Prom. Nr. 3544

Zur Biogenese zweier Inhaltsstoffe von Menyanthes trifoliata

Von der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE IN ZÜRICH

zur Erlangung
der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte

PROMOTIONSARBEIT

vorgelegt von

SYLVIA BRECHBÜHLER-BADER
dipl. Natw. ETH
von Zürich und Auswil (Kt. Bern)

Referent: Herr Prof. Dr. D. Arigoni
Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Eschenmoser

Juris-Verlag Zürich
1964

Leer - Vide - Empty

Meinen lieben Eltern

und

Hansueli

in Dankbarkeit gewidmet

Leer - Vide - Empty

Meinem sehr verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. D. Arigoni,

unter dessen Leitung ich diese Promotionsarbeit ausführen durfte, möchte ich herzlich danken für die vielen wertvollen Ratschläge und Anregungen und die unermüdliche Hilfe, die er mir jederzeit zuteil werden liess.

Leer - Vide - Empty

INHALTSVERZEICHNIS

THEORETISCHER TEIL 9

A. Einleitung 9

B. Allgemeines zur Biogenese von Sterinen 10

Biogenese von Cholesterin 11

Biogenese von Phyto- und Mycosterinen 16

Biogenese der zusätzlichen C-1-Seitenkette von Mycosterinen 19

Biologische Methylierungen 20

Biogenese der zusätzlichen C-2-Seitenkette von Phytosterinen 25

C. Eigene Arbeiten zur Biogenese von α-Spinasterin 26

Abbau der Seitenkette von α-Spinasterin 32

Diskussion der Resultate 35

D. Zur Struktur von Loganin 40

Frühere Arbeiten 40

Eigene Arbeiten 42

E. Zur Biogenese von Loganin Theorie und eigene Arbeiten 49

F. Anhang Zur Methodik des Abbaus radioaktiver Essigsäure nach Schmidt 55

EXPERIMENTELLER TEIL 58

ZUSAMMENFASSUNG 84

LITERATURVERZEICHNIS 85

Leer - Vide - Empty

THEORETISCHER TEIL

A. Einleitung

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Aufklärung der Biogenese von Triterpenen konnte von Guglielmetti[1] in unserem Laboratorium das bereits früher isolierte, aber nicht näher untersuchte, charakteristische Sterin von Menyanthes trifoliata (Wasser- oder Bitterklee) als α -Spinasterin identifiziert werden. Im Verlaufe dieser Arbeiten erwies sich Menyanthes trifoliata als besonders geeignet für Züchtungsversuche mit radioaktiv markierten Vorläufern. Dieser Umstand, sowie die Tatsache, dass α -Spinasterin zusätzlich zum typischen Steringerüst eine Aethylseitenkette besitzt, deren Biogenese im Gegensatz zu derjenigen des Gerüstsystems unbekannt ist, veranlassten die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen biogenetischen Untersuchungen.

Menyanthes trifoliata enthält ausserdem in grösseren Mengen Loganin, einen schon von Bridel[2] isolierten glukosidischen Bitterstoff, über dessen Struktur nur spärliche Angaben vorlagen, welchem jedoch eine Brückenstellung bei der Biogenese weiterer Stoffklassen, insbesondere von Indolalkaloiden zugesprochen worden ist. In einem zweiten Abschnitt werden die ersten Ansätze zur Lösung des von Loganin gestellten biogenetischen Problems beschrieben, denen Versuche zur Strukturaufklärung vorausgeschickt werden mussten.

B. Allgemeines zur Biogenese von Sterinen

Sterine sind hochmolekulare, gut kristallisierende, sekundäre Alkohole mit 27 bis 31 Kohlenstoffatomen. Sie kommen teils in freier Form, teils mit Fettsäuren verestert und oft auch glykosidisch gebunden in den verschiedensten Organismen vor *).

Chemisch leiten sich die Sterine vom Cyclopentano-perhydrophenanthrengerüst ab. Sie besitzen bis auf wenige Ausnahmen die gleiche Stereochemie des Ringgerüstes und unterscheiden sich nur in Anzahl und Lage von Doppelbindungen, sowie in Art und räumlicher Lage der allfällig am Kohlenstoffatom 24 sitzenden Seitenkette.

Aus historischen Gründen werden Sterine eingeteilt in Zoosterine und Phytosterine, von denen die Algen- und Mycosterine abgetrennt werden. Sowohl Zoo- als auch Phytosterine werden im ganzen Tier- und Pflanzenreich gleichermassen gefunden. Ursprünglich umfasste die Gruppe der Zoosterine nur Verbindungen mit 27 Kohlenstoffatomen, für die Mycosterine war eine zusätzliche Methylgruppe und für die Phytosterine eine Aethyl- oder Aethylidenseitenkette in Stellung 24 des Steroidgerüstes typisch. Heute jedoch sind die Grenzen zwischen den einzelnen Gruppen fliessend.

Eine besondere Stellung unter den Steroiden nehmen bestimmte tetracyclische Triterpene und deren Abkömmlinge ein, bei welchen an einem cyclischen Steroidgerüst eine bis drei zusätzliche Methylgruppen haften. Im Lichte der Ergebnisse neuester Forschungen muss man sie als Uebergangsglieder zwischen den eigentlichen Terpenen und den "klassischen" Sterinen bezeichnen. Auf die spezielle Rolle dieser Verbindungen wird im Zusammenhange mit der Interpretation der Biogenese von Steroiden näher eingegangen (vgl. S. 15 ff).

Der Verlauf der Biogenese von Sterinen ist für das Zoosterin Cholesterin eingehend untersucht worden. Die allgemeinen Züge dieser Biogenese dürfen heute als gesichert angesehen werden. Ungeklärt ist noch die Reihenfolge bestimmter Uebergänge, sowie der mechanistische Ablauf verschiedener Einzelreaktionen. Die Biogenese von Phyto- und Mycosterinen ist weniger eingehend untersucht worden. Im

---

*) Für eine Uebersicht vgl. Heusner[3].

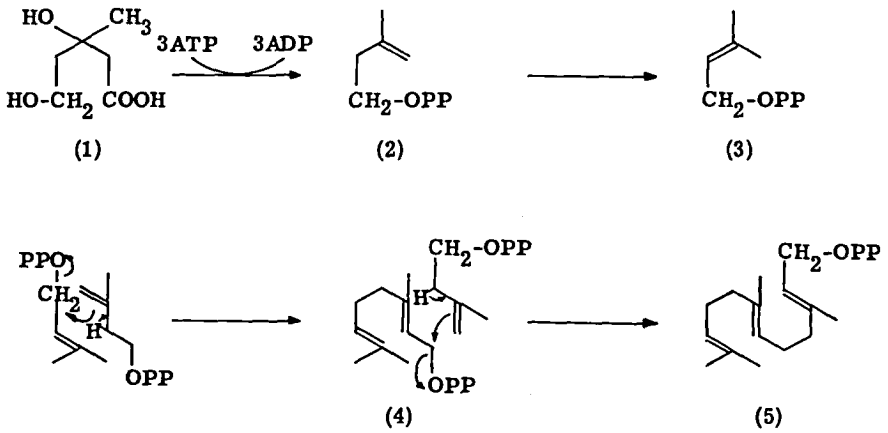
folgenden wird die zu Cholesterin führende biogenetische Reaktionsfolge aufgezeichnet, unter besonderer Berücksichtigung der heute noch nicht genau bekannten Uebergänge. Ausserdem werden die an Phyto- und Mycosterinen gemachten Untersuchungen zusammengestellt und die Parallelen und Abweichungen von der Biogenese von Cholesterin dargelegt.

Biogenese von Cholesterin

Der Verlauf der Biogenese von Cholesterin ist von verschiedenen Autoren in Uebersichtsreferaten[1) 4) 5)] diskutiert worden.

Es steht heute fest, dass aus Acetyl-CoA[*)] über verschiedene Zwischenstufen Mevalonsäure (1) gebildet wird. Diese geht unter Beteiligung von drei Einheiten ATP in Isopentenylpyrophosphat (2) über (vgl. Schema I), aus dem durch eine Isomerase Dimethylallylpyrophosphat (3) entstehen kann. Kondensation dieser zwei C-5-Einheiten führt zur Ausbildung von Geranylpyrophosphat (4); eine weitere analoge Konden-

Schema I

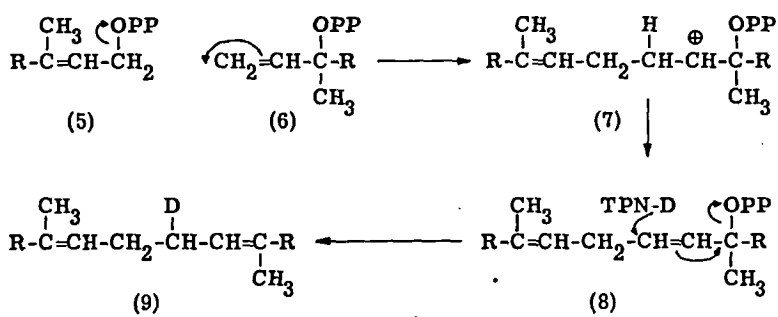


*) In der vorliegenden Arbeit wird von den folgenden Abkürzungen Gebrauch gemacht: CoA = Coenzym A; PP = Pyrophosphat; TPN = Triphosphopyridin-nucleotid; TPNH = Dihydrotriphosphopyridin-nucleotid; FAD = Flavinadenin-nucleotid; ATP = Adenosin-triphosphat.

sation ergibt Farnesylpyrophosphat (5). Der Mechanismus der Bildung von Squalen aus zwei Einheiten Farnesylpyrophosphat ist noch nicht endgültig geklärt. Lynen und Popják[6-8] konnten erstmals zeigen, dass diese Reaktion unter Beteiligung von TPNH vor sich geht. Im Verlauf der Kondensation wird ein Wasserstoffatom von C_1 einer Farnesylpyrophosphateinheit gegen ein Wasserstoffatom von TPNH ausgetauscht[9-11]. Die neuesten Untersuchungen zeigen, dass diese Kondensation streng stereospezifisch verläuft. Dies bezieht sich sowohl auf das Reduktionsmittel TPNH, von welchem nur die B-Seite*) an der Reaktion beteiligt ist, als auch auf das Substrat. Die sterische Lage des durch TPNH eingeführten Wasserstoffatoms wurde sowohl in Abbauprodukten von enzymatisch hergestelltem Squalen als auch in nachträglich daraus entstehendem Cholesterin untersucht. Es zeigte sich dabei, dass dieses Wasserstoffatom in Cholesterin[13] lediglich 11α- oder 12β-Lage einnehmen kann. Die Tatsache, dass das eingeführte Wasserstoffatom an zwei Stellen auftaucht, wird verursacht durch die Symmetrie des Vorläufers Squalen.

Die Schwierigkeit der mechanistischen Erklärung dieser Reaktion liegt darin, dass zwei identische potentiell kationoide Reaktionspartner miteinander verknüpft werden müssen. Popják und Cornforth[4) 5)] ziehen zwei mögliche Mechanismen in Betracht, die unter Berücksichtigung aller gefundenen Tatsachen eine plausible Erklärung dieser Kondensation bieten. Einer dieser Reaktionsmechanismen (Schema II) stützt sich auf die Beobachtung, dass aus Leberpräparaten neben Farnesylpyrophosphat

Schema II

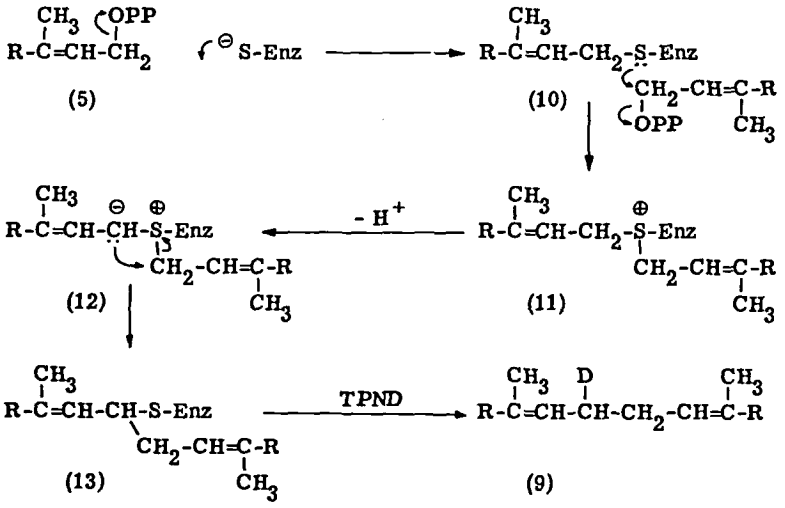


*) Zur Nomenklatur vgl. Cornforth et al.[12].

immer, wenn auch in kleinen Mengen, Nerolidylpyrophosphat (6) *) isoliert werden kann, das man sich durch Allylumlagerung aus Farnesylpyrophosphat entstanden denken kann. Nerolidylpyrophosphat besitzt nunmehr ein potentiell anionoides Zentrum, das befähigt ist, mit dem durch Verlust einer Pyrophosphateinheit aus Farnesylpyrophosphat entstehenden Kation zu reagieren. Das primär gebildete Kation (7) stabilisiert sich unter Verlust eines Protons. Die Abspaltung der zweiten Pyrophosphateinheit, Wanderung der Doppelbindung und reduktive Absättigung des entstehenden Kations durch TPNH ermöglichen formal die Ausbildung von Squalen (9).

Eine zweite Hypothese stützt sich auf die Beobachtung, dass die Bildung von Squalen aus zwei Einheiten Farnesylpyrophosphat nur in Anwesenheit eines Enzyms mit einer freien Sulfhydrylgruppe vor sich geht. Cornforth[5] schlägt aus diesem Grunde für diese Kondensation ein Schema vor (Schema III), welches eine der Stevensumlagerung ähnliche Stufe einbezieht.

Schema III



Doppelte Alkylierung der Thiolgruppierung des Enzyms mit zwei Molekülen

*) Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem gefundenen Nerolidylpyrophosphat um einen bei der Aufarbeitung der Leberpräparate entstehenden Artefakt handelt.

Farnesylpyrophosphat (5) führt zur Ausbildung des Sulfoniumions (11). Durch Umlagerung des daraus ableitbaren Ylids (12) kann an die Enzymoberfläche gebundenes Squalen entstehen (13). Die Ablösung vom Enzym erfolgt reduktiv mit Hilfe von TPNH. Das an das Enzym gebundene Squalen (13) könnte identisch sein mit einer von Porter et al. [14] inzwischen isolierten, schwefelhaltigen Enzymverbindung.

Keine der beiden vorgeschlagenen Hypothesen kann auf Grund der bis heute gefundenen Tatsachen ausgeschlossen werden.

Arbeiten von Bloch et al. [15] [16] sowie Popják et al. [17] bestätigen, dass die Cyclisation des Squalens mit nachfolgender Wanderung der Methylgruppen unter Bildung von Lanosterin der von Ruzicka et al. [18] postulierten biogenetischen Isoprenregel folgt.

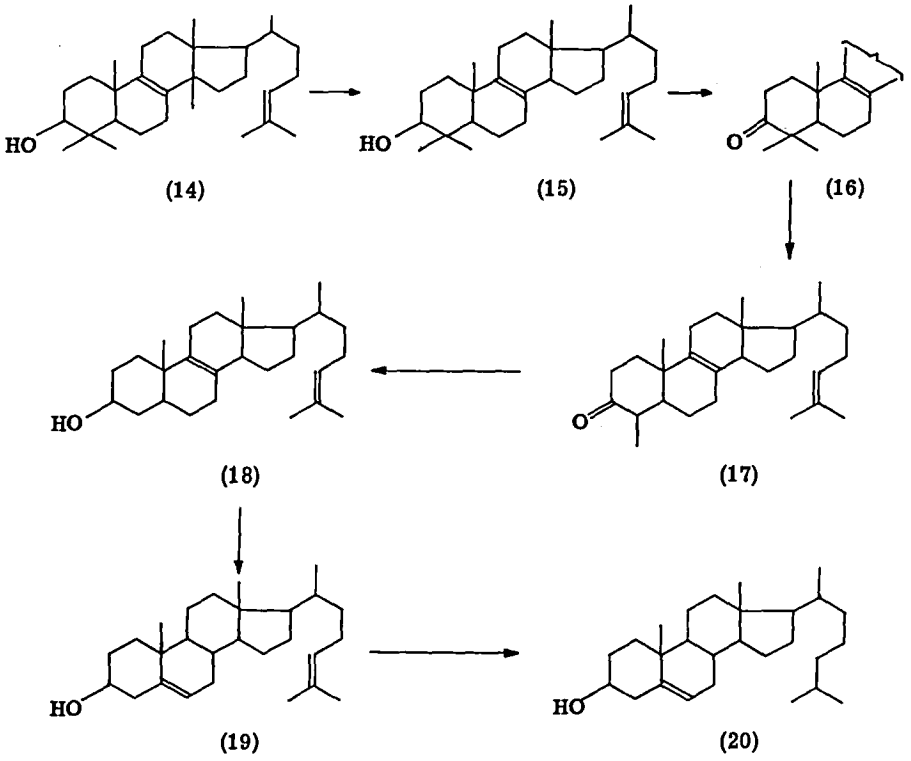
Die Sequenz der Zwischenstufen beim Uebergang von Lanosterin (14) zu Cholesterin (20) ist nicht lückenlos festgelegt, sondern nur durch Identifikation verschiedener Zwischenprodukte und deren Ueberführung in vivo oder durch Enzympräparate in vitro in Cholesterin in seinen gröberen Zügen erkannt worden.

