁾ die Stereochemie von **9** eindeutig bestimmt hatten, blieb nur noch die Frage offen, ob die Methylgruppe in Stellung 16 α - oder β -konfiguriert ist.

Dieses Problem konnten wir durch Analyse des NMR-Spektrums des Triols **14**, das man bei der LiAlH₄-Reduktion von **13** erhält, lösen:

Man erkennt neben einem breiten Multiplett bei δ 4.36 ppm (2 α -H) und einem 2-Protonendublett bei δ 3.95 ppm mit J = 7 Hz (CH₂O), was auf die Verknüpfung der HOCH₂-Gruppe mit einem tertiären C-Atom hinweist, ein 1-Protonendublett bei δ 3.86 ppm mit J = 11 Hz (15-H). Von *MacMillan* et al.⁹⁾ sind die NMR-Daten für die 4 isomeren *ent*-Kauran-15-ole beschrieben worden. Nur das Isomere mit β -ständigem 15-OH und 16-CH₃ besitzt eine Kopplungskonstante $J_{15,16}$ von 11 Hz. Dieser Befund belegt zugleich, daß bei unseren Verbindungen die 16-Methylgruppe durchweg β -ständig sein muß und die Reduktion von **13** mit LiAlH₄ zum Triol **14** eine 15 β -Hydroxygruppe erzeugt. Die so gewonnenen Ergebnisse decken sich mit denen von *Piozzi* et al.⁸⁾ sowohl bezüglich der Stellung der 16-Methyl- als auch der 15-Hydroxygruppe.

Die von uns vermessenen CD-Spektren für **13**, **12** und **10a** zeigen eindeutig das Vorliegen eines 5-Ringketons an^{10,11)} und stimmen mit den getroffenen Zuordnungen voll überein^{8, 11)}.

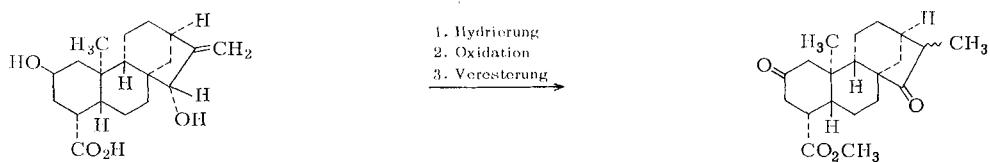
Damit kommt der Säure C₁₉H₂₈O₄ die Struktur **11** zu. Gibt man dem gesättigten Kohlenstoffgrundgerüst des Atractyligenins (**9**) unter Einbezug der Kohlenstoffsubstituenten an C-10 und C-16 den Namen Atractylan, so ist **11** die 2 β -Hydroxy-15-oxoactylan-4 α -carbonsäure. Die zur Strukturableitung ausgeführten Umsetzungen sind in dem folgenden Formelschema zusammengefaßt. Die spektroskopischen Daten sind im experimentellen Teil bei den einzelnen Verbindungen aufgeführt. Die wichtigsten massenspektrometrischen Abbaureaktionen sind unter den betreffenden Massenspektren (Abb. 2–Abb. 4) erläutert.

⁹⁾ *J. MacMillan* und *E. R. H. Walker*, *J. C. S. Perkin I* **1972**, 1272.

¹⁰⁾ *A. I. Scott*, *F. McCapra*, *F. Comer*, *S. A. Sutherland*, *D. W. Young*, *G. A. Sim* und *G. Ferguson*, *Tetrahedron* **20**, 1339 (1964).

¹¹⁾ *J. MacMillan* und *E. R. H. Walker*, *J. C. S. Perkin I* **1972**, 986.

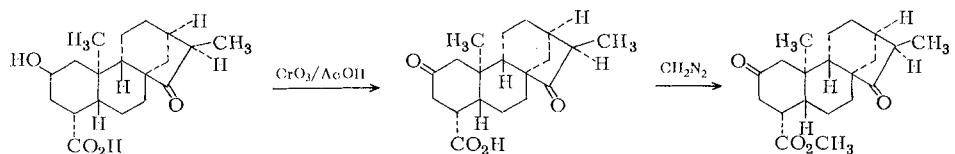
Die zur Strukturaufklärung ausgeführten Reaktionen