Die Reihenfolge der Abspaltung der drei Methylgruppen ist von Gautschi und Bloch [19] untersucht worden. Die auf Grund ihrer Ergebnisse postulierte Reaktionsfolge ist in Schema IV zusammengestellt. Alle dort aufgezeichneten Verbindungen wurden isoliert und in vivo in Cholesterin überführt. Olson, Lindberg und Bloch [20] zeigten im weiteren, dass diese Umwandlung unter Beteiligung von Sauerstoff abläuft. Die drei eliminierten Methylgruppen werden in Form von Kohlendioxyd abgespalten. Es ist daher vorgeschlagen worden, dass die Methylgruppen zuerst zu den entsprechenden Carboxylgruppen oxydiert werden. An der Abspaltung der Methylgruppe in Stellung 14 dürfte die Δ^{8}-Doppelbindung massgebend beteiligt sein *). Versuche mit geeignet markierten Substraten zeigen, dass beim Uebergang von 4,4-Dimethylcholesta-8,24-dien-3β-ol (15) zu Cholesterin das α-ständige Wasserstoffatom in Stellung 3 ausgetauscht wird, was auf das intermediäre Auftreten einer ketonischen Zwischenstufe hinweist. Dementsprechend ist die Abspaltung der Methylgruppen in Stellung 4 mit der Decarboxylierung einer β-Ketosäure vergleichbar.

---

*) In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Interesse, dass bei Verbindungen, bei welchen die Kohlenstoffatome 9, 10 und 19 als Glieder eines Cyclopropanringes vorliegen, noch keine 14-Norverbindungen aufgefunden wurden.

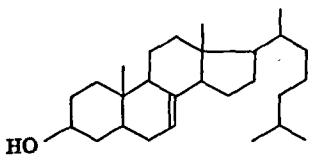
Schema IV



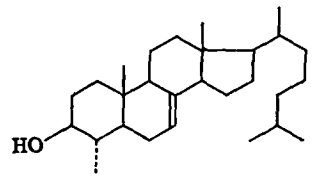
Der Mechanismus der Verlagerung der Doppelbindung von der 8,9- zur 5,6-Stellung ist nicht bekannt, scheint jedoch nicht in einer prototropen Verschiebung zu bestehen, da der Prozess nur unter aeroben Bedingungen abläuft [21].

Verschiedene in neuerer Zeit aufgefundene Verbindungen lassen vermuten, dass Lanosterin auch über andere Zwischenstufen, als in Schema IV vorgeschlagen, in Cholesterin überführt werden kann. So konnten z.B. Biggs et al. [22] Lathosterin (21) aus Kaninchen isolieren und in vivo in Cholesterin umwandeln. Kandutsch und Russel [23] isolierten aus Tumorzellen von Mäusen neben Cholesterin und Lanosterin auch 24,25-Dihydrolanosterin, 4-α-Methyl-Δ^8-Cholestenol,

Δ^7-Cholestenol und 7-Dehydrocholesterin. Einbauversuche mit markiertem Natriumacetat machen es wahrscheinlich, dass auch die Umwandlung eines 24,25-Dihydrolanosterins in Cholesterin möglich ist. Das Vorliegen einer so weit von den Reaktionszentren entfernten Doppelbindung scheint somit auf die Demethylierung und Verschiebung der Doppelbindung keinen Einfluss zu haben. Methostenol (22), ein weiteres mögliches Zwischenprodukt, wurde von Neiderhiser und Wells[24] aus Ratten isoliert. Methostenol scheint identisch zu sein mit dem aus Kakteen isolierten Phytosterin Lophenol (22)[25] und stellt ein weiteres 4α-Methylsterin dar. Die Annahme, dass dieses 4α-Methylsterin tatsächlich eine Zwischenstufe bei der Entstehung von Cholesterin aus Lanosterin darstellt, darf aber nicht zum Schluss führen, dass die 4β-Methylgruppe zuerst abgespalten wird, da die Eliminierung über die Enolform der 3-Ketoverbindung erfolgen dürfte.



(21)



(22)

Biogenese von Phyto- und Mycosterinen

Ueber die Biogenese von Phyto- und Mycosterinen liegen nur spärliche experimentelle Daten vor. Diese fügen sich aber gut ein in das für Cholesterin aufgestellte Schema.

Ein experimenteller Hinweis auf die Uebereinstimmung der Biogenese von Phytosterinen und Cholesterin ist der beobachtete Einbau von markierter Essigsäure und Mevalonsäure in verschiedene Phytosterine und deren Abkömmlinge in mehreren Pflanzen. Die Ergebnisse dieser von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführten Versuche sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

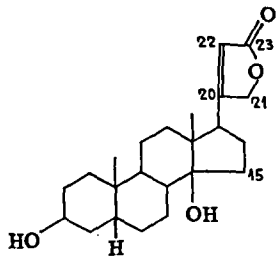
Pflanze	Steroid	Mevalon-säure	Essig-säure	Literatur
Solanum lycopersicum	Stigmasterin	+	-	27)
Solanum tuberosum	Stigmasterin	+	o	32)
	β-Sitosterin	+	o	
Pisum sativum	β-Sitosterin	+	o	31)
Salvia officinalis	β-Sitosterin	++	+	28)
Salvia sclarea	β-Sitosterin	+	o	29)
Ocimum basilicum	β-Sitosterin	+	o	30)
Digitalis lanata	Digitoxigenin	+	+	33)
Dioscorea floribunda	Diosgenin	-	+	34)
Tomatensetzlinge	Tomatin	o	+	35)
Kartoffelkeimlinge	Chaconin	+	+	36)
	Solanin	+	+	

+ Einbau beobachtet
- Einbau nicht beobachtet
o Einbau nicht untersucht

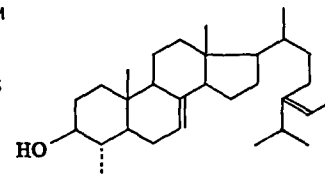
Nur in einem Fall, bei Digitoxigenin (23)[26], wurde der Abbau einer markierten Verbindung durchgeführt. Dabei zeigte es sich, dass beim Einbau von (2-^{14}C)-Mevalonsäure in Digitalis lanata das aus dem Pflanzenmaterial isolierte Digitoxigenin keine Aktivität im Kohlenstoffatom 22 und 30 % der Totalaktivität im Kohlenstoffatom 15[26a] enthielt. Eine Züchtung mit (3-^{14}C)-Mevalonsäure[26b] führte zur Isolierung von Digitoxigenin, in welchem ca. 25 % der Totalaktivität im Kohlenstoffatom 20 lokalisiert waren. Diese Resultate stehen in Uebereinstimmung mit den Erwartungen, in der Annahme, dass Digitoxigenin durch Kondensation einer Acetateinheit mit einem Pregnan-Derivat gebildet wird.

Die Analogie der Biogenese von Zoosterinen und Phytosterinen wird noch durch zwei weitere Tatsachen untermauert: Einmal ist das Vorkommen von Cholesterin nicht auf tierische Organismen beschränkt. 1958 ist Cholesterin auch aus Algen[37] isoliert worden. Neuerdings ist es sogar gelungen, Cholesterin neben typischen

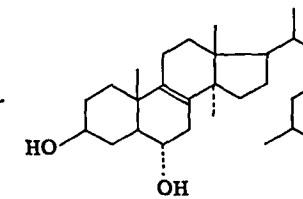
Phytosterinen in höheren Pflanzen nachzuweisen, so z.B. in Dioscorea spiculiflora[38] und Solanum tuberosum[39][31].



(23)



(24)



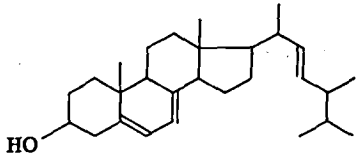
(25)

Im weiteren sind viele mögliche Vorstufen von Phytosterinen aus Pflanzen isoliert worden. Dies bezieht sich sowohl auf Lanosterin[40], als auch auf verschiedene 4α-Methylsterine, wie Lophenol (22)[25], Citrostadienol (24)[41] und α_1-Sitosterin[42] (ein geometrisches Isomeres von Citrostadienol (24)).

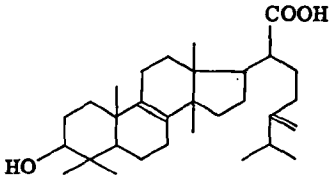
Die Isolierung von Macdougallin (25)[43] aus dem Kaktus Peniocerus macdougalli zeigt, dass die Reihenfolge der Abspaltung der drei Methylgruppen beim Uebergang von Lanosterin zu Cholesterin in anderen Organismen nicht unbedingt die gleiche zu sein braucht, wie die von Gautschi und Bloch[19] aus den Ergebnissen der Untersuchungen an Hefepräparaten aufgestellte Sequenz. Zur Zeit fehlt allerdings noch jede Angabe über die Signifikanz dieser Verbindung.

Bei Mycosterinen liegen ebenfalls nur spärliche experimentelle Angaben zur Aufklärung der Biogenese vor. Einbau von (1-^{14}C)-Natriumacetat in Neurospora crassa[44] erlaubte die Isolierung von Ergosterin (26), das zwölf markierte Atome pro Molekül enthielt. Aktivität wurde nachgewiesen in den Atomen C-4, -11, -12, -23 und -25; frei von Radioaktivität waren die Atome C-3, -24, -26, -27 und -28.

Eburicolsäure (27)[45] aus Polyporus sulfureus zeigte Aktivität in den Kohlenstoffatomen 4, 11 und 12 beim Einbau von (1-^{14}C)-Natriumacetat, sowie in den Atomen 30, 31 und 21 beim Einbau von (2-^{14}C)-Natriumacetat. Die für die einzelnen Atome nachgewiesene Aktivität ist kongruent mit der Annahme, dass 18 Atome von Eburicolsäure aus der Methylgruppe und 12 Atome aus der Carboxylgruppe von Essigsäure stammen.



(26)



(27)

Weiter wurde der Einbau von Acetat wie auch von Mevalonat in Δ^{22}-Stigmasten-3β-ol im Schimmelpilz Dictodelium discoideum[46] beobachtet.

Alle die angeführten Ergebnisse sind mit der biogenetischen Isoprenregel[18] nicht im Widerspruch. Ungelöst bleibt nach wie vor die Herkunft der für Phyto- und Mycosterine typischen C-1- und C-2-Seitenketten in Stellung 24 des Steringerüstes, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

Biogenese der zusätzlichen C-1-Seitenkette von Mycosterinen

Nachdem die Beobachtung gemacht worden war, dass weder die Methyl- noch die Carboxylgruppe von Natriumacetat als Vorläufer der zusätzlichen C-1-Einheit in Ergosterin (26)[44] oder Eburicolsäure (27)[45] in Frage kommen, untersuchten Danielsson und Bloch[47] mit Hilfe von Hefepräparaten den Einbau von ^{14}C-Formiat in Ergosterin, wobei ihnen die Isolierung einer radioaktiven Ergosterinprobe gelang (Einbaurate 2%), die 74% der Totalaktivität in der Methylgruppe C-28 enthielt. Dauben, Fonken und Boswell[48] gewannen aus Polyporus sulfureus durch Einbau von ^{14}C-Formiat aktive Eburicolsäure. Die Einbaurate betrug 1,7%, 60% der Totalaktivität wurden in der Methylengruppe C-28 nachgewiesen.

Zur Untersuchung der Art des Vorläufers der zusätzlichen Methylgruppe von Ergosterin führten Alexander, Gold und Schwenk[49] weitere Züchtungsversuche mit aktivem Natriumcarbonat, Formaldehyd, (1-^{14}C)- und (2-^{14}C)-Propionsäure und (Methyl-^{14}C)-Methionin durch. In allen Fällen wurde radioaktiv markiertes Ergosterin gewonnen. Die Einbaurate von Methionin war mit 20,2% am höchsten. Durch Abbau der in Gegenwart von Methionin biosynthetisierten Probe wurde 11% der Totalaktivität in C-28 nachgewiesen. Diesen relativ tiefen Wert führen die Autoren

sowohl auf eine Verschmierung der Radioaktivität als auch auf Messungenauigkeiten zurück. Die Resultate lassen zwar vermuten, dass die zusätzliche Methylgruppe von Ergosterin aus ein r C-1-Einheit aufgebaut wird, erlauben jedoch keinen definitiven Schluss über die Identität dieses Vorläufers. Zur Entscheidung dieser Frage führten Alexander und Schwenk[50] weitere Einbauversuche durch. Züchtungsversuche zeigten, dass der Einbau von ^{14}C-Formiat durch Zugabe von Methionin verkleinert wird. Umgekehrt wurde jedoch keine Verminderung des Einbaus von Methionin bei Zugabe von inaktivem Formiat beobachtet. Durch Beifügen von Folsäure und Homocystein konnte die Einbaurate von Formiat vergrössert werden. Mit dem Folsäureantagonisten Aminopterin dagegen wurde der Einbau unterdrückt. Infolge der Stellung, die diese Verbindungen bei der Biogenese von Methionin einnehmen (vgl. S. 22), kann mit grosser Wahrscheinlichkeit vermutet werden, dass der Einbau über die intermediäre Bildung von Methionin erfolgt.

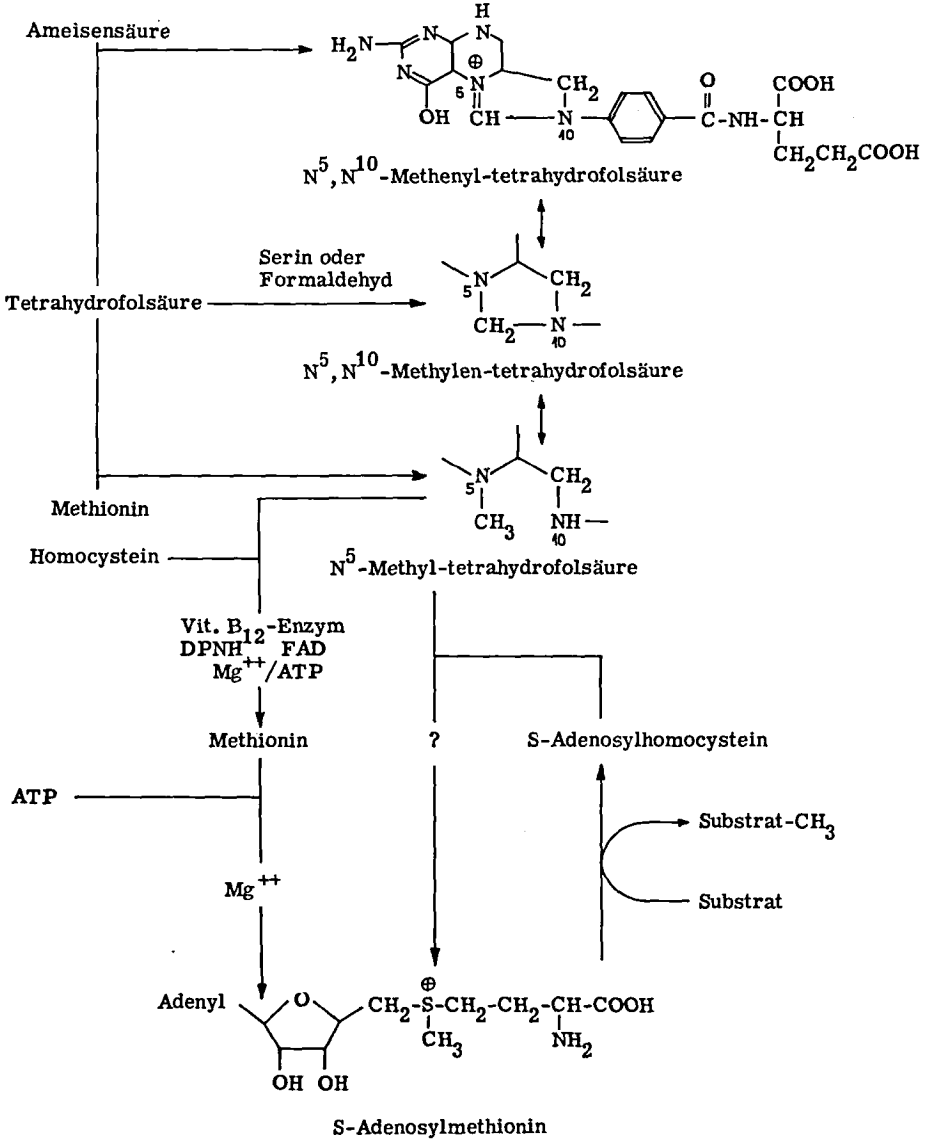
Tatsächlich stellten Alexander et al.[50] fest, dass bei Einbau von doppelt markiertem (Methyl-^{14}C,T)-Methionin Ergosterin gebildet wurde, in welchem das ursprüngliche Verhältnis $^{14}C/T$ zu 86 - 91 % erhalten blieb. Sieht man von der Möglichkeit ab, dass starke Isotopeneffekte dieses Resultat beeinflussen, kann ausgesagt werden, dass der grösste Teil der eingebauten C-1-Einheiten in Form von Methylgruppen ohne vorhergehende Oxydation auf das Steroidgerüst übertragen werden. Untersuchungen von Parks[51] zeigten ausserdem, dass S-Adenosylmethionin in höherer Einbaurate als Methionin in Ergosterin eingebaut wird.

Im Hinblick auf die Bedeutung der biologischen Reaktionen von Methionin in den folgenden Ausführungen, scheint es angebracht, eine Zusammenfassung über den Stoffwechsel von Methionin aufzuzeichnen, sowie seine Rolle als Alkylierungsmittel kurz zu behandeln.

Biologische Methylierungen

Methylierungen sind wesentliche Bestandteile vieler biogenetischer Reaktionsfolgen. Als Donatoren für die zur Methylierung benötigte C-1-Einheit kommen Formiat, Formaldehyd, Serin und Methionin in Frage. Die aus diesen Vorläufern gewonnenen C-1-Einheiten stehen untereinander in engem Zusammenhang (siehe Schema V, vergleiche auch zusammenfassende Darstellungen bei Osborn et al.[52] und Greenberg[53]).