9. Attractyligenin

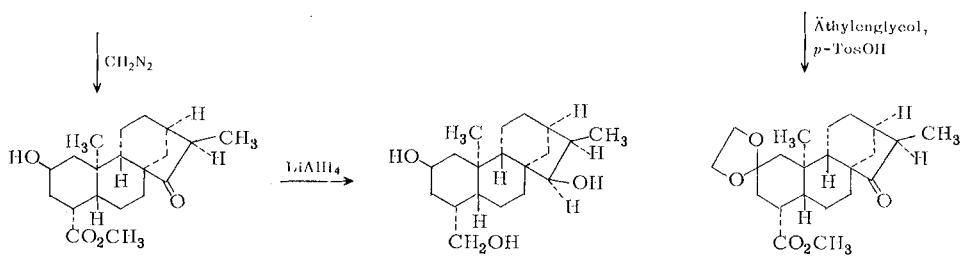
von Piozzi et al.^{7,8)} isoliert

10

11. Säure $C_{19}H_{28}O_4$,
aus Harn isoliert

12

10a

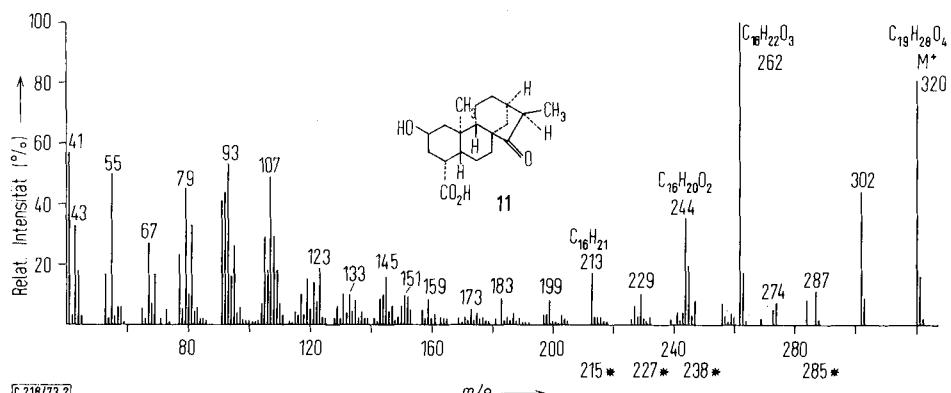


13

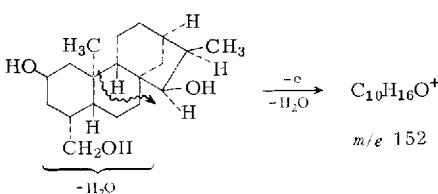
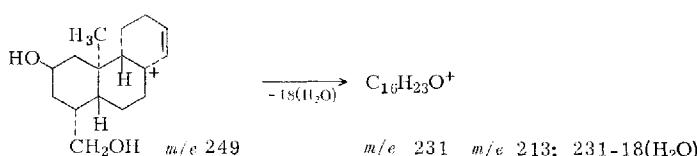
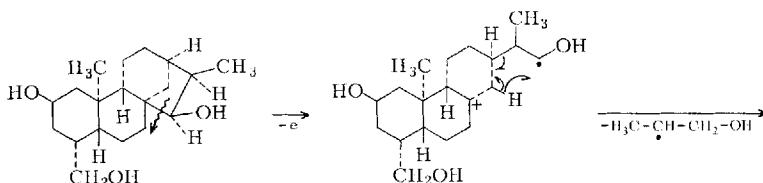
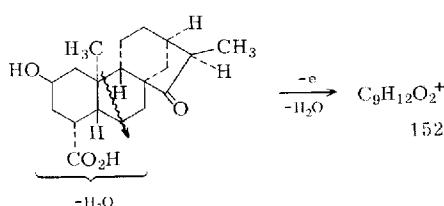
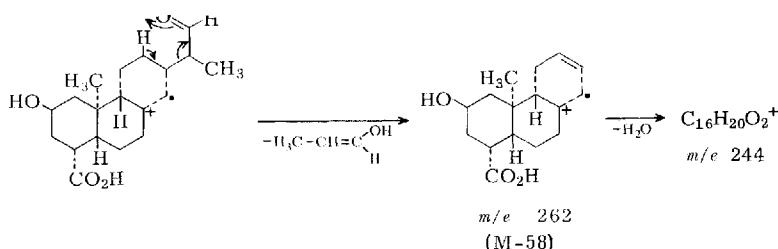
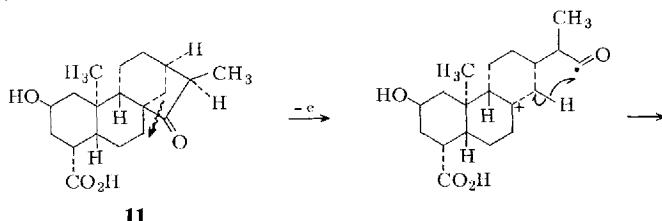
14

15

Massenspektren und Bruchstückbildung

Abb. 2. Massenspektrum der 2β -Hydroxy-15-oxoattractylan-4 α -carbonsäure (11)
Ionenquellentemp. 110°C , Probenverdampfungstemp. 150°C

Die Bildung des Hauptspaltstückes der Masse 262 (M - 58) von **11** lässt sich wie folgt deuten:



Analoge Spaltstücke sind im Spektrum des Methylesters **13** verschoben zu m/e 276 ($M - 58$), 258 [$M - (58 + 18)$], 166 ($152 + 14$); sowie $M - 18$ ($M - \text{H}_2\text{O}$) und $M - 32$ ($M - \text{CH}_3\text{OH}$).

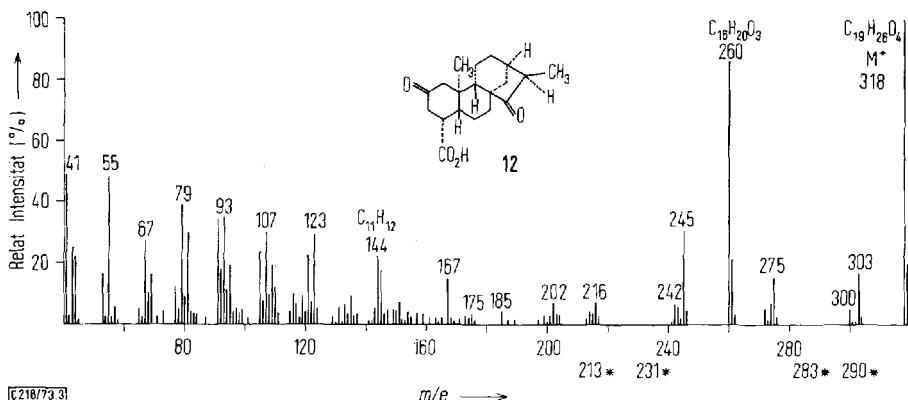


Abb. 3. Massenspektrum der 2,15-Dioxoattractylan-4 α -carbonsäure (12)
Ionenquellentemp. 110°C, Probenverdampfungstemp. 140°C
Schlüssel-Ionen: m/e 260: $M - 58$; 245: $M - (58 + 15)$

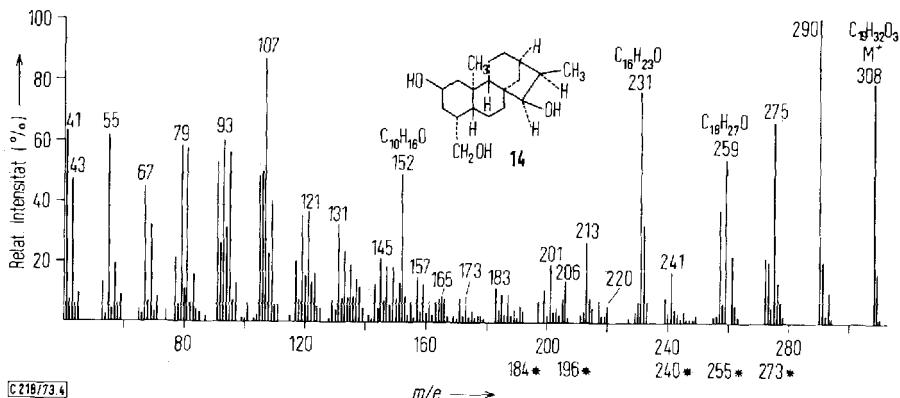
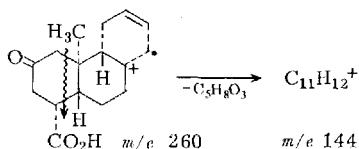