Schema V


Ameisensäure
N^5, N^{10}-Methenyl-tetrahydrofolsäure
Serin oder Formaldehyd
Tetrahydrofolsäure
N^5, N^{10}-Methylen-tetrahydrofolsäure
Methionin
Homocystein
N^5-Methyl-tetrahydrofolsäure
Vit. B_{12}-Enzym
DPNH FAD
Mg^{++}/ATP
Methionin
?
S-Adenosylhomocystein
ATP
Substrat-CH_3
Substrat
Mg^{++}
Adenyl
S-Adenosylmethionin

Formiat kann unter Beteiligung von ATP mit Tetrahydrofolsäure (THFA) in N^5-N^{10}-Methenyl-THFA, das "aktive" Formiat übergehen. Durch Reduktion entsteht daraus N^5-N^{10}-Methylen-THFA, sogenannt "aktiver" Formaldehyd, der auch direkt aus dem β -Kohlenstoffatom von Serin bzw. aus Formaldehyd und THFA gebildet werden kann. Reduktion des "aktiven" Formaldehyds mit TPNH führt zur Ausbildung von N^5-Methyl-tetrahydrofolsäure (siehe Schema V).

N^5-Methyl-tetrahydrofolsäure ist befähigt, ihre Methylgruppe unter Bildung von Methionin auf Homocystein *) zu übertragen. Der Mechanismus dieser mehrere Zwischenstufen umfassenden Reaktion ist heute noch nicht vollständig geklärt. Für den Ablauf scheint eine "Aktivierung" der Methylgruppe durch ATP und Magnesiumionen, sowie die Teilnahme von FAD, DPNH und einem Vitamin B_{12}-haltigen Enzym als Cofaktoren notwendig zu sein. In einigen Fällen ist die enzymatische Alkylierung schrittweise untersucht worden, so z.B. für Stickstoffmethylierungen bei Nicotinamid [54], Guanidinoessigsäure [55] und Purinen [56]; für Sauerstoffmethylierungen an Catecholderivaten [57] und für Schwefelalkylierungen an Homocystein [58]. Dabei zeigte es sich, dass die Alkylierungen mit Hilfe des Coenzyms S-Adenosylmethionin [59] erfolgen. Die Art und Weise des Uebergangs von Methionin zu S-Adenosylmethionin ist heute noch unklar; fest steht nur, dass ausser ATP auch Magnesiumionen benötigt werden. Die Entdeckung, dass die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin ihrerseits unter Ausbildung von Methionin auf Homocystein übertragen werden kann, lässt jedoch Zweifel darüber aufkommen, ob Methionin überhaupt eine obligate Vorstufe von S-Adenosylmethionin darstellt. Es besteht z.B. die Möglichkeit, dass Methionin auf einem Nebenweg bei der Bildung von S-Adenosylmethionin liegt (vgl. Schema V).

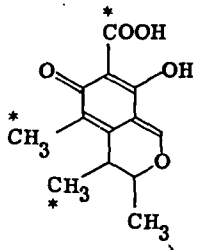
Der Beweis einer direkten C-Alkylierung mit Hilfe des Coenzyms S-Adenosylmethionin ist bis heute noch nicht erbracht worden. Der Ablauf der Reaktion in dieser Art und Weise scheint aber wahrscheinlich in Analogie zu den Alkylierungen an Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel, sowie der von Alexander et al. [50] und Parks [51] durchgeführten Versuche. Die folgende Diskussion macht von dieser Annahme Gebrauch.

Allem Anschein nach besteht der Mechanismus der Alkylierung in einem nucleophilen Angriff von Seite des zu methylierenden Substrats auf die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin. Dementsprechend werden auch bei C-Alkylierungen in Analogie

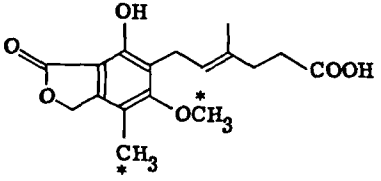
---

*) Homocystein entsteht aus Homoserin und Cystein über die Zwischenstufe von Cystathionin.

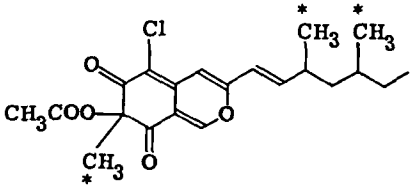
zu den O-, S- und N-Alkylierungen bevorzugt potentiell basische Zentren methyliert. So sind Methylierungen beobachtet worden in ortho- und para-Stellung zu phenolischen Hydroxylgruppen bei Citrinin (28)[60) 61)], Mycophenolsäure (29)[62)], Sclerotiorin (30)[61)], Actinomycin (31)[63)] und Novobiocin (32)[63)]. Es wird vermutet, dass die in der Seitenkette von Sclerotiorin (30) durch Einbau von (Methyl-^{14}C)-Methionin markierten Methylgruppen auf der Stufe der als Vorläufer postulierten Poly-β-ketomethylenkette durch Methylierung der potentiell anionoiden Methylengruppierungen ein-



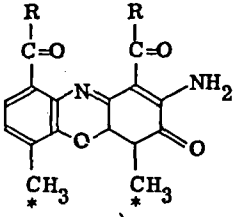
(28)+)



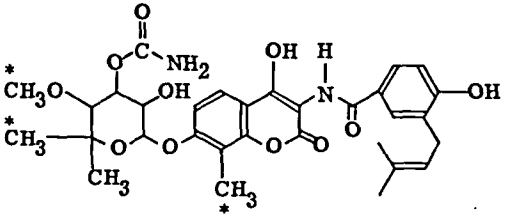
(29)+)



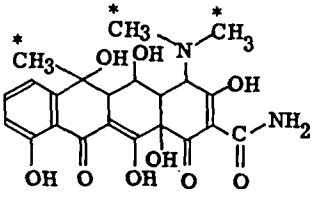
(30)+)



(31)+)



(32)+)



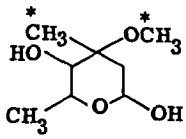
(33)+)

+) In den Verbindungen 28 - 37 sind die durch Einbauversuche mit ^{14}C-1-Einheiten markierten Stellen mit * bezeichnet.

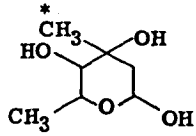
geführt werden. Die gleiche Reaktionsweise könnte auch für den beobachteten Einbau von (Methyl-^{14}C)-Methionin in Terramycin (33)[64] zutreffen. In Uebereinstimmung mit dieser Hypothese ist die Tatsache, dass die zusätzlich eingeführten Methylgruppen in allen Fällen mit solchen Kohlenstoffatomen verknüpft sind, die sich von der Methylgruppe von Essigsäure ableiten. Eine Vorstufe von Novobiocin (32) wird im weiteren in der Zuckereinheit Noviose durch die Methylgruppe von Methionin alkyliert. Die gleiche Erscheinung findet man auch bei der Cladinose (34) und Mycarose (35), den Zuckeranteilen der Macrolidantibiotika Erythromycin[65) 66)] und Magnamycin[65)]. Obwohl über den Mechanismus dieser Alkylierungen bis heute nur Vermutungen bestehen, ist es auffallend, dass in allen diesen alkylierten, verzweigten Zuckern die zusätzliche Methylgruppe in α-Stellung zu einem sauerstoffreien Kohlenstoffatom liegt.

Ein Einbau der Methylgruppe von Methionin wurde auch beobachtet in den sechs "Extra"-methylgruppen[67)] des Corrinsystems von Vitamin B_{12}.

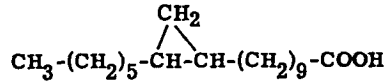
Wesentlich verschieden von diesen bis anhin beschriebenen Alkylierungen sind die Methylierungen an Vorläufern von 10-Methylstearinsäure[68)], sowie von Ergosterin[47) 49-51)]. In allen bis anhin erwähnten Fällen kann man den Mechanismus zur Einführung der Methylgruppe durch S-Adenosylmethionin hypothetisch in dieser Weise formulieren: Ausgehend von einem Anion, das durch seine α-Lage zu einer Carbonyl- oder Iminfunktion stabilisiert ist, bildet sich nach Art einer S_N2-Reaktion mit der Methylgruppe von S-Adenosylmethionin eine neutrale Verbindung. - Wird die Reaktion eingeleitet durch die entsprechende konjugierte Säure, so entsteht ein Kation, das bevorzugt durch Abspaltung eines Protons vom Heteroatom abgesättigt wird. Bei der Einführung einer Methylgruppe an einer isolierten Doppelbindung, wie dies für die Ausbildung von 10-Methylstearinsäure sowie von Ergosterin formuliert werden könnte, ist es jedoch zweifelhaft, ob die Basizität der Doppelbindung für den nucleophilen Angriff auf die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin ausreicht. Falls tatsächlich ein Carboniumion (36) entsteht, kann nicht vorausgesagt werden, auf welche Art die Stabilisierung erfolgt. Dieses Kation könnte z.B. reduktiv abgesättigt oder durch Verlust eines Protons stabilisiert werden. Die Abspaltung eines Protons kann auch erst nach einer intramolekularen Hydridverschiebung oder unter Ausbildung eines Cyclopropanrings stattfinden. In der Tat ist gezeigt worden, dass Lactobazillinsäure (37)[69)] aus der entsprechenden ungesättigten Norsäure, der Vaccensäure durch Anlagerung der Methylgruppe von Methionin gebildet wird. Ob diese Tatsache



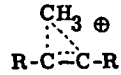
(34)



(35)



(37)



(36)

wirklich ein Hinweis auf die Gültigkeit des vorgeschlagenen Mechanismus darstellt, kann auf Grund der heute vorliegenden experimentellen Daten nicht entschieden werden.

Biogenese der zusätzlichen C-2-Seitenkette von Phytosterinen

Für die Bildung der Aethyl- oder Aethylidenseitenkette von Phytosterinen lagen bis anhin keine experimentellen Tatsachen vor. Es wurden zwei verschiedene Hypothesen vorgeschlagen:

Als für die Biogenese von Sterinen erst Acetat als Vorläufer bekannt war, postulierte Robinson[70] eine C-4-Einheit, z.B. Acetessigsäure, anstelle einer C-2-Einheit als Vorläufer der C-2-Seitenkette. Durch die Entdeckung der Mevalonsäure als Zwischenstufe bei der Biogenese von Sterinen wurde diese Hypothese jedoch hinfällig.

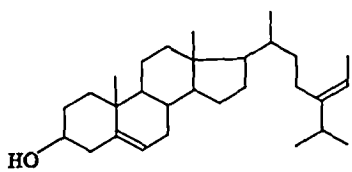
Arigoni[71] zog Methionin als Vorläufer der C-2-Seitenkette in Betracht. Uebertragung der Gruppierung $-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ auf das Steringerüst, Umwandlung in die entsprechende α -Ketosäure und zweimalige Decarboxylierung könnten zur Ausbildung einer C-2-Einheit führen. Dass die Uebertragung dieser Gruppierung zumindest an Stickstoff prinzipiell möglich ist, wurde bei der Biogenese von Spermidin[72] aus Putrescin und Methionin gezeigt.

In der Folge wird der experimentelle Nachweis erbracht, dass sich im Falle des α -Spinasterins beide Kohlenstoffatome der zusätzlichen C-2-Seitenkette aus der Methylgruppe von Methionin ableiten.

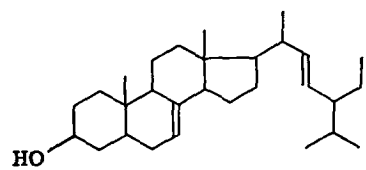
C. Eigene Arbeiten zur Biogenese von α-Spinasterin

Zur biogenetischen Untersuchung der Seitenkette von Phytosterinen ist es wichtig, für die Einbauversuche von radioaktiven Vorläufern ein Sterin zu wählen, dessen Struktur einen möglichst selektiven Abbau der C-2-Seitenkette erlaubt. Am besten geeignet wären deshalb $\Delta^{24,28}$-Steroide, wie z.B. Citrostadienol ((24), S. 18) und Fucosterin (38). Citrostadienol kommt jedoch nur in sehr geringen Mengen in Orangen- und Grapefruitsschalen vor, während Fucosterin in Algen gefunden wird, die sich nicht für Züchtungsversuche eignen. Gute Möglichkeiten eines detaillierten Abbaus finden sich aber auch bei Sterinen, die eine Doppelbindung in einer anderen Stellung der Sterinseitenkette besitzen.

Im Zusammenhang mit biogenetischen Untersuchungen von pentacyclischen Triterpenen wurde von Guglielmetti[1] in unserem Laboratorium Menyanthes trifoliata, der Wasser- oder Bitterklee auf seine Inhaltsstoffe untersucht. Dabei konnte neben den drei Triterpenen Betulinsäure, Betulin und Lupeol ein schon von verschiedenen Autoren[73] [74] erwähntes, aber nicht näher untersuchtes Sterin isoliert und als α-Spinasterin (39)*), ein Δ^{22}-Sterin, identifiziert werden. Ausserdem erwies sich Menyanthes trifoliata in diesen Versuchen als besonders geeignet für den Einbau von radioaktiven Vorläufern.



(38)



(39)

In eigenen Versuchen zur Aufklärung der Biogenese von Loganin (siehe S. 52) wurden Rhizome von Menyanthes trifoliata aus dem Katzensee (Kt. Zürich) während zwei Wochen in einer Lösung von 0,15 mC L-(Methyl-^{14}C)-Methionin gezüchtet. In

*) Die Struktur von α-Spinasterin ist durch Arbeiten von Fieser et al.[75] sowie von Barton und Cox[76] endgültig festgelegt worden. Die Identifikation des Hydrierungsprodukts von α-Spinasterin als Stigmastanol[77], dessen absolute Konfiguration erst kürzlich von Kishida et al.[78] bestimmt wurde, erlaubt es, α-Spinasterin die absolute Konfiguration 20-R-Methyl, 24-S-Aethyl zuzuordnen.

grossen Zügen folgten sowohl Züchtung als auch Isolierung der einzelnen Substanzen den von Guglielmetti[1] ausgearbeiteten Methoden. Das getrocknete Pflanzenmaterial extrahierte man mit Petroläther und Aether. Die Verseifung des Petrolätherextrakts lieferte einen unverseifbaren Neutralteil, aus dem durch Chromatographie an Aluminiumoxyd ein rohes, radioaktives Steringemisch in einer Ausbeute von 0,07 % (bezogen auf Trockenmaterial) isoliert wurde. Eine der Hauptkomponenten wurde dünnschichtchromatographisch durch Vergleich mit authentischem Material als α-Spinasterin identifiziert. Massenspektrometrisch konnte das Vorliegen von grösseren Mengen einer Dihydroverbindung im Gemisch nachgewiesen werden.

Der Aetherextrakt wurde mit Diazomethan verestert. Aus dem Rohprodukt isolierte man durch Chromatographie an Aluminiumoxyd und Kristallisation reinen Betulinsäuremethylester ((40), vgl. S. 29) in einer Ausbeute von 0,1 %.

Die radiochemischen Untersuchungen des auf diese Weise gewonnenen α-Spinasterins (Einbaurate*) = 0,008 %) und des Betulinsäuremethylesters (Einbaurate*) = 0,006 %) führten zu einem überraschenden Ergebnis. In den Einbauversuchen von Guglielmetti[1] mit markiertem Acetat und Mevalonat besassen immer alle drei isolierten Triterpene Lupeol, Betulin und Betulinsäuremethylester eine gegenüber den Sterinfraktionen höhere Aktivität. Die Züchtung der gleichen Pflanze nach der analogen Methode mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin führte dagegen zu einem im Vergleich zu den Triterpenen viel stärker markierten Sterin. Während sich beim Einbau von (1-^{14}C)-Natriumacetat die Radioaktivitäten von Betulinsäuremethylester und α-Spinasterin wie 37:1 verhielten, verschob sich beim Züchtungsversuch mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin das Verhältnis nach 1:18. Nach den im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Versuchen, sowie den von Guglielmetti durchgeführten Experimenten, werden Phytosterine wie auch pentacyclische Triterpene entsprechend der biogenetischen Isoprenregel[18] aufgebaut und leiten sich somit höchstwahrscheinlich beide von Squalen ab. Im Unterschied zu den Triterpenen besitzt α-Spinasterin jedoch eine zusätzliche C-2-Einheit, die nachträglich in das Steringerüst eingebaut wird. Der biogenetische Ursprung dieser Aethylseitenkette war unbekannt. Es war deshalb naheliegend anzunehmen, dass das beobachtete auffallend veränderte Radioaktivitätsverhältnis im Experiment mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin auf einen bevor-

---

*) Die angegebene Einbaurate bezeichnet den Anteil der in die betreffende Verbindung eingebauten Radioaktivitätsmenge, bezogen auf die für die Züchtung eingesetzte Aktivitätsmenge des Vorläufers.

zugten Einbau der Radioaktivität in diese zusätzliche C-2-Seitenkette zurückzuführen ist.

Allerdings blieb die merkwürdige Tatsache bestehen, dass Betulinsäuremethylester ebenfalls eine gewisse, wenn auch geringe Radioaktivität aufwies, obwohl die früher durchgeführten Experimente[1] in Uebereinstimmung sind mit der Annahme, dass sich alle Kohlenstoffatome von Betulinsäure aus Acetateinheiten ableiten, entsprechend der biogenetischen Isoprenregel. Die beobachtete Aktivität kann nicht auf eine radioaktive Verunreinigung zurückgeführt werden. Sowohl Betulinsäuremethylester, als auch das zur weiteren Reinigung dargestellte entsprechende Acetat ((41), S. 29) wurden durch Kristallisation und Chromatographie bis zur konstanten Radioaktivität gereinigt. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Für den beobachteten Einbau lassen sich zwei Erklärungen vorschlagen:

a) Im vorliegenden Versuch wurde Betulinsäure nach Veresterung mit Diazomethan in Form seines Methylesters aus dem Pflanzenmaterial isoliert. Die Möglichkeit, dass ein Teil der Säure bereits in der Pflanze in Form ihres Methylesters vorliegt, ist nicht auszuschliessen. L-(Methyl-^{14}C)-Methionin könnte in diesem Fall als Vorläufer der Methylgruppe der Estergruppierung dienen, wie dies z.B. bei der Chrysanthemumsäure[79] beobachtet wurde.

b) Der Einbau der Methylgruppe von Methionin könnte auch auf einem indirekten Weg stattfinden. Durch Oxydation der Methylgruppe von Methionin können sowohl radioaktiver Formaldehyd als auch markiertes Formiat und Kohlendioxyd entstehen. Jede dieser drei Verbindungen kann wiederum in den Stoffwechsel einbezogen werden und zur Bildung von aktivem Acetat Anlass geben. Dies würde eine Verschmierung der Radioaktivität über das ganze Gerüst von Betulinsäuremethylester bewirken. In der Tat ist beim Einbau von Methionin in Ergosterin beobachtet worden[49], dass die Kohlenstoffatome 23, 25, 26 und 27, deren Herkunft aus Acetateinheiten gesichert ist, bis zu 1,7 % der Totalaktivität enthalten.

Das anschliessend beschriebene Experiment erlaubt eine Wahl zwischen diesen zwei Möglichkeiten zu treffen. Das Acetat (41) des aus den Einbauversuchen mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin gewonnenen radioaktiven Betulinsäuremethylesters wurde mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert. Das dabei entstandene Betulin (42) (siehe Schema VI) reinigte man durch Chromatographie und Kristallisation bis zur konstanten Radioaktivität. Aus den in Tabelle 2 zusammengestellten Resultaten kann man schliessen, dass der Einbau von L-(Methyl-^{14}C)-Methionin in Betulinsäuremethylester

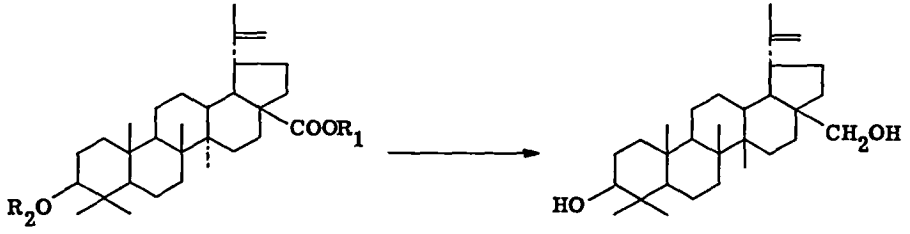
auf einem nicht näher untersuchten, aber sicher unspezifischen Weg stattgefunden hat.

Tabelle 2

Produkt	spez. Aktivität imp/sec. mMol CO_2 *)	%
Betulinsäuremethylester (40)	24,6	100
Acetat von Betulinsäuremethylester (41)	23,85	103
Betulin (42)	25,75	101

*) imp/sec. mMol CO_2 = Impulse pro Sekunde und Millimol CO_2
Messgenauigkeit : ± 3 - 5 %

Schema VI



(40) R_1 = $-CH_3$ R_2 = -H (42)
(41) R_1 = $-CH_3$ R_2 = $-COCH_3$

Wie schon auf Seite 27 erwähnt, erfolgt der Einbau von Acetat in Menyanthes trifoliata bevorzugt in die Triterpene. Das beobachtete verschobene Radioaktivitätsverhältnis beim Einbau von L-(Methyl-^{14}C)-Methionin ist deshalb höchstwahrscheinlich auf einen spezifischen Einbau der Methylgruppe von Methionin in die zusätzliche Aethylseitenkette von α-Spinasterin zurückzuführen.

Zur experimentellen Untermauerung dieser Hypothese wurde ein Abbau der Seitenkette des aus dem Züchtungsversuch in Gegenwart von L-(Methyl-^{14}C)-Me-

thionin isolierten α -Spinasterin durchgeführt. Vorangehend war aber die Darstellung einer Probe von radiochemisch reinem α -Spinasterin notwendig. Einfache Reinigungsmethoden wie Chromatographie und Kristallisation erlaubten nicht, ein Präparat konstanter Radioaktivität zu gewinnen. Dies ist an und für sich nicht verwunderlich, stösst doch bereits die chemische Reinigung von Sitosteringemischen auf grosse Schwierigkeiten. Die Gewinnung einer radiochemisch reinen Probe ist aber noch schwieriger, genügen doch schon kleine, chemisch nicht nachweisbare Spuren von Verunreinigungen um die Radioaktivitätsmessungen entscheidend zu beeinflussen. Barton und Cox[76] zeigten, dass Steringemische vorteilhafter auf der 3-Ketostufe gereinigt werden können. Eine chemisch reine Probe von α -Spinasterin wurde deshalb mit Chrom(VI)-oxyd-Schwefelsäure in Aceton behandelt und das entstehende α-Spinasteron (siehe (43), S. 33) durch Chromatographie an Aluminiumoxyd bis zur konstanten Radioaktivität gereinigt.

Zur Kontrolle der chemischen Reinheit der Präparate wurde α -Spinasterin massenspektrometrisch untersucht, wobei eine auffallende Erscheinung beobachtet wurde. Von verschiedenen Autoren[80) 81)] ist bei Steroiden mit langer Seitenkette in Stellung 17 das Auftreten von Bruchstücken beobachtet worden, deren Entstehung auf eine Spaltung der 17-20 Bindung zurückgeführt wird. Wiederholt wurde behauptet, dass diese Spaltung typisch und von den Eigenschaften der Seitenkette unabhängig ist. Im Falle des α -Spinasterins wäre auf Grund dieser Regel bei massenspektrometrischen Untersuchungen ein Bruchstück mit m/e = 273 zu erwarten. Wohl liess sich in den aufgenommenen Spektren das Auftreten eines solchen Bruchstückes feststellen, die Intensität dieses Piks war jedoch von untergeordneter Bedeutung im Vergleich zu derjenigen eines Bruchstückes mit m/e = 271 (vgl. Figur 1, S. 57). Das Auftreten von korrespondierenden Bruchstücken wurde auch bei massenspektrometrischen Untersuchungen von α -Spinasteron (vgl. Figur 1, S. 57) festgestellt. Setzt man die Allgemeingültigkeit der oben erwähnten Regel voraus, so täuscht dieses Bruchstück das Vorliegen einer gesättigten Seitenkette in α -Spinasterin vor. Eine solche Schlussfolgerung widerspricht jedoch den folgenden Befunden:

a) Das Auftreten des Moleküllions mit m/e = 412 im Massenspektrogramm bestätigt das Vorliegen eines doppelt ungesättigten Sterins.

b) Im NMR.-Spektrum der untersuchten Proben war ein Multiplett bei δ = 5,0 - 5,2 (3 Vinylprotonen) sichtbar, was die Anwesenheit von mindestens zwei Doppelbindungen erfordert, falls man das Vorliegen einer endständigen, einfach substituier-

ten Doppelbindung ausschliesst.

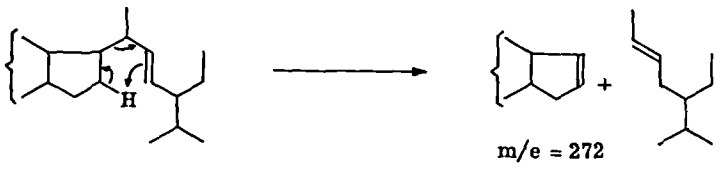
c) IR.-Absorptionsbanden bei 840 und 1660 cm^{-1} lassen auf die Anwesenheit einer disubstituierten trans-Doppelbindung schliessen.

d) Das Vorliegen einer Doppelbindung in Stellung 22-23 wurde durch den weiter unten beschriebenen Abbau (vgl. S. 32) chemisch bewiesen. Es muss deshalb vermutet werden, dass das unerwartete Auftreten eines um zwei Masseneinheiten kleineren Piks mit der speziellen Lage der Doppelbindung in α-Spinasterin zusammenhängt. Eine Möglichkeit zur Ueberprüfung dieser Hypothese bot die massenspektrometrische Untersuchung von Ergosterin, welches bezüglich der Seitenkette ein niedrigeres Homologes von α-Spinasterin darstellt. Im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Angaben [80) 81)] wurde in eigenen Messungen wiederum das bevorzugte Auftreten eines Piks (m/e = 269) beobachtet, welcher um zwei Masseneinheiten kleiner ist, als man entsprechend einer "normalen" Spaltung erwarten würde [*)].

---

*) Diese Tatsache lässt sich durch eine Umlagerung in der Art des in Schema VII angedeuteten Mechanismus erklären. Aus α-Spinasterin könnte auf diese Art ein Bruchstück mit m/e = 272 entstehen. Um daraus das beobachtete Bruchstück mit m/e = 271 zu erhalten, muss die zusätzliche Abspaltung eines Protons postuliert werden.

Schema VII



Abbau der Seitenkette von α -Spinasterin

Der Abbau eines Sterins mit ungesättigter Seitenkette vom Typus des α -Spinasterins ist schon von verschiedenen Autoren[82-84] beschrieben worden. Meistens gelangten ozonolytische Methoden bei grösseren Substanzmengen zur Anwendung, wobei nur in wenigen Fällen auch das kleinere Spaltstück gefasst wurde. Im Gegensatz dazu stand in unserem Falle nur eine geringe Menge radioaktives Material zur Verfügung. Es wurden deshalb verschiedene Abbaumethoden an inaktivem Material in Bezug auf ihre Ausbeuten untersucht.

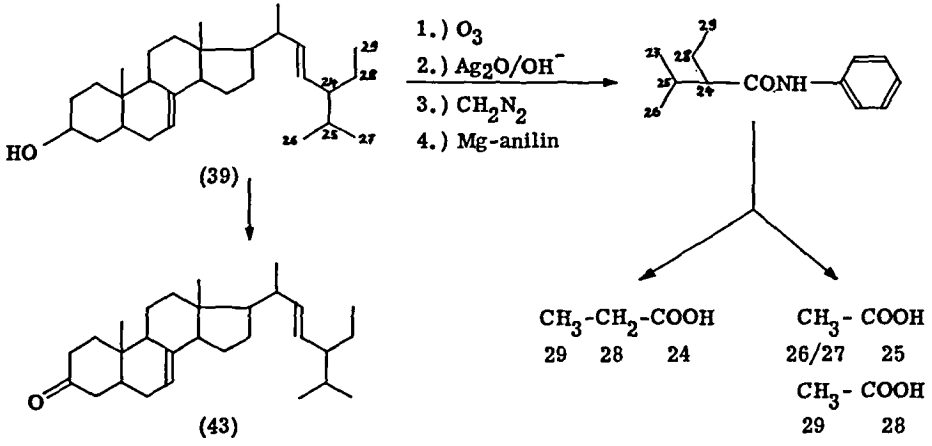
Versuche, die Seitenkette von α -Spinasterin durch Natriummetaperjodat und Kaliumpermanganat in alkalischem Milieu nach der Methode von Lemieux-Rudloff[85] abzubauen, zeitigten keinen Erfolg. Ebenso erfolglos erwies sich die Umsetzung von α -Spinasterin mit Osmiumtetroxyd, die zu komplexen Gemischen führte, wobei teilweise die Alkoholgruppierung in Ring A durch überschüssiges Reagens angegriffen wurde.

Die besten Resultate zur Gewinnung des gewünschten Spaltstückes lieferten Ozonisationsversuche in Methylenchlorid bei -80°. Reduktive Spaltung des Ozonids ergab Aethylisopropylacetaldehyd, der in das 2,4-Dinitrophenylhydrazon überführt wurde. Die analytischen Daten dieses Hydrazons sind identisch mit den für das 2,4-Dinitrophenylhydrazon von Aethylisopropylacetaldehyd in der Literatur[86] beschriebenen Werten. Im Hinblick auf den weiteren Abbau erwies sich aber die oxydative Aufarbeitung des Ozonids mit Silberoxyd in alkalischem Milieu[87] als günstiger. Wasserdampfdestillation des angesäuerten Reaktionsgemisches ergab 0,90 - 0,95 Aequivalente flüchtige, saure Anteile. Das durch Behandlung mit Diazomethan daraus entstehende Estergemisch wurde mit Magnesiumanilin[88] umgesetzt. Durch Chromatographie an Silicagel und Kristallisation liess sich aus dem Reaktionsprodukt ein Anilid der Zusammensetzung $C_{13}H_{19}ON$, ($[\alpha]_D = +21°$), in einer durchschnittlichen Ausbeute von 30 % gewinnen. Das Molekulargewicht (M = 205) wurde massenspektrometrisch bestätigt. Das in Chloroform aufgenommene IR. -Spektrum des auf diese Weise gewonnenen Anilids erwies sich als in jeder Hinsicht identisch mit demjenigen einer racemischen Probe von synthetisch dargestelltem Aethylisopropylacetanilid[89]. Bei der Aufnahme der zwei Proben in der festen Phase (Nujol) wurden kleine Unterschiede im Fingerprintgebiet beobachtet. Diese Tatsachen zeigen, dass es sich bei dem aus dem Abbauprodukt von α -Spinasterin gewonnenen Anilid um die optisch aktive

Form von Aethylisopropylacetanilid handelt.

Zur Vermeidung von Substanzverlusten wurde bei der Uebertragung dieser zuletzt besprochenen Abbausequenz (vgl. Schema VIII) auf radioaktives Material von einer weitgehenden Reinigung abgesehen. Die genauen Radioaktivitätswerte des Sterins waren ja früher mit Hilfe eines Derivats (vgl. S. 30, α-Spinasteron (43)) ermittelt worden. Im übrigen darf vermutet werden, dass nur Verbindungen vom Typus des α-Spinasterins zur Ausbildung von Aethylisopropylessigsäure Anlass geben. Das beim Abbau der aktiven Probe in der erwarteten Ausbeute anfallende chemisch reine Anilid wurde zur Entfernung von anhaftenden radioaktiven Verunreinigungen mehrfach kristallisiert und bis zur konstanten Radioaktivität gereinigt. Die verbleibende kleine Menge (18 mg) des auf diese Weise erhaltenen Aethylisopropylacetanilids reichte nicht mehr aus für einen stufenweisen Abbau. In der Annahme, dass die gesamte Radioaktivität des Anilids in den zwei Kohlenstoff-

Schema VIII



atomen der Aethylseitenkette lokalisiert ist, wurde nach einer Verdünnung mit racemischem Material der selektive Abbau der entsprechenden zwei Kohlenstoffatome mit Hilfe einer modifizierten Kuhn-Roth-Oxydation unternommen. Zur Vermeidung eines nachträglichen oxydativen Abbaus der aus der Aethylseitenkette zu erwartenden

Propionsäure war es nämlich notwendig, die übliche Methode des Kuhn-Roth-Abbaus[90] abzuändern. Versuche, die von Schmid et al.[91] zur Fassung von Propionsäure beschriebene Methode anzuwenden, scheiterten an der grossen Leichtflüchtigkeit des Anilids. Die besten Resultate erzielte man bei Verwendung des üblichen Kuhn-Roth-Reagens[90] und einer Rückflussdauer von 30 Min. Die nachträgliche Wasserdampfdestillation des Reaktionsprodukts lieferte ein Gemisch flüchtiger Säuren. Dieses wurde durch Zweiphasenchromatographie an einer Celitekolonne nach Bueding und Yale[92] getrennt, wobei die Fraktionen papierchromatographisch[93] [94] auf ihre Reinheit untersucht wurden. Während schon ein Trennungsgang die Isolierung reiner Essigsäure ermöglichte, führte erst eine dreifache Wiederholung des Prozesses zur Gewinnung papierchromatographisch reiner Propionsäure. Die Ausbeute an Propionsäure in der Kuhn-Roth-Oxydation betrug 40 %, diejenige an Essigsäure 92 %.

In der Folge wurden die beiden Säuren gesondert einem modifizierten Schmidt-Abbau[95] unterworfen (siehe Anhang S. 55). Der Abbau der Essigsäure lieferte einerseits Kohlendioxyd, das als Bariumcarbonat aufgefangen wurde, und andererseits Methylamin. Letzteres oxydierte man mit alkalischer Kaliumpermanganatlösung und isolierte das dabei entstehende Kohlendioxyd wiederum als Bariumcarbonat.

Der analoge Abbau der Propionsäure[96] lieferte Kohlendioxyd neben Aethylamin. Oxydation des Aethylamins mit alkalischer Permanganatlösung ergab Essigsäure, welche nach Verdünnung mit inaktivem Material nach der oben beschriebenen Methode weiter abgebaut wurde. Die für die Abbauprodukte gemessenen Radioaktivitätswerte sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3 *)

(Vgl. auch Schema VIII, S. 33)

Produkt		Aktivität imp/sec. mMol CO_2	Aktivität %
α-Spinasteron		15,4	100
Aethylisopropylacetanilid		40,8	119
Essigsäure	$-CH_3$	107	24
	-COOH	113	25
Propionsäure	$-CH_3$	224	50
	$-CH_2$	221	49
	-COOH	5	1

Diskussion der Resultate

Die durch den Kuhn-Roth-Abbau des Anilids gewonnene Propionsäure entspricht den Kohlenstoffatomen 24, 28 und 29 von α-Spinasterin. Aus den in Tabelle 3 zusammengestellten Daten geht hervor, dass praktisch die gesamte Radioaktivität von α-Spinasterin (99 %) auf die beiden Kohlenstoffatome 28 und 29 gleichmässig verteilt ist. Man kann daraus schliessen, dass die Methylgruppe von Methionin ein Vorläufer beider Kohlenstoffatome darstellt.