Abb. 4. Massenspektrum des 4 α -(Hydroxymethyl)attractylan-2 β ,15 β -diols (14)
Ionenquellentemp. 110°C, Probenverdampfungstemp. 120°C
Schlüssel-Ionen: m/e 290: $M - 18$ (H_2O)
275: $M - 33$ ($\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3$)
259: $M - 49$ ($\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{OH}$)
257: $M - 51$ ($\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3$)

Nach unserem Wissen sind Verbindungen vom Kaurantyp bisher nur aus pflanzlichen Materialien isoliert worden. Daß solche Verbindungen auch als natürliche Stoffwechselprodukte ausgeschieden werden, war bisher unbekannt.

Bei der Untersuchung von 15 verschiedenen Harnproben haben wir in jedem Fall das Vorhandensein der Säure **11** nachweisen können. Die durchschnittlich in einem Liter Harn ausgeschiedene Menge liegt bei 5–10 mg, jedoch haben wir in einem Falle auch eine Ausscheidung von 40 mg/Liter beobachtet.

Diese relativ großen Tagesausscheidungsmengen werfen die Frage auf, weshalb dieses Stoffwechselprodukt nicht früher aufgefunden wurde und welche Bedeutung der Verbindung im Stoffwechsel zukommt. Offenbar sind die bisher verwandten Aufarbeitungsmethoden biologischer Materialien meist nicht auf eine genaue Untersuchung saurer Inhaltsstoffe angelegt worden. Außerdem ist die Reinisolierung der Verbindung nur nach aufwendigen chromatographischen Verfahren möglich. Die zweite Frage nach der biologischen Bedeutung der Verbindung hoffen wir durch weitere Untersuchungen klären zu können.

Herrn Dr. G. Cleve danken wir für die Aufnahme und Interpretation der CD-Spektren, Herrn Dr. G. Remberg für die Bestimmung der Bruttoformeln durch hochauflösende Massenspektrometrie.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem *Fonds der Chemischen Industrie* danken wir für die Unterstützung der Arbeit durch Sachbeihilfen.

Experimenteller Teil

Bestimmung der spektroskopischen Daten: Die Massenspektren wurden mit einem Varian-MAT-CH 4-Massenspektrometer (E-4B-Ionenquelle) durch Direkteinführung der Proben in die Ionenquelle sowie mit einem Varian CH 7-Massenspektrometer, kombiniert mit einem Varian 1700-Gaschromatographen, stets bei 70 eV aufgenommen.

Alle Bruttoformeln wurden durch „peak matching“ auf einem SM 1-B-Massenspektrometer der Firma Varian bestimmt.

Die NMR-Spektren wurden auf einem Varian HA 100 mit TMS als internem Standard, die IR-Spektren auf einem Perkin Elmer PE 621 und die CD-Spektren auf einem Dichrograph CD 185 von Jouan aufgenommen.

Die optische Drehung wurde an einem Perkin-Elmer 141-Polarimeter in Äthanol (Mikroküvette) bei 20°C gemessen. Schmelzpunkte wurden mit einer Kofler-Apparatur bestimmt, die Werte sind unkorrigiert.

Ausführung der Mikroreaktionen mit unreinem **11**

Acetylierung¹²⁾: 0.1 mg wurde mit 1 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid über Nacht im Dunkeln stehengelassen, danach überschüssiges Reagens im N₂-Strom bei Raumtemp. verdampft.

Trimethylsilylierung¹³⁾: 0.05–0.1 mg in 30 µl Pyridin (über BaO getrocknet) wurden mit 20 µl Hexamethyldisilazan und 10 µl Trimethylchlorsilan über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen.

¹²⁾ I. E. Bush, The Chromatography of Steroids, 1. Aufl., S. 358, Pergamon Press, Oxford 1961.

¹³⁾ A. E. Pierce, Silylation of Organic Compounds, Pierce Chemical Co., Rockford (Illinois) 1968.

gelassen. Dann wurde im N_2 -Strom eingedampft, die Trimethylsilylather wurden in n-Heptan aufgenommen und auf die Säule des GC-MS-Kombinationsgerätes gespritzt [1.50 m-Glassäule, Innendurchmesser 2 mm, 3% OV 17 auf Chromosorb W, AW, DMCS (80–100 mesh), Injektortemp. 270°C, Säulentemp. 250°C, Trägergas: Helium, 20 ml/min].

Oxidation¹²⁾: 0.5 mg in 1 ml Eisessig wurden mit einigen Tropfen 0.2 proz. wäsr. CrO_3 -Lösung versetzt und über Nacht stehengelassen. Die Lösung der Reaktionsmischung in 10 ml Äthylacetat wurde 5 mal mit je 2 ml dest. Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtrieren im Rotationsverdampfer eingedampft.

Reduktion: 0.2 mg wurden in 2 ml wasserfreiem THF mit einer Spatelspitze $LiAlH_4$ versetzt und 1 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das überschüss. $LiAlH_4$ mit wäsr. THF (10% H_2O) zersetzt und die Mischung zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde dekantiert, filtriert und im Rotationsverdampfer eingeeengt.

Acetalisierung¹²⁾ (Darstellung von **15**): 1 mg **10a** wurde mit 10 ml Toluol, 0.01 ml Äthenglycol und einem Kristall *p*-Toluolsulfonsäurehydrat 3 Tage am Mikrowasserabscheider unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde im Eisbad abgekühlt und mit einigen Tropfen Pyridin alkalisiert. Dann wurde in 50 ml Äther gelöst und 3 mal mit je 10 ml dest. Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtrieren im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht.

Die Verseifung von **15** erfolgte durch Erhitzen der Methanollösung (10 ml) mit 2 ml 2 N NaOH-Lösung auf dem siedenden Wasserbad (1 h). Nach Abkühlen im Eisbad wurde mit Essigsäure angesäuert und mit 50 ml Äthylacetat extrahiert. Der Äthylacetat-Extrakt wurde mit Pyridin alkalisiert, 3 mal mit je 10 ml dest. Wasser gewaschen und nach Trocknen über Natriumsulfat filtriert und im Rotationsverdampfer eingedampft.

Deuterium-Austausch¹⁴⁾: 0.05–0.1 mg wurden in 5–10 ml CH_3OD mit einer Mischung von einer Spatelspitze PCl_5 und 0.2 ml D_2O unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 24 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen im Eisbad wurde mit Pyridin alkalisiert, in 10 ml absol. Äther gelöst und 4 mal mit je 1 ml dest. Wasser gewaschen. Die Ätherlösung wurde über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und im Rotationsverdampfer eingedampft.

Katalytische Hydrierung: 0.1 mg wurden in 5 ml Äthanol mit einer kleinen Spatelspitze Katalysator (10% Pd auf Aktivkohle oder PtO_2) versetzt und bei Raumtemperatur mit H_2 bei Normaldruck 5 h unter Rühren (Magnetrührer) hydriert.

Veresterung mit Diazomethan: 0.1 mg Säure in 0.5 ml Methanol wurden bis zur bleibenden Gelbfärbung mit verdünnter, frisch hergestellter äther. Diazomethanolösung behandelt. Dann wurde das Lösungsmittel bei Raumtemp. im N_2 -Strom verdampft.

Isolierung von 2 β -Hydroxy-15-oxoactrylan-4 α -carbonsäure (11) aus Harn

a) **Aufarbeitung ohne Säurenabtrennung**: 1 Liter frisch gesammelter Harn wurde zur Entfernung der freien Steroide und der Lipide 3 mal mit je 100 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden 3 mal mit je 20 ml dest. Wasser gewaschen und das Waschwasser zum Harn gegeben. Im Harn gelöster Äther wurde bei 37°C unter Rühren im N_2 -Strom entfernt. Zur Abtrennung der Konjugate wurde der Harn (1 Liter) auf eine XAD 2-Säule (500 g) gegeben, die Salze wurden mit 1.2 Liter dest. Wasser ausgewaschen und danach die Konjugate mit 1.5 Liter Methanol eluiert¹⁾. Die Methanollösung wurde im Rotationsverdampfer (Badtemp. 35°C) eingedampft, der Rückstand in 500 ml Acetatpuffer (0.5 M, pH 4.9) gelöst und mit β -Glucuronidase (aus Rinderleber, Merck, Aktivität 40 Units) bei 37°C 3 Tage unter N_2 -Atmosphäre inkubiert²⁾.

¹⁴⁾ J. Seibl und T. Gäumann, *Helv. Chim. Acta* **1963**, 2857.