Auf den ersten Blick mag die Beobachtung, dass nahezu die gesamte Aktivität des Sterins in der C-2-Seitenkette lokalisiert ist, erstaunlich anmuten, ist doch auf S. 29 gezeigt worden, dass eine Verschmierung der Radioaktivität möglicherweise via Acetat stattgefunden hat. In der Annahme, dass für das Verbindungspaar Betulinsäuremethylester-α-Spinasterin für die im Züchtungsversuch mit Methionin via Acetat eingebaute Aktivität ein ähnliches Verhältnis gilt, wie in den früher beschriebenen Experimenten mit Natriumacetat, lässt sich berechnen, dass α-Spinasterin nur 0,2 % der tatsächlich gefundenen Aktivität enthalten sollte. Mit anderen Worten: eine Verschmierung der Radioaktivität findet wohl auch bei α-Spinasterin statt. Der absolute Wert für die einzelnen Kohlenstoffatome ist aber im Vergleich zur Aktivität

*) Bei diesen Werten sind die verschiedenen Verdünnungen mit inaktivem Material berücksichtigt.

der Kohlenstoffatome 28 und 29 derart gering, dass er sich einer experimentellen Bestimmung entzieht. Eine direkte Ueberprüfung dieser Verhältnisse ergibt sich aus der für das Kohlenstoffatom 24 gemessenen Radioaktivität, aus welcher hervorgeht, dass an dieser Stelle maximal*) 1 % der Totalaktivität enthalten ist.

Auffallend ist die Tatsache, dass im Anilid von Aethylisopropylessigsäure mehr Aktivität (119 %) nachgewiesen wurde als im Ausgangsprodukt. Es muss dabei betont werden, dass die radiochemische Reinigung des Anilids auf grössere Schwierigkeiten stiess. Man kann deshalb nicht ausschliessen, dass der eigentliche dem Anilid zukommende Radioaktivitätswert durch die Anwesenheit einer chemisch nicht nachweisbaren Verunreinigung grösserer spezifischer Aktivität erhöht wird. Eine solche Verunreinigung dürfte z.B. mit Acetanilid identisch sein, dessen Entstehung auf die Anwesenheit geringer Mengen eines $\Delta^{24,28}$-Phytosterins im zur Ozonisation verwendeten Gemisch zurückgeführt werden könnte.

Die beim Abbau der Propionsäure gefundenen Resultate werden im übrigen unabhängig durch den Abbau der bei der Kuhn-Roth-Oxydation als Nebenprodukt anfallenden Essigsäure bestätigt. Diese Essigsäure kann sowohl aus der Isopropylgruppe als auch aus der Aethylseitenkette entstanden sein. Sie enthält somit neben den Kohlenstoffatomen 26/27 und 25 auch zu einem Teil die Atome 28 und 29. Der Abbau zeigte, dass beide Kohlenstoffatome der Essigsäure die gleiche spezifische Aktivität enthalten. Aus dem absoluten Wert der Aktivität kann zudem noch geschlossen werden, dass unter den Bedingungen der modifizierten Kuhn-Roth-Oxydation 46 % der Aethylseitenkette von Aethylisopropylacetanilid zu Essigsäure abgebaut werden.

Nach Abschluss dieser Arbeiten gelangten Versuche von Castle et al.[156] sowie Nicholas et al.[157] zu unserer Kenntnis. Sie zeigen, dass bei Züchtungsversuchen mit methylmarkiertem Methionin der Einbau von Aktivität im Vergleich zu den Triterpenen bevorzugt in β-Sitosterin erfolgt. Genauere Daten von durchgeführten Abbaureaktionen liegen aber nicht vor.

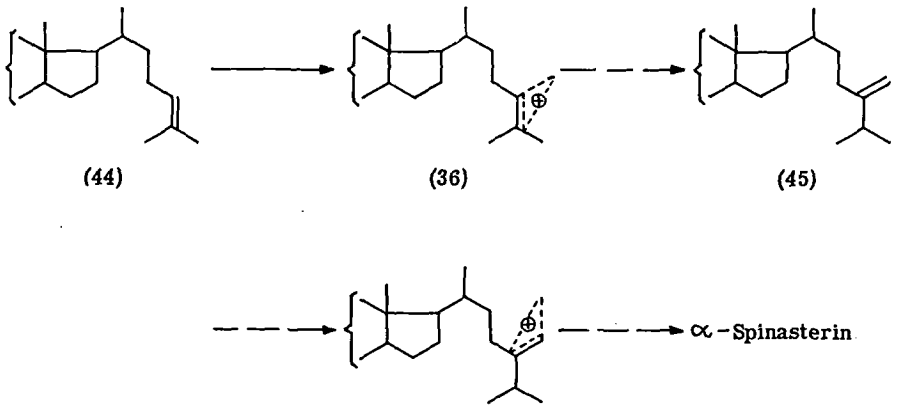
---

*) Dieser Wert kann deshalb als Maximalwert bezeichnet werden, da schon eine kleine Verunreinigung (ca. 2 %) der Propionsäure durch die beim Kuhn-Roth-Abbau als Nebenprodukt anfallende Essigsäure ausreicht, um die ganze im Kohlenstoffatom 24 gefundene Aktivität zu erklären. Eine solche Verunreinigung kann auf Grund der Reinheitskriterien für Propionsäure nicht ausgeschlossen werden.

Zum Abschluss scheint es an dieser Stelle angebracht, einige mögliche Mechanismen zu der in dieser Arbeit experimentell bewiesenen Bildung der C-2-Einheit von Phytosterinen aus der Methylgruppe von Methionin zu diskutieren. Man kann dafür zwei prinzipiell verschiedene Mechanismen in Betracht ziehen:

Eine erste Möglichkeit besteht darin, dass α -Spinasterin durch doppelte Alkylierung eines Vorläufers (44) mit einer Lanosterinseitenkette entsteht. Dieser Vorgang setzt die Bildung einer Zwischenstufe ((45), Schema IX) mit einer Doppelbindung in Stellung 24-28 voraus, die aus einem Uebergangszustand (36) entstehen könnte, wie er auch für die Biosynthese der C-1-Seitenkette von Mycosterinen postuliert wird (vgl. S. 25). Eine zweite, analoge Alkylierung der 24-Methylenverbindung führt

Schema IX



wiederum zur Ausbildung eines Kations (46), aus dem durch nachträgliche Umwandlungen α -Spinasterin entstehen kann. Ebenso ungewiss wie bei den Mycosterinen bleibt auch in diesem Falle die Art der Stabilisation der zwei primär postulierten Kationen ((36) und (46)). Die Hypothese einer C-28-Verbindung als Vorstufe eines C-29-Steroids erfährt eine gewisse Stütze in der Tatsache, dass in neuerer Zeit in höheren Pflanzen neben den typischen Phytosterinen auch Mycosterine nachgewiesen wurden. Thompson et al.[98] gelang es zu zeigen, dass handelsübliches β -Sitosterin

durch variierende Mengen von Campesterin verunreinigt ist. Bei gaschromatographischen Untersuchungen beobachtete auch Rowe*), dass rohes β-Sitosterin ein Gemisch von β-Sitosterin, Campesterin und Cholesterin im ungefähren Verhältnis 100:10:1 darstellt. Lederer et al.[97] gelang im weiteren der massenspektrometrische Nachweis von einfach und doppelt ungesättigten C-27-, C-28 und C-29-Sterinen in Pollen verschiedener Pflanzen. Auf das Vorkommen von Cholesterin in höheren Pflanzen wurde schon früher hingewiesen (vgl. S. 17).

Trotz der augenfälligen Plausibilität dieser Hypothese ist eine zweite Möglichkeit auf Grund der durchgeführten Versuche nicht von der Hand zu weisen, nämlich die primäre Bildung einer C-2-Gruppierung, welche anschliessend direkt auf das Steroidgerüst übertragen werden könnte. In Analogie zum Vorgang der biologischen Methylierungen lässt sich Aethionin (50), das höhere Homologe von Methionin, als Alkylierungsmittel in Betracht ziehen**). Geschieht aber die Alkylierung tatsächlich über Aethionin, so sieht man sich vor die Tatsache gestellt, dass beide Kohlenstoffatome von Aethionin von der potentiell kationoiden Methylgruppe von Methionin abzuleiten sind. Dieses Problem erinnert an die Bildung von Squalen aus zwei Einheiten Farnesylpyrophosphat (vgl. S. 13). In Analogie zu einem dort von Cornforth[5] vorgeschlagenen Reaktionsweg (vgl. S. 14) könnte man postulieren, dass Aethionin durch Umlagerung aus Methylmethionin (47)***), dem Methylierungsprodukt von Methionin entsteht (siehe Schema X). Vom chemischen Standpunkt aus findet diese Umlagerung eines Sulfoniumions****) Analogien in der Stevens- und Wittigumlagerung von Ammoniumverbindungen. Die intermediär notwendige Ausbildung eines Sulfoniumylids ist chemisch sogar plausibler als die Entstehung des entsprechenden Ammoniumylids. Austauschreaktionen von Methyl"onium"salzen mit Deuteriumoxyd[101] zeigen nämlich, dass die Aktivierungsenergie für die Sulfoniumverbindungen um ca. 30 % tiefer liegt, als für

---

*) Privatmitteilung von Dr. J. W. Rowe, U.S. Forest Products, Madison, Wisc.

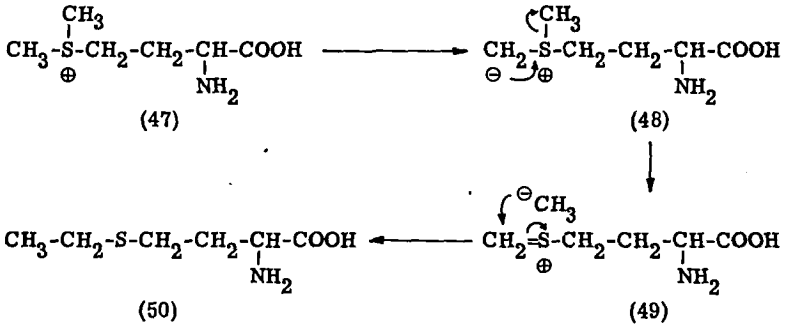
**) Erst vor kurzem ist Aethionin in der Natur nachgewiesen[99] worden. Nähere Angaben über seinen Stoffwechsel liegen noch nicht vor. Es scheint jedoch ein enger Zusammenhang zwischen der Biogenese von Aethionin und Methionin zu bestehen.

***) Methylmethionin wurde in einer ganzen Anzahl von höheren Pflanzen gefunden[100].

****) Von Thompson et al.[104] ist gezeigt worden, dass die Umlagerung einer Sulfoniumverbindung prinzipiell möglich ist. Die untersuchte Reaktion stellt aber insofern einen Spezialfall dar, als in β-Stellung zur Sulfoniumgruppierung eine Carbonylfunktion angeordnet ist, die ihrerseits die Ausbildung eines Ylids begünstigt.

die entsprechenden Ammoniumverbindungen. Ebenso ist die Herstellung von stabilen Sulfoniumyliden[102] mit viel schwächeren Basen möglich, als diejenige der entsprechenden Ammoniumylide[103].

Schema X



Das biosynthetische Endergebnis beider Hypothesen stimmt überein mit den experimentell gefundenen Resultaten. Der Wert dieser Hypothesen ist darin zu suchen, dass sie weiteren Untersuchungen zur Biogenese der Aethylseitenkette von Sterinen wegweisend sein dürfte.

D. Zur Struktur von Loganin

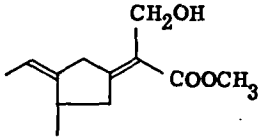
Die Struktur von Loganin war Gegenstand von Untersuchungen verschiedener Autoren. Die von ihnen bestimmten, spärlichen experimentellen Daten erlaubten lediglich Partialformeln für Loganin aufzustellen. Sie liessen jedoch vermuten, dass diese Verbindung zu einer Gruppe von in letzter Zeit häufiger in der Literatur beschriebenen Glucosiden*) gehören könnte. Die mögliche biogenetische Verwandtschaft dieser Glucoside mit anderen Gruppen von Naturstoffen lässt die Untersuchung der Biogenese von Loganin besonders wünschenswert erscheinen. Anschliessend werden Versuche zur Strukturaufklärung sowie Experimente im Hinblick auf die Biogenese beschrieben.

Frühere Arbeiten

Das Glucosid Loganin wurde 1883 zum ersten Male von Dunstan und Short[109] aus der Pulpa und den Samen von Strychnus nux vomica isoliert und charakterisiert. Im Jahre 1923 nahm Rosenthaler[110] die Arbeiten über Loganin wieder auf und stellte die Identität von Loganin mit dem von Bridel[2] aus Bitterklee (Menyanthes trifoliata) isolierten Meliatin fest. Merz und Krebs[111] bestimmten 1937 für Loganin die Bruttoformel $C_{17}H_{26}O_{10}$, die zudem durch Elementaranalyse und Molgewichtsbestimmung verschiedener Derivate bestätigt wurde. Durch Ausbildung eines Pentaacetyl- eines Pentabenzoyl- und eines Penta-(p-nitrobenzoyl)-derivats konnte auf die Anwesenheit von 5 acetylierbaren Hydroxylgruppen in Loganin geschlossen werden. Die Autoren ordneten ausserdem Loganin eine Methoxylgruppierung zu; auf Grund des Verbrauchs von Lauge wurde im weiteren fälschlicherweise das Vorliegen einer Lactongruppierung vermutet. Bei der Spaltung von Loganin mit Emulsin oder Säure wurde ein Mol Glucose nachgewiesen und in Form des Osazons identifiziert. In Uebereinstimmung mit der Anwesenheit von zwei acetylierbaren Hydroxylgruppen wurde das ölige, nicht zu kristallisierende Aglykon Loganetin in Form des kristallinen Di-p-nitrobenzoats sowie des Mono- und Ditrityläthers charakterisiert. Loganin konnte nicht hydriert werden, das Loganetin

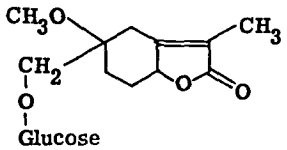
*) Auf diese Glucoside wird im Zusammenhang mit den biogenetischen Arbeiten (siehe S. 49) näher eingegangen.

dagegen nahm langsam ein Mol Wasserstoff auf. Die von Merz und Krebs[111] auf Grund dieser Ergebnisse als Arbeitshypothesen vorgeschlagenen Partialformeln wurden später von Birch und Smith[112] als nicht zutreffend bezeichnet. Aus den Resultaten der Kuhn-Roth-Bestimmung leiteten diese Autoren das Vorliegen einer C-Methylgruppe in Loganin ab. Milde alkalische Verseifung führte unter Abspaltung von Methanol zur Ausbildung einer Säure, die durch Veresterung mit Diazomethan wieder in Loganin zurückgeführt werden konnte. Dieser Befund steht in Uebereinstimmung mit der Annahme, dass in Loganin eine Methylestergruppierung vorhanden ist. Das UV.-Spektrum mit einer Absorptionsbande bei $\lambda = 242$ mμ (log $\varepsilon = 3,44$) veranlasste Birch und Smith zur Vermutung, dass in Loganin eine α, β-ungesättigte Carbonylverbindung vorliege. Die zur Bestimmung der Lage der Doppelbindung unternommenen Ozonisationsversuche, welche unter anderem Acetaldehyd ergaben, verleiteten die Autoren zur Annahme einer Aethylidengruppierung. Anhand dieser Experimente ordneten sie dem Glucosid willkürlich Struktur (51) zu.



O-Glucose

(51)



(52)

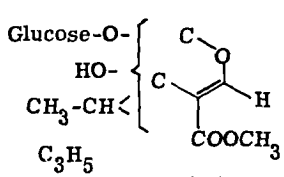
Merz und Lehmann[113] bezweifelten die Identität der von Birch et al.[112] aus Strychnus lucida isolierten Substanz mit Loganin. Die von ihnen als Arbeitshypothese postulierte Struktur (52) ist aber ebensowenig experimentell untermauert.

Für unsere in diesem Zeitpunkt einsetzenden Arbeiten wurde lediglich folgendes als bewiesen angenommen: Loganin besitzt die Bruttoformel $C_{17}H_{26}O_{10}$ und enthält einen Glucoserest. Im Aglukonteil ist eine C-Methylgruppe, eine Methylestergruppierung und eine freie, acetylierbare Hydroxylgruppe vorhanden. Bei der Abspaltung der Glucose entsteht eine weitere acetylierbare Hydroxylgruppe.

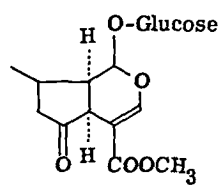
Eigene Arbeiten

Die Stengel, Blätter und Rhizome von Menyanthes trifoliata wurden in Anlehnung an von Guglielmetti[1] ausgearbeitete Methoden nacheinander mit Petroläther, Aether und Aceton erschöpfend extrahiert. Im Acetonextrakt konnte dünnschichtchromatographisch Loganin nachgewiesen werden. Da Vorversuche zeigten, dass die Darstellung von Loganin selbst infolge Zersetzung des Glucosids zu grossen Materialverlusten führt, verzichtete man auf eine direkte Isolierung. Der Rohextrakt wurde acetyliert und aus dem Gemisch Pentaacetylloganin durch Chromatographie und Kristallisation in einer durchschnittlichen Ausbeute von 25% (bezogen auf rohen Acetonextrakt) isoliert.