Die gespaltenen Glucuronide wurden mit 3 mal 300 ml Äthylacetat extrahiert, die vereinigten Äthylacetat-Lösungen 3 mal mit je 100 ml dest. Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtrieren im Rotationsverdampfer eingedampft. Zur Entfernung der restlichen Essigsäure wurde der ölige Rückstand im Vakuumexsikkator über KOH getrocknet.

Der getrocknete Extrakt (1.3 g) wurde in 20 ml Äthanol gelöst und an Sephadex LH 20 (1 m-Säule, Typ SR 25/100 mit 2 Adaptoren, Elutionsmittel: Äthanol) chromatographiert. Die Fraktion 350–370 ml Äthanol-Eluat (20 mg) wurde an einer Kieselgel HR (Merck-Platte (0.5 mm, Laufmittel: CHCl₃/MeOH 19:1, Stufentechnik) aufgetrennt. Die Zone 3 – (8 mg) – (Sprühreagens 0.5 proz. J₂-Lösung in CHCl₃) enthielt die Säure C₁₉H₂₈O₄ (**11**).

b) *Aufarbeitung mit Säurenabtrennung:* Aus 10 Liter Harn wurden in Portionen zu 1 Liter (frisch gesammelt) die Konjugate mit XAD 2 abgetrennt (wie a, jedoch ohne vorherige Extraktion der freien Steroide und der Lipoide). Die Konjugate von 10 Liter Harn wurden in 2 Liter Acetatpuffer (0.5 M, pH 4.9) gelöst und mit 7 Flacons Helicase (von Biologique Francaise, Aktivität: 1 Mio. Fishman-Einheiten β -Glucuronidase und 15 Mio. Roy-Einheiten Arylsulfatase pro Flacon) bei 37°C 3 Tage unter N₂-Atmosphäre inkubiert.

Dann wurde 5 mal mit je 300 ml Äthylacetat extrahiert, und die vereinigten Extrakte wurden durch Schütteln mit Eis auf 0°C abgekühlt. Die Säuren wurden 3 mal mit je 300 ml eishaltiger 1 N NaOH bei 0°C extrahiert und die vereinigten NaOH-Lösungen 2 mal mit je 100 ml Äthylacetat ausgeschüttelt.

Nach Versetzen der NaOH-Lösungen mit weiteren 200 g Eis wurde mit 2 N H₂SO₄ angesäuert und 3 mal mit je 300 ml Äthylacetat extrahiert. Die vereinigten Äthylacetatextrakte wurden 5 mal mit je 100 ml dest. Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtrieren im Rotationsverdampfer eingedampft. Nach Trocknen über KOH im Vakuumexsikkator wurde der Rückstand in 70 ml Äthanol gelöst und an Sephadex LH 20 (1 m-Säule, Typ SR 25/100, Elutionsmittel: Äthanol) chromatographiert. Die Fraktion 330–390 ml Äthanol-Eluat (2.2 g tiefbraunes Öl) enthielt nach MS-Analyse die Säure C₁₉H₂₈O₄ (**11**).

Zur weiteren Reinigung wurde an 10 DC-Platten (Kieselgel HR, Merck; Plattengröße: 20 × 20 cm, Schichtdicke 1 mm) chromatographiert. Die Trennung erfolgte durch mehrfaches Entwickeln mit verschiedenen Laufmitteln: 1. CHCl₃, 2. Diäthyläther, 3. CHCl₃/MeOH/AcOH (94:5:1), Stufentechnik, 2 mal laufengelassen.

Als Sprühreagens diente eine 0.5 proz. J₂-Lösung in CHCl₃ (7 Zonen). Zone 4 (400 mg) enthielt die Säure C₁₉H₂₈O₄ (**11**). Die Wiederholung der Dünnenschichtchromatographie ergab 120 mg kristallines Produkt. Nach Umkristallisation aus Aceton erhielten wir 90 mg reine Säure **11**, Schmp. 243–248°C, [α]_D²⁰ = -117° (c = 2.8 mg/ml).

MS: C₁₉H₂₈O₄ Ber. 320.1987 Gef. 320.1983.