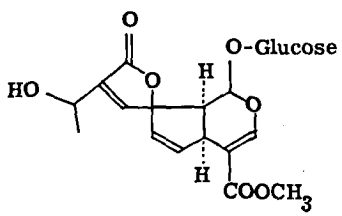
Die Daten spektroskopischer Untersuchungen von Pentaacetylloganin, die grosse Aehnlichkeit aufweisen mit jenen anderer Glucoside wie z.B. Verbenalin (53)[114] und Plumierid (54)[115], erlaubten für Loganin arbeitshypothetisch Partialformel (55) vorzuschlagen. Eine Bande im IR.-Spektrum von Pentaacetylloganin bei 1640 cm^{-1} lässt das Vorliegen einer Enoläthergruppierung vermuten. Im UV.-Spektrum weist das Auftreten einer Absorptionsbande bei $\lambda = 238$ mμ (log $\varepsilon = 4,1$) auf das Vorhandensein einer α, β-ungesättigten Carbonylfunktion in Pentaacetylloganin hin. Im NMR.-Spektrum sind zwei Signale besonders charakteristisch: Ein Dublett bei $\delta = 1,05$ (3H) deutet auf die Anwesenheit einer sekundär gebundenen Methylgruppe hin. Das Singlett bei $\delta = 7,25$ (1H) dürfte dem olefinischen Proton der Enoläthergruppierung zukommen, das durch die Verknüpfung mit einem Sauerstoffatom nach tieferem Feld verschoben ist.



(55)



(53)



(54)

Unabhängig von diesen physikalischen Messungen wurde das Vorliegen der Partialstruktur (55) in Pentaacetylloganin durch die folgenden Reaktionen chemisch bewiesen (siehe Schema XI, S. 44).

Die Behandlung von Pentaacetylloganin (56)*) mit Brom in Tetrahydrofuran und Wasser führte zur Ausbildung eines kristallinen Bromhydrins (57) der Zusammensetzung $C_{27}H_{37}O_{16}Br$. Diese Substanz weist im IR.-Spektrum eine neue Absorptionsbande bei 3550 cm^{-1} auf, dagegen ist die der Enoläthergruppierung zuzuordnende Bande bei 1640 cm^{-1} verschwunden. Im UV.-Spektrum ist keine Absorption mehr festzustellen. Dies zeigt, dass die angegriffene Doppelbindung tatsächlich im Chromophor von Pentaacetylloganin lokalisiert sein muss**). Behandlung dieses Bromhydrins (57) mit Chrom(VI)-oxyd in Eisessig lieferte unter Verlust von zwei Wasserstoffatomen ein kristallines Bromlacton (58) der Bruttoformel $C_{27}H_{35}O_{16}Br$. Im IR.-Spektrum dieser Verbindung war keine Hydroxylbande mehr sichtbar. Beim Versuch der Entbromierung des Bromlactons (57) mit Zink in 96-proz. Essigsäure unter Erwärmen wurde eine teilweise Zersetzung des Glucosids beobachtet. Die besten Ergebnisse zeitigte hier die Behandlung des Bromlactons mit Zink und Essigsäure bei Zimmertemperatur. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches ergab zwei Verbindungen (59a und 59b) gleicher Konstitution. Die verschiedenen Werte des optischen Drehvermögens ((59a): $[\alpha]_D = -31,4^o$; (59b): $[\alpha]_D = +9,12^o$) zeigen, dass es sich bei diesen beiden Proben nicht um kristalline Modifikationen der gleichen Verbindung handelt. Aus dem Vergleich der IR.-Spektren, die in Chloroform identisch sind und lediglich bei der Aufnahme in Nujol kleine Unterschiede im Fingerprintgebiet aufweisen, sowie aus den Ergebnissen des weiter unten beschriebenen Abbaus, lässt sich mit grosser Wahrscheinlichkeit ableiten, dass es sich bei diesen Substanzen um zwei am Kohlenstoffatom 4 epimere Verbindungen handelt. Die alkalische Verseifung beider Lactone lieferte nach dem Ansäuern des Reaktionsgemisches eine neutrale, optisch aktive und glucosefreie Verbindung (60) der Bruttoformel $C_9H_{12}O_3$. Auf die Struktur dieser Verbindung wird später näher eingegangen (vgl. S. 46). Es sei aber bereits hier festgehalten, dass die Tatsache der Abspaltung der Glucose bei der alkalischen Behandlung erlaubt, Partialformel (55) zu erweitern und auf eine

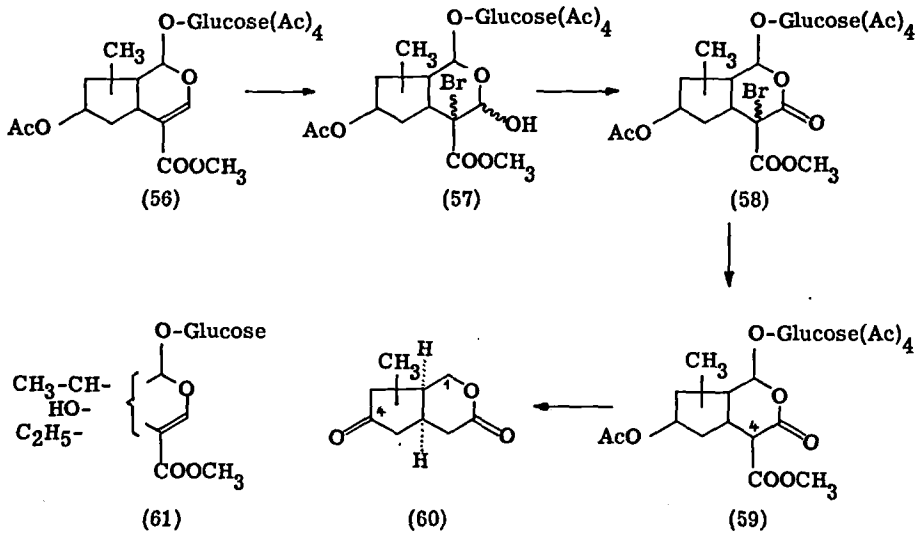
---

*) Einfachheitshalber wird in den folgenden Ausführungen von den in dieser Arbeit abgeleiteten Strukturformeln ((65) oder (66)) für Loganin Gebrauch gemacht.

**) Zum analogen Schluss kamen gleichzeitig auch Birch und Grimshaw[116], die bei der Behandlung von Pentaacetylloganin mit Brom in Methanol ein kristallines Pentaacetylloganin-methoxybromid isolierten.

halbacetalische Verknüpfung des Glucoserests mit der Enoläthergruppierung zu schliessen (Partialformel (61)).

Schema XI



In einer zweiten Reaktionsfolge konnte das Kohlenstoffgerüst des Aglykonteils von Loganin weitgehend festgelegt werden. Unterwarf man nämlich Pentaacetylloganin einer Ozonolyse mit nachträglicher oxydativer Spaltung des Ozonids mit Silberoxyd in alkalischem Milieu [87], so entstand ein Gemisch von Säuren. Veresterung mit Diazomethan lieferte ein Rohprodukt, in dem gaschromatographisch zwei Hauptkomponenten nachgewiesen wurden. Das Auftreten von starken Hydroxylbanden im IR.-Spektrum macht es wahrscheinlich, dass das vorliegende Gemisch zur Hauptsache Hydroxyester enthält. Nach der Oxydation mit Chrom(VI)-oxyd-Schwefelsäure in Acetonlösung wurde gaschromatographisch eine optisch aktive Verbindung (62) der Zusammensetzung $C_{10}H_{14}O_5$ isoliert, deren Molekulargewicht massenspektrometrisch bestätigt wurde. Im NMR.-Spektrum sind neben dem Signal einer sekundären Methylgruppe ($\delta = 1,2$; d; $J = 6,5$ Hz; 3H) zwei Singletts bei

$\delta = 3,8$ (3H) und 3,83 (3H) sichtbar, die zwei Methylestergruppierungen zugeordnet wurden. Anhand des IR.-Spektrums konnte das Vorliegen einer Hydroxylgruppe ausgeschlossen werden. Die durch die erwähnten Daten noch nicht erfasste Sauerstoffunktion muss demnach entweder in Form eines Ketons oder Aethers vorliegen. Auf Grund der weiter unten beschriebenen Reduktion kann jedoch die Anwesenheit einer Carbonylfunktion angenommen werden. Das somit noch verbleibende Bruchstück C_5H_5 muss mit einer Cyclopentaneinheit identisch sein, ist doch das Vorliegen einer Doppelbindung anhand des NMR.-Spektrums*) und die Anwesenheit eines Cyclobutanonsystems auf Grund des IR.-Spektrums (Bande bei 1720-1750 cm^{-1}) auszuschliessen.

Im UV.-Spektrum ist weder in äthanolischer Lösung noch in 0,01N Kaliumhydroxyd/Aethanol eine Absorptionsbande sichtbar. Dies schliesst die Anwesenheit einer enolisierbaren β-Ketoestergruppierung aus. Zum Vergleich sei erwähnt, dass Cyclopentan-2-carbonsäuremethylester in alkalischer aethanolischer Lösung eine starke Absorptionsbande bei $\lambda = 288$ mμ (log $\varepsilon = 4,1$) aufweist. Das vorliegende Cyclopentansystem kann deshalb nur in der in Formel (62) dargestellten Art durch die zwei Methylestergruppen und die Carbonylfunktion substituiert sein. Nach der Zuordnung dieser drei Substituenten verbleiben für die sekundäre Methylgruppe zwei Stellen, die jedoch aus Symmetriegründen identisch sind. Das in dieser Reaktionsfolge gewonnene Abbauprodukt entspricht demnach einem 3-Methyl-4-keto-cyclopentan-1,2-dicarbonsäuredimethylester (62).

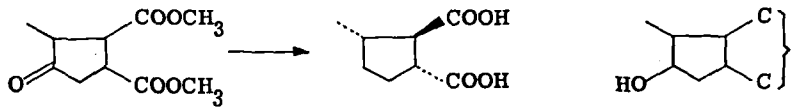
Reduktion dieses Ketodimethylesters nach Clemmensen führte zur Ausbildung einer optisch inaktiven**) Verbindung $C_8H_{12}O_4$ (63), die auf Grund des Schmelzpunktes sowie der pK-Werte***) (6,04; ca. 9,36) mit racemischer trans-Nepetsäure[117] identisch sein dürfte. Eine eindeutige Zuordnung war nicht möglich, da kein authentisches Vergleichsmaterial zur Verfügung stand.

---

*) Eine einfache Ueberlegung zeigt, dass die geringe Anzahl noch zur Verfügung stehender Kohlenstoffatome das Vorliegen einer im NMR.-Spektrum nicht nachweisbaren tetrasubstituierten Doppelbindung unmöglich macht.

**) Die Entstehung einer optisch inaktiven Verbindung ist verständlich in der Annahme, dass unter den Bedingungen der Clemmensen-Reduktion (Kochen mit konz. Salzsäure) sowohl im Ausgangsprodukt als auch im Reaktionsprodukt eine Epimerisierung stattfinden kann.

***) Infolge der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Materiales sind diese pK-Werte mit grösseren Fehlern als üblich behaftet (ca. ± 10 %).



(62) (63) (64)

Die durch diese zwei Reaktionsfolgen abgeleiteten Partialstrukturen (61) und (64) umfassen alle Strukturelemente von Loganin. Durch Kombination ergeben sich daraus zwei mögliche Strukturformeln (65) und (66). Ein definitiver Entscheid zugunsten einer dieser zwei Strukturen ist auf Grund der durchgeführten Versuche nicht möglich.

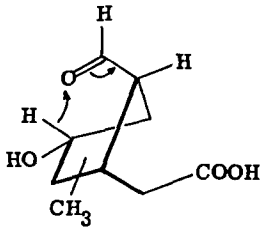
(65) (66)

Die Struktur des schon oben (S. 43) erwähnten Verseifungsprodukts $C_9H_{12}O_3$ kann auf Grund seiner spektroskopischen Daten und seines chemischen Verhaltens, sowie anhand der für Loganin abgeleiteten Partialformeln (65) oder (66) festgelegt werden. Die Tatsache, dass diese neutrale Substanz (60) erst nach dem Ansäuern aus wässrigen Lösungen isoliert werden kann, spricht für das Vorliegen einer Lactongruppierung. Das Auftreten einer IR.-Absorptionsbande bei 1730 - 1770 cm^{-1} steht in Uebereinstimmung mit dieser Annahme. Im weiteren kann auf Grund des IR.-Spektrums die Anwesenheit von Hydroxylgruppen ausgeschlossen werden. Die CD-Kurve von (60)*) ($\Delta\varepsilon_{296} = -0,63$) zeigt zudem, dass die Verbindung eine Ketogruppe enthält. Im NMR.-Spektrum endlich ist ein Multiplett bei $\delta = 4,2 - 4,6$ (2H) auffallend, das der Gruppierung $-\underline{CH_2}-O-$ zuzuordnen ist. Alle diese Tatsachen erlauben, dem Verseifungsprodukt (vgl. S. 43) Struktur (60) zuzuordnen.

---

*) Die Bestimmung der CD-Kurve verdanke ich Herrn Prof. Dr. G. Ourisson, Universität Strassburg.

Durch Verseifung des Lactons (59) würde man nicht ohne weiteres die Entstehung des Ketolactons (60) erwarten, in welchem die Oxydationsstufen an den Kohlenstoffatomen 1 und 4 gegenüber dem Ausgangsprodukt vertauscht sind. Man kann jedoch der Bildung dieser Substanz Rechnung tragen mit der Annahme, dass während der Verseifung eine intramolekulare Oxydoreduktion stattfindet, wie sie in Figur (67) dargestellt ist.



(67)

Die Aufnahme eines NMR.-Spektrums bei 100 MHz *) erlaubt zusätzlich, gewisse Schlüsse über die Konfiguration des Ketolactons (60) zu ziehen. Das der Gruppierung $-\underline{CH_2}-O-$ zuzuordnende Multiplett bei $\delta = 4,2 - 4,6$ zeigt in diesem Falle eine Aufspaltung in 8 Linien und entspricht dem AB-Teil eines ABX-Spektrums mit den Kopplungskonstanten $J_{AX} = 4$ Hz; $J_{BX} = 5$ Hz und $J_{AB} = 13$ Hz. Die Kopplungskonstante $J_{AB} = 13$ Hz zeigt nach Gutowsky et al.[119], dass die Protonen H_A und H_B einen Tetraederwinkel einschliessen. Die dihedralen Winkel H_X-C-C-H_A und H_X-C-C-H_B lassen sich nach einer von Karplus[118] aufgestellten Beziehung zu 38° bzw. 60° abschätzen. Die Protonen H_A und H_X bzw. H_B und H_X können diese Winkel nur einschliessen unter der Annahme, dass H_X äquatorial angeordnet ist. Diese Lage von H_X ist aber nur bei einer cis-Verknüpfung der beiden Ringe möglich. Die auf diese Weise abgeleitete Art der Ringverknüpfung stimmt überein mit der Konfiguration der Kohlenstoffatome 5 und 9 ähnlicher Verbindungen, wie z.B. Aucubin (68)[120], Plumierid (54)[115], Genipin (69)[121] und Verbenalin (53)[114]. Die für das Ketolacton (60) abgeleitete Konfiguration kann jedoch nicht als beweiskräftig für eine cis-Ringverknüpfung in Loganin selbst angesehen werden, da unter den Bedingungen der Bildung der Verbindung (60) eine Epimerisierung am Kohlenstoffatom 9 nicht auszuschliessen ist.

---

*) Für die Aufnahme dieses Spektrums danke ich Herrn Dr. A. Melera, Varian AG, Zürich.

Im Verlaufe dieser Arbeit ist von Sheth, Ramstad und Wolinsky[123] für Loganin anhand spektroskopischer Daten ein analoger Strukturvorschlag gemacht worden. Die von diesen Autoren als weiterer Strukturhinweis angeführte Oxydationsreaktion von Loganin, welche zur Bildung eines mit Verbenalin nicht identischen Ketons führt, liefert im Prinzip keine neuen Erkenntnisse, ist doch schon von Büchi et al.[114] gezeigt worden, dass die zwei dem Verbenalin entsprechenden Alkohole Verbenalol und Epiverbenalol mit Loganin nicht identisch sind. Trotzdem ordneten Sheth et al. Loganin Strukturformel (65) zu in der Annahme, dass zwischen Verbenalin und Loganin ein biogenetischer Zusammenhang besteht.

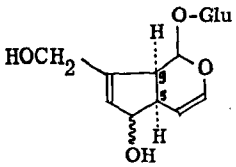
E. Zur Biogenese von Loganin

Loganin ist strukturell nahe verwandt mit einer Reihe von Pflanzenstoffen, deren Konstitution besonders im Laufe der letzten Jahre von mehreren Forschergruppen untersucht wurde. Plumierid (54)[115] war die erste dieser Verbindungen, deren Struktur vollständig aufgeklärt werden konnte (1958). In immer kürzeren Zeitabständen folgten darauf Beiträge zur Strukturaufklärung ähnlicher Verbindungen wie Aucubin (68)[120], Verbenalin (53)[114], Genipin (69)[121], Asperulosid (70)[124], Catalposid (71)[125], Plumiericin (72)[126], Fulvoplumiericin (73)[127] und Monotropein (74)[128]. Die meisten dieser Verbindungen sind Glucoside und leiten sich strukturell von Iridomyrmecin (75)[129] oder Nepetalacton (76)[130] ab. Die Verwandtschaft dieser Pflanzenstoffe wird noch betont durch die Tatsache, dass in allen bisher untersuchten Fällen die absolute Konfiguration an den Kohlenstoffatomen 5 und 9 identisch ist. Sie kommen zudem mit Ausnahme von Monotropein in verwandten Pflanzenfamilien vor (vgl. Tabelle 4).

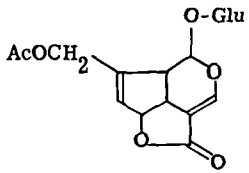
Tabelle 4

Familie	Vertreter
Apocynaceen	Plumierid, Plumiericin, Fulvoplumiericin
Rubiaceen	Asperulosid, Genipin
Loganiaceen	Aucubin, Bakankosin, Loganin
Bignoniaceen	Catalposid
Oleaceen	Europein, Elenolid
Verbenaceen	Verbenalin
Gentianaceen	Gentiopikrin, Swertiamarin
Dipsacaceen	Gentianin

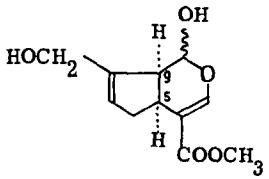
Levisalles et al.[131] wiesen erstmals auf einen möglichen Zusammenhang dieser Pflanzenstoffe mit einer zweiten Gruppe von Verbindungen hin, zu denen Gentiopikrin (77)[132], Swertiamarin (78)[133], Gentianin (79)[134], Bakankosin (80)[135], Elenolid (81)[131] und Oleuropein (82)[137] gehören. Diese Verbindungen (77 - 82) besitzen ein Kohlenstoffgerüst, das man formal durch Oeffnung der in den



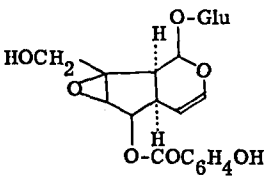
(68)



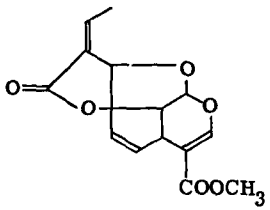
(70)



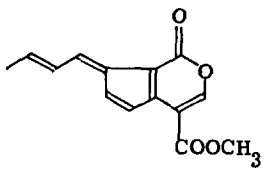
(69)



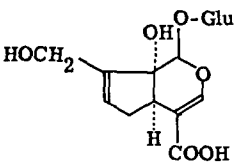
(71)



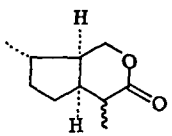
(72)



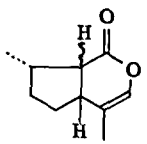
(73)



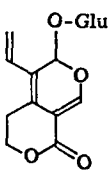
(74)



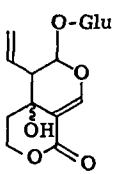
(75)



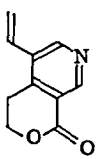
(76)



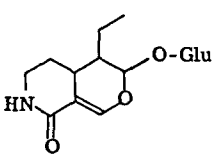
(77)



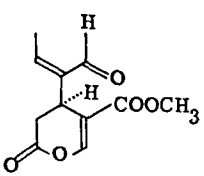
(78)



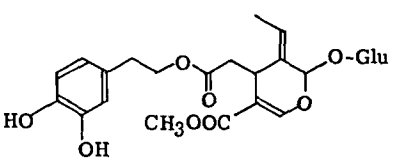
(79)



(80)



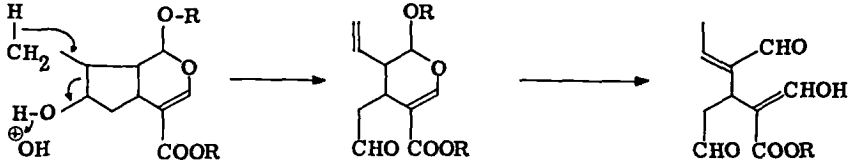
(81)



(82)

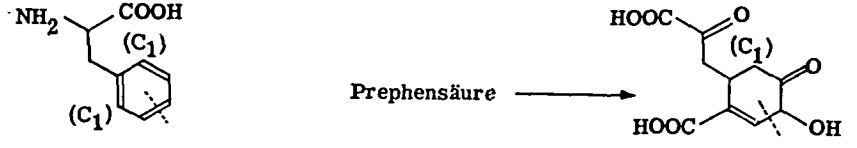
erstgenannten Verbindungen (53, 54, 68-76) enthaltenen Cyclopentaneinheit ableiten kann. In diesem Zusammenhang ist Loganin unter Annahme von Struktur (65) eine Brückenstellung zwischen den beiden Gruppen erteilt worden (Schema XII). Die nahe Verwandtschaft dieser Gruppen wird gestützt durch die Tatsache, dass sowohl die "offenen" wie die "geschlossenen" Formen in verwandten Pflanzenfamilien vorkommen (vgl. Tabelle 4).

Schema XII



(83) (84) (85)

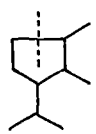
Noch interessanter werden diese Beobachtungen aber bei Berücksichtigung der Tatsache, dass die Gruppe der Verbindungen (77 - 82) biogenetisch in Zusammenhang gebracht wurde mit dem nicht von Tryptophan stammenden Teil verschiedener Indolalkaloide. Für die Biogenese dieses C-10-Fragments sind schon einige Theorien aufgestellt worden. Die von Barger und Hahn[136] formulierte und von Woodward[138] und Robinson[139] erweiterte Hypothese postuliert Phenylalanin oder einen phenolischen Abkömmling davon sowie zwei C-1-Einheiten als Vorläufer der C-10-Gruppierung (vgl. Figur 86). Nach Wenkert und Bringi[140] stellen aber nicht Phenylalanin, sondern dessen biogenetische Vorstufe Prephensäure und eine C-1-Einheit Vorläufer der fraglichen C-10-Gruppierung dar (vgl. Figur 87). Alle diese Autoren betrachten die sogenannten "offenen" Formen als Vorläufer der Glucoside vom Typus des Iridomyrmecins (75).



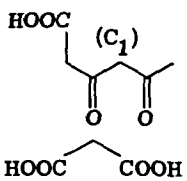
(86) (87)

Ganz im Gegensatz dazu steht eine Theorie, die von verschiedenen Seiten in Betracht gezogen und von Thomas[141] veröffentlicht wurde. Die vorgeschlagene Hypothese postuliert ein Monoterpen als Vorläufer der C-10-Einheit von Indolalkaloiden (vgl. Figur 88). Entsprechend dieser Theorie leiten sich, im Gegensatz zu den oben erwähnten Hypothesen, Glucoside der "offenen" Form von denjenigen vom Typus des Iridomyrmecins ab.

Die ersten Versuche zur experimentellen Untermauerung einer dieser Theorien wurde von Leete et al.[142) 143] unternommen. Die Ergebnisse dieser Experimente, die mit keiner der bereits vorgeschlagenen Hypothesen übereinstimmen, veranlassten die Autoren zur Formulierung einer neuen Theorie, die die Entstehung der C-10-Einheit von Indolakaloiden durch lineare Kondensation von drei Acetateinheiten sowie Addition einer C-1-Einheit und Malonsäure in Betracht zieht (vgl. Figur 89). Versuche von Battersby[144] führten jedoch zu widersprechenden Resultaten, so dass die Gültigkeit der von Leete[142) 143] beschriebenen Experimente bezweifelt werden muss und die Frage der Entstehung der C-10-Einheit von Indolalkaloiden immer noch ungelöst bleibt.



(88)



(89)

In Anbetracht all dieser Tatsachen schien es von Interesse, die Biogenese des leicht zugänglichen Glucosids Loganin näher zu untersuchen. Menyanthes trifoliata wurde deshalb wie früher beschrieben (vgl. S. 27) in Gegenwart von 0,1 mC (2-^{14}C)-Mevalonsäure gezüchtet. Aus dem getrockneten Pflanzenmaterial isolierte man radioaktive Fraktionen, welche Pentaacetylloganin enthielten. Durch sechsmaliges Umkristallisieren ging jedoch die ursprünglich in der Probe vorhandene Aktivität vollständig verloren. Es steht somit fest, dass in diesem Versuche kein Einbau von Mevalonsäure in Loganin*) stattgefunden hat.

---

*) Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass neben Pentaacetylloganin eine noch nicht identifizierte Substanz hoher Aktivität isoliert werden konnte, die sich chemisch ähnlich verhält wie Pentaacetylloganin.

Abgesehen von der Möglichkeit, dass Loganin nicht nach der Art eines Monoterpens aus zwei Einheiten Mevalonsäure aufgebaut wird, kann man verschiedene Gründe für das Ausbleiben des Einbaus von Mevalonsäure anführen. Einer davon ist in der Möglichkeit zu suchen, dass Loganin während der Zeit der Einbauversuche von der Pflanze überhaupt nicht synthetisiert wird. Zur Entscheidung dieser Frage wurde Menyanthes trifoliata in Gegenwart von 0,1 mC L-(Methyl-^{14}C)-Methionin gezüchtet. Falls eine Synthese von Loganin in der fraglichen Zeit überhaupt stattfindet, sollte erwartungsgemäss die Methylgruppe von Methionin in die Methylestergruppierung des Glucosids eingebaut werden. Der Einbauversuch mit Methionin erlaubt ferner, die Theorien, die den Einbau einer C-1-Einheit in das C-10-Fragment postulieren, auf ihre Gültigkeit zu überprüfen. Im Falle anderer Alkaloide ist nämlich von Barton et al.[153] sowie von Battersby[154] gezeigt worden, dass eine C-1-Einheit in Form einer N-Methylgruppe eingebaut werden kann.

Die übliche Aufarbeitung (vgl. S. 42) des in Gegenwart von methylmarkiertem Methionin gezüchteten Pflanzenmaterials lieferte radioaktives, radiochemisch reines Pentaacetylloganin bei einer Einbaurate von 1 %. Zur Festlegung der Radioaktivität wurde eine Probe dieses aktiven Pentaacetylloganins mit Bariumhydroxyd in wässriger Lösung verseift und das dabei entstehende Methanol in Form seines 3,5-Dinitrobenzoats gefasst. Ferner isolierte man zur Kontrolle auch das grosse Spaltstück, die Norloganinsäure in Form ihres Acetats. Die gemessenen Werte der bis zur konstanten Radioaktivität gereinigten Proben sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5

Produkt	L-(Methyl-^{14}C)-Methionin		
	imp/min. ∞	imp/sec. mMol CO_2	%
Pentaacetylloganin	105	231,7	100
3,5-Dinitrobenzoat		790	101
Norloganinsäureacetat	1	-	1

Diese Resultate zeigen, dass L-(Methyl-^{14}C)-Methionin nur in die Methylestergruppierung von Pentaacetylloganin eingebaut wird. Der für Norloganinsäureacetat gemessene Wert ist vernachlässigbar klein. Der ausschliessliche Einbau

der Methylgruppe von Methionin in die Estergruppierung von Loganin macht es zumindest unwahrscheinlich, dass die Hypothesen, die den Einbau einer C-1-Einheit in das C-10-Gerüst postulieren, für Loganin zutreffen. Falls überhaupt eine C-1-Einheit eingebaut wird, kann Methionin offensichtlich nicht als Vorläufer dieser Einheit dienen. Das negative Resultat des Züchtungsversuches mit Mevalonsäure hingegen ist nicht beweiskräftig für den nicht terpenoiden Charakter von Loganin. So ist z.B. von Kirby et al.[145] kein Einbau von Mevalonsäure in das unzweifelhaft terpenoide Alkaloid Delphelin beobachtet worden, während unter den gleichen Bedingungen ein Einbau der Methylgruppe von Methionin in die O-Methyl- und N-Aethylgruppe stattfindet. Diese Tatsache könnte auf Unterschiede in der Permeabilität der Zellwände für die einzelnen Vorläufer zurückgeführt werden.

Nach Abschluss unserer eigenen Arbeiten gelangten die Resultate von Untersuchungen von Schmid und Yeowell*) zu unserer Kenntnis. Diese zeigen, dass sowohl Acetat als auch Mevalonat in Plumierid ((54), vgl. S. 42) eingebaut werden. Die beim Abbau der radioaktiven Proben gefundenen Ergebnisse stehen in Uebereinstimmung mit der Annahme, dass Plumierid aus zwei Einheiten Mevalonsäure und zwei Einheiten Essigsäure gebildet wird. Wieweit sich diese Resultate auf die Formulierung der Biogenese des C-10-Fragments von Indolalkaloiden übertragen lassen, kann auf Grund der heute vorliegenden Tatsachen noch nicht entschieden werden.

---

*) Herrn Prof. Dr. H. Schmid, Universität Zürich, bin ich für die Bekanntgabe dieser Resultate vor der Drucklegung zu Dank verpflichtet.

F. Anhang

Zur Methodik des Abbaus radioaktiver Essigsäure nach Schmidt[95)]

Zum Abbau von radioaktiver Essigsäure sind zur Hauptsache drei Methoden angewendet worden:

a) Pyrolyse von Lithiumacetat unter Ausbildung von Lithiumcarbonat und Aceton[105)], welches weiter zu Jodoform abgebaut werden kann. Diese Methode liefert nach neueren Ergebnissen[105)] nicht immer reproduzierbare Werte.

b) Zersetzung des Silbersalzes von Essigsäure mit Brom nach der Methode von Hunsdiecker[106)]. Dieser Abbau erlaubt nur die Aktivität der Carboxylgruppe von Essigsäure direkt zu bestimmen.

c) Abbau nach Schmidt[95)]. Diese Methode ist von Phares[96)] speziell für kleine Substanzmengen ausgearbeitet worden und erlaubt die Bestimmung der Radioaktivität beider Kohlenstoffatome von Essigsäure.

Ausgehend von der Methode nach Schmidt, ist von Britt[95)] eine für die Reaktionsfolge geeignete Apparatur für den Abbau von Substanzmengen von 15 - 50 mg angegeben worden. Die Wiederholung der von ihm durchgeführten Versuche zeigte aber, dass der übliche Abbau von radioaktiver Essigsäure zu Kohlendioxyd und Methylamin unter Verwendung von Schwefelsäure und Natriumazid einen Verlust von 10 - 20 % der Radioaktivität bewirken kann. Blindversuche ergaben, dass unter den Bedingungen des Abbaus aus Natriumazid und Schwefelsäure allein ebenfalls ein Gas freigesetzt wurde, das in der zum Auffangen des Kohlendioxyds verwendeten Bariumhydroxydlösung einen Niederschlag bildete. Dieser Blindwert ist nicht konstant und variiert sehr stark je nach der Menge der zum Abbau gelangenden Säure, wodurch eine Kompensation verunmöglicht wird. Zur Erreichung reproduzierbarer Werte beim Schmidt-Abbau wurden einige weitere Säuren auf ihre Verwendbarkeit geprüft. Beim Ersatz der Schwefelsäure durch Salpetersäure fand kein Abbau statt. Gute Resultate lieferte dagegen die Anwendung von Polyphosphorsäure[107) 108)]. Bariumcarbonat wurde auf diese Art in Ausbeuten bis 95 % erhalten[*)] und der Blindwert betrug höchstens 1 %.

---

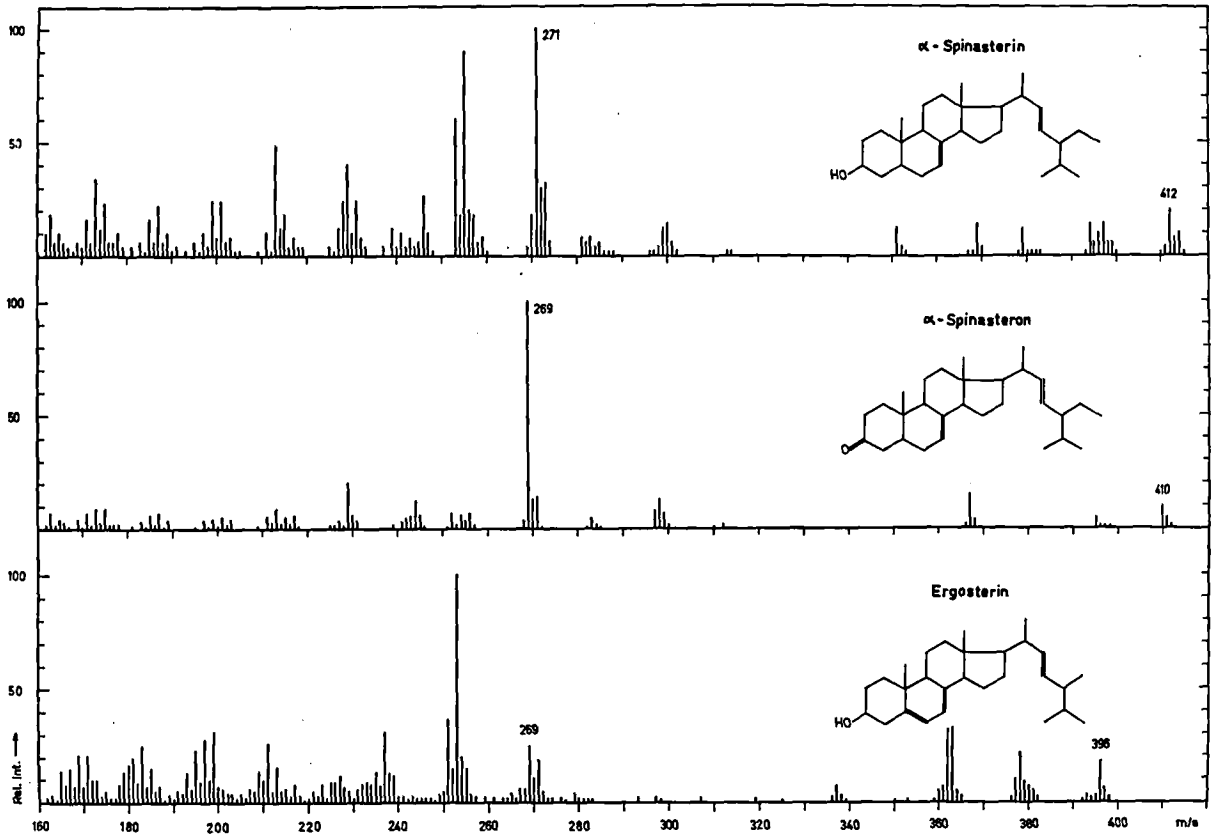
*) Diese hohen Ausbeuten beziehen sich auf direkte Wägungen des ausgefällten Bariumcarbonats. Die Ausbeuten in den radioaktiven Experimenten sind geringer, da infolge der Art der Herstellung der zur radioaktiven Messung verwendeten Plättchen Verluste von mehreren Milligramm auftreten können (vgl. experimenteller Teil).