IR (KBr): 3375 (HO), 3200–2400 (CO₂H), 1712 cm⁻¹ (C=O und CO₂H). — NMR (CD₃OD): δ 1.07 (3 H, s, 10 α -CH₃), 1.09 (3 H, d, J = 7 Hz, 16 β -CH₃), 2.65 (1 H, dt, J = 2, 5 und 5 Hz, 4 β -H), 4.17 ppm (1 H, tt, J = 11, 11, 4.5 und 4.5 Hz, 2 α -H); in C₅D₅N: δ 1.22 (3 H, s, 10 α -CH₃), 1.07 (3 H, d, J = 7 Hz, 16 β -CH₃), 2.96 (1 H, dt, J = 2, 5 und 5 Hz, 4 β -H), 4.79 ppm (1 H, tt, J = 11, 11, 4.5 und 4.5 Hz, 2 α -H).

Darstellung der Derivate

2,15-Dioxoactractylan-4 α -carbonsäure(12**)-Hydrat:** **12** erhielten wir durch CrO₃-Oxidation von **11** (20 mg, Ausführung wie Mikroreaktion). Die Reinigung erfolgte durch DC an Kieselgel HR, Laufmittel: CHCl₃/MeOH (19:1), Umkristallisation aus Äther/Heptan, Ausb. 10 mg, Schmp. 193–203°C (Lit.⁷ 197°C). — IR (KBr): 3300–2400 (CO₂H), 1735 und 1718 (15-C=O und CO₂H), 1690 (2-C=O), 3430 und 1650 cm⁻¹ (H₂O). — CD (Dioxan): λ 282 sh (Δε = -1.08), 291 sh (-1.75), 299 (-2.36), 308 (-2.60), 318 nm (-1.71).

2,15-Dioxoattractylan-4 α -carbonsäure-methylester (10a): Darstellung durch Umsetzung von 15 mg **12** mit CH_2N_2 (Ausführung wie Mikroreaktion). Nach DC an Kieselgel HR (Laufmittel Diäthyläther) wurde aus $\text{MeOH}/\text{Diäthyläther}$ umkristallisiert, Ausbeute 10 mg, Schmp. $191\text{--}194^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} = -145^\circ$ ($c = 2.6 \text{ mg/ml}$). — IR (KBr): 1730 und 1720 (15-C=O und CO_2CH_3), 1709 cm^{-1} (2-C=O). — CD (Dioxan): λ 282 sh ($\Delta\epsilon = -1.36$), 291 sh (-2.21), 299 (-2.96), 308 (-3.24), 318 nm (-2.14).

2 β -Hydroxy-15-oxoattractylan-4 α -carbonsäure-methylester (13): Aus **11** (12 mg) durch Veresterung mit Diazomethan. Der Ester (12 mg) fiel ölig an und ließ sich nicht kristallisieren. — IR (CHCl_3): 3610 und 3480 (HO), 1722 cm^{-1} (C=O und CO_2CH_3). — NMR (CDCl_3): δ 0.94 (3H, s, 10α -CH₃), 1.10 (3H, d, $J = 7 \text{ Hz}$, 16β -CH₃), 2.20 (1H, quin, $J = 7 \text{ Hz}$, 16α -H), 2.67 (1H, dt, $J = 2, 5$ und 5 Hz , 4β -H), 3.67 (3H, s, CO_2CH_3), 4.25 ppm (1H, tt, $J = 11, 11$, 4.5 und 4.5 Hz , 2α -H). — CD (Dioxan): λ 218 ($\Delta\epsilon = -0.80$), 307 (-0.65), 317 nm (-0.62).

4 α -(Hydroxymethyl)attractylan-2 β ,15 β -diol (14): Darstellung durch Reduktion von **13** (20 mg) mit LiAlH_4 (Ausführung wie Mikroreaktion). Die Reinigung erfolgte durch DC an Kieselgel HR, Laufmittel: Aceton/Chloroform (1:1), Schmp. $213\text{--}217^\circ\text{C}$, Ausb. 14 mg. — IR (KBr): 3490, 3390, 3270 cm^{-1} (HO). — NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 1.06 (3H, s, 10α -CH₃), 1.16 (3H, d, $J = 7 \text{ Hz}$, 16β -CH₃), 3.86 (1H, d, $J = 11 \text{ Hz}$, 15α -H), 3.95 (2H, d, $J = 7 \text{ Hz}$, CH_2O), 4.36 ppm (1H, m, breit, 2α -H).

[218/73]