Die Genauigkeit dieser modifizierten Abbaumethode überprüfte man durch den Abbau zweier Proben (1-^{14}C) bzw. (2-^{14}C)-Natriumacetat, deren Aktivität bei den entsprechenden p-Phenylphenacylestern bestimmt wurde. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Sie zeigen, dass bei der Verwendung von Polyphosphorsäure beim Abbau von Essigsäure nach Schmidt, Natriumacetat ohne jeden Verlust an Radioaktivität zu Kohlendioxyd und Methylamin abgebaut wird. Die gemessenen Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den theoretisch zu erwartenden überein und sind reproduzierbar.

Diese Methode dürfte für den Abbau höherer Säuren ebenfalls geeignet sein. Sie liefert auch beim Abbau geringer Mengen ($\geqslant$ 10 mg) Essigsäure genaue und reproduzierbare Resultate.

Tabelle 6

Produkt	$^*CH_3$-COOH		CH_3-$\overset{*}{C}$OOH	
	imp/sec. mMol CO_2	%	imp/sec. mMol CO_2	%
p-Phenylphenacylester	618	100	1926	100
-CH_3	9400	100	0	0
-COOH	0	0	31338	101



Figur 1 Massenspektren von α-Spinasterin, α-Spinasteron und Ergosterin

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Bemerkungen

Die Schmelzpunkte wurden in einer am Hochvakuum abgeschmolzenen Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Bestimmungen der optischen Drehungen führte man in Chloroformlösung in einem Rohr von 10 cm Länge aus. Die IR.-Absorptionsspektren wurden auf einem Perkin-Elmer Spektrophotometer (Modell A-21, NaCl-Prismen) aufgenommen. Die UV.-Absorptionsspektren bestimmte man in aethanolischer Lösung mit einem Beckmann-Spektrographen "DK 1". Solange nicht anders angegeben, sind die NMR.-Spektren auf einem Varian "A-60-Spektrometer" (60 MHz) in Deuterochloroform als Lösungsmittel aufgenommen. Als interne Referenz diente Tetramethylsilan ($\delta = 0$). Bei der in δ erfolgenden Beschreibung der NMR.-Signale bedeuten: s = Singlett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quadruplett, m = Multiplett; die in Klammern angegebenen Zahlen geben die durch Integration ermittelte Anzahl Protonen an. Die Werte für die Spin-Spin-Wechselwirkungen sind in Hz angegeben. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden auf einem Massenspektrometer AEI "MS 2/H" bei einer Eintrittstemperatur von 190° und einer Spannung von 70 eV durchgeführt. Die Dünnschichtchromatogramme wurden mit Kieselgel G für Dünnschichtchromatographie "Merck", aktiviert bei 140°, ausgeführt. Sichtbarmachung der Flecken, sofern nicht anders angegeben, durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure. Zur Chromatographie verwendete man Silicagel "Merck", < 0,008 cm.

Unter "üblicher Aufarbeitung" soll folgendes Vorgehen verstanden werden: Extraktion des Reaktionsgemisches mit dem angegebenen Lösungsmittel in drei Scheidetrichtern; wenn nötig: Trennung in saure, basische und neutrale Anteile, Neutralwaschen des organischen Lösungsmittels mit Wasser oder gesättigter Kochsalzlösung und Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat.

Die groben Radioaktivitätsmessungen der organischen Substanzen wurden nach einer der zwei folgenden Methoden durchgeführt:

a) Messung ausgedrückt in Impulsen pro Minute und Milligramm (imp/min.mg) in einer Aluminiumschale von 3,14 cm^{2} Oberfläche mit 10 mg Substanz auf einem "Tracerlab 100 Scaler".

b) Messung ausgedrückt in Impulsen pro Minute und "unendlicher Schichtdicke" (imp/min. ∞) in einer Polyäthylenschale von 1 cm^2 Oberfläche mit 25-30 mg Substanz auf einem "Tracerlab 100 Scaler".
Die genauen Radioaktivitätsmessungen, ausgedrückt in Impulsen pro Sekunde und Millimol CO_2 (imp/sec. mMol CO_2), erfolgten durch Verbrennen[146) 147)] der Substanz und Messen der Radioaktivität des Kohlendioxyds in einem Gasproportionalzählrohr. Die Fehler dieser Messungen liegen schätzungsweise zwischen 3 und 5 %. Alle Versuche mit radioaktivem Material wurden zuerst mit inaktiver Substanz ausgeführt.

Züchtungen von Menyanthes trifoliata

Die Züchtungsversuche wurden in den Monaten April bis Juni durchgeführt.

a) In Gegenwart von L-(Methyl-^{14}C)-Methionin

1. Züchtung

Die Rhizome von 22 frisch gepflückten, unverletzten Menyanthespflanzen aus dem Katzensee (Kt. Zürich) wurden auf ca. 20 cm verkürzt und unter Wasser schräg angeschnitten. 3,45 mg L-(Methyl-^{14}C)-Methionin (Radiochemical Center, Amersham, Bucks., England) mit einer Aktivität von 0,15 mC wurden in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und die Lösung gleichmässig auf 22 Reagenzgläser verteilt. Die angeschnittenen Rhizome wurden in die vorbereiteten Reagenzgläser gestellt und diese so geneigt, dass die ganze Schnittfläche der Rhizome von der Lösung bedeckt war. Das während der Züchtung durch Resorption und Verdunstung verlorene Wasser wurde durch Knop'sche Lösung *) laufend ersetzt. Nach zwei Wochen trocknete man die Pflanzen unter einer Infrarotlampe bei einer Höchsttemperatur von 50° bis zur Gewichtskonstanz. Die Pflanzen ergaben 192,7 g Trockenmaterial, das anschliessend in einem Mixer "Guisto" pulverisiert wurde. Das Trockenmaterial extrahierte man in einem Soxhlet während je vier Tagen mit Petroläther (Sdp. 50 - 80°), Aether und Aceton. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels erhielt man aus dem Petrolätherextrakt 4,2 g (2,18 %) eines grünen körnigen Rückstandes, aus dem Aetherextrakt 4,5 g (2,34 %) und aus dem Acetonextrakt 8,915 g (4,6 %) eines grünen Oels. Die weitere Aufarbeitung dieser Extrakte wird bei der Isolierung der einzelnen Substanzen beschrieben.

2. Züchtung

Aus einem analogen Züchtungsversuch mit 15 Pflanzen in Gegenwart von 2,3 mg L-(Methyl-^{14}C)-Methionin mit einer Aktivität von 0,1 mC erhielt man 64,4 g Trockenmaterial, das wie oben beschrieben im Soxhlet extrahiert wurde. Dies lieferte 879 mg (1,4 %) Petrolätherextrakt (Aktivität: 12,3 imp/min. mg(Alu)), 553 mg (0,86 %) Aetherextrakt und 1,717 g (2,66 %) Acetonextrakt (Aktivität: 68 imp/min. mg(Alu)).

---

*) Die Knop'sche Lösung enthält in 1000 ml Wasser 1 g Calciumnitrat, 0,25 g Magnesiumsulfat, 0,25 g primäres Kaliumphosphat, 0,125 g Kaliumchlorid und eine Spur Eisen(III)-chlorid.

b) In Gegenwart von (2-^{14}C)-Mevalonsäure

30,9 mg (2-^{14}C)-Mevalolacton mit einer Aktivität von 3,3 µC/mg wurden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und unter Zugabe von 6 ml 0,05N Natriumhydroxydlösung während 20 Min. auf 60° erhitzt. Die Lösung des Natriummevalonats wurde nach dem Erkalten auf 50 ml verdünnt und wie oben beschrieben zur Züchtung von 10 frischen Menyanthespflanzen verwendet. Das daraus gewonnene Trockenmaterial (23 g) lieferte 525 mg (2,3 %) Petrolätherextrakt (Aktivität: 125 imp/min. mg(Alu)); 396 mg (1,7 %) Aetherextrakt (Aktivität: 161 imp/min. mg(Alu)) und 1,251 g (5,4 %) Acetonextrakt (Aktivität: 96,1 imp/min. mg(Alu)).

Isolierung von markiertem α-Spinasterin (39)

Der aus dem ersten Züchtungsversuch mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin gewonnene Petrolätherextrakt (4,2 g) wurde mit einer Lösung von 13,6 g Natriumhydroxyd in 158 ml Aethanol während 3 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach Abschluss der Reaktion dampfte man 100 ml Aethanol im Vakuum aus dem Reaktionsgemisch ab, verdünnte den Rückstand mit 100 ml Wasser und nahm in Aether auf. Die übliche Aufarbeitung lieferte als unverseifbaren Neutralteil 2,790 g grünes zähes Oel, das an der 50-fachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Fluka, Akt. II) chromatographiert wurde. Mit dem Lösungsmittelgemisch Benzol-Aether 19:1 eluierte man 146 mg eines zähflüssigen gelben Oels, das beim Stehenlassen an der Luft langsam kristallisierte. Die rohe Substanz schmolz bei 140-149° und wies eine Aktivität von 29 imp/min. mg (Alu) auf. Mit Hilfe von Dünnschichtchromatogrammen im System Benzol-Essigester 1:1 konnte α-Spinasterin als eine der Hauptkomponenten identifiziert werden. Das Rohprodukt wurde massenspektrometrisch untersucht. Das Intensitätsverhältnis der Molekulargewichtspiks der Masse 414 und 412 verhielt sich wie 2:1. Man musste daraus schliessen, dass die rohe Substanz 60 - 70 % einer Dihydroverbindung enthielt.

Das Rohprodukt wurde zweimal aus Methylenchlorid-Methanol umkristallisiert. Dabei stieg der Smp. auf 160 - 162°, und das Produkt besass eine Aktivität von 22 imp/min. mg(Alu). Das Kristallisat (77 mg) wurde mit 146 mg inaktivem α-Spinasterin vom Smp. 166 - 168° verdünnt und die Mischung an der 50-fachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Fluka, Akt. II) chromatographiert. Mit Benzol-Aether 9:1 eluierte man 196 mg α-Spinasterin vom Smp. 164 - 169° und einer Aktivität von 5,9 imp/min. mg(Alu). Man verdünnte die Mutterlaugen (69 mg) mit 130 mg inaktivem

Material vom Smp. 166 - 168° und chromatographierte das Gemisch auf analoge Weise. Mit Benzol-Aether 9:1 eluierte man 148 mg α-Spinasterin vom Smp. 164 - 169° und einer Aktivität von 6,5 imp/min.mg(Alu). Die entsprechenden Fraktionen aus beiden Chromatogrammen wurden zusammengenommen und mit 334 mg inaktivem α-Spinasterin vom Smp. 166 - 168° verdünnt. Auf diese Weise erhielt man 678 mg Substanz vom Smp. 164 - 165° und einer Aktivität von 2,9 imp/min.mg(Alu). Diese Substanz wurde einmal aus Methylenchlorid-Methanol und einmal aus Pentan umkristallisiert. Man erhielt so ein Produkt vom Smp. 170 - 171° und einer Aktivität von 1,15 imp/min.mg(Alu). Beim weiteren Umkristallisieren sank sowohl Smp. als auch Aktivität. Für analytische Zwecke wurde eine Probe vom Smp. 169-170° während 24 Std. im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

$[\alpha]_D^{21} = 0,4 \pm 1,2^o$ (c = 4,8)

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Banden bei 3610, 1660, 1035, 975 und 845 cm^{-1}

NMR.-Spektrum: ($CDCl_3$) Signale bei $\delta = 0,55$ (s, 3H, $>C-CH_3$); 0,8 - 2,15 (Signalhaufen, 41 H); 3,33 - 3,83 (m, 1H, $>\underline{CH}-OH$); 5,0 - 5,2 (m, 3H, Vinylprotonen an C_7, C_{22} und C_{23}).

NMR.-Spektrum (angesäuert mit Trifluoressigsäure): ($CDCl_3$) neues Signal bei $\delta = 6,25$ (s); Signalhaufen zwischen $\delta = 0,8 - 2,15$ enthält nur noch 40 H.

Massenspektrum: Figur 1, S. 57.

Massenspektrum von Ergosterin (zum Vergleich): Figur 1, S. 57.

α-Spinasteron (43)

95 mg α-Spinasterin (Aktivität 2,9 imp/min.mg(Alu)) wurden in 10 ml Aceton gelöst und unter Eiskühlung tropfenweise mit 0,3 ml einer Chrom(VI)-oxyd-lösung (2,67 g Chrom(VI)-oxyd in 2,3 ml konz. Schwefelsäure, mit destilliertem Wasser verdünnt auf 10 ml) versetzt. Nach halbstündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde der Ueberschuss an Reagens mit Methanol zerstört. Die übliche Aufarbeitung zweier solcher Ansätze lieferte 209 mg eines gelben kristallinen Rohprodukts. Dieses wurde an der 50-fachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Woelm, Akt. II) chromatographiert. Mit Petroläther-Benzol 4:1 eluierte man 133 mg Kristalle. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methylenchlorid-Methanol erhielt man 33 mg Produkt mit dem Smp. 180° und einer konstanten Aktivität von 1,3 imp/min.mg(Alu), die sich auch bei weiterem wiederholten Kristallisieren nicht änderte. Zur Analyse

wurde eine Probe bei 120° im Hochvakuum sublimiert.

$[\alpha]_D^{20} = +30,8 \pm 3^0$ (c = 1,2)

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Banden bei 1705, 1665 und 975 cm^{-1}.

$C_{29}H_{46}O$				spez. Aktivität
	ber.	C 84,81 %	H 11,29 %	
	gef.	C 84,51 %	H 11,20 %	
		C 82,29 %	H 11,39 %	14,94 imp/sec. mMol CO_2
		C 85,34 %	H 11,31 %	15,05 imp/sec. mMol CO_2
		C 86,80 %	H 11,18 %	15,70 imp/sec. mMol CO_2
		C 86,89 %	H 11,19 %	15,80 imp/sec. mMol CO_2

NMR.-Spektrum: ($CDCl_3$) Signale bei $\delta = 0,56$ (s, 3H, $\geq C-CH_3$); 0,66 - 2,25 (Signalhaufen, 4OH); 5,0 - 5,23 (m, 3H, Vinylprotonen an C_7, C_{22} und C_{23}).

Massenspektrum: Figur 1, S. 57.

Ozonisation von α-Spinasterin

a) Reduktive Spaltung des Ozonids*)

203 mg α-Spinasterin (Smp. 166-168°) wurden in 50 ml Chloroform und 2 ml Methylenchlorid gelöst und bei -80° während 15 Min. ozonisiert (Ozongehalt des Sauerstoffstromes: 31 mg/Min.). Die tiefblaue Lösung wurde langsam auf Zimmertemperatur gebracht. Zur reduktiven Spaltung des Ozonids versetzte man mit 625 mg Zinkpulver und 5 ml Eisessig und rührte das Gemisch während 2 Std. bei Zimmertemperatur. Nach der üblichen Aufarbeitung mit Aether wurde das stark eingeengte Reaktionsgemisch einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Das Destillat wurde wiederum aufgearbeitet und der Aether durch eine Vigreuxkolonne bis auf ca. 2 ml abgedampft. Diese Lösung versetzte man mit 2 ml einer methanolischen Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin-hydrochlorid**) und liess das Gemisch 4 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Nach dem Absaugen des Lösungsmittels erhielt man einen teils öligen, teils kristallinen Rückstand (83 mg), der in Dünnschichtchromatogrammen im System Benzol-Essigester 1:1 neben 2,4-Dinitrophenylhydrazin 2 Haupt-

*) Dieser Versuch wurde nur mit inaktivem Material durchgeführt.

**) 2,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin gelöst in 200 ml Methanol und 8 ml konz. Salzsäure.

flecken zeigte. Das Rohprodukt wurde nach der Methode von Roberts und Green[148] an der 3000-fachen Menge eines 2:1 Gemisches von Silicagel-Celite aufgetrennt. Mit Ligroin-Aether 19:1 erhielt man 35 mg eines kristallinen 2,4-Dinitrophenylhydrazons vom Smp. 113°. Durch zweimaliges Umkristallisieren stieg der Smp. auf 119° (Literaturwert[86] 120°). Zur Analyse sublimierte man eine Probe im Hochvakuum bei 80 - 90°.

$C_{13}H_{18}O_4N_4$	ber.	C 53,05%	H 6,16%	N 19,04%
	gef.	C 53,21%	H 6,45%	N 18,90%

Es liegt das 2,4-Dinitrophenylhydrazon von Aethylisopropylacetaldehyd vor.

b) Oxydative Spaltung des Ozonids[87]

201 mg aktives α-Spinasterin (2,9 imp/min.mg(Alu)) wurden in 30 ml Methylenchlorid gelöst und während 15 Min. bei -80° ozonisiert. Der Ozongehalt des Sauerstoffstromes betrug 38 mg/Min. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Gemisch langsam auf Zimmertemperatur gebracht und das Lösungsmittel unter leichtem Erwärmen am Vakuum abgesaugt. Das Ozonid erstarrte zu einer glasartigen Masse. Zur Spaltung erwärmte man mit 1 g frischem, noch feuchtem Silberoxyd, 3,5 ml Wasser und 3 ml 10-proz. Natronlauge während 4 Std. in einem Oelbad von 85 - 95°. Nach dem Ansäuern mit 3 ml konz. Schwefelsäure wurde das Gemisch einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Der Verbrauch an 0,1N Natronlauge bei der Titration des Destillats (85 ml) gegen Phenolphthalein betrug 4,6 ml (94% der Theorie). Aus der wässrigen Lösung wurden die sauren Komponenten mit Pentan auf die übliche Art extrahiert und nach dem Einengen der Pentanlösung auf ca. 2 ml mit 15 ml Diazomethanlösung verestert.

Anilid von Aethylisopropylessigsäure

Das dargestellte Estergemisch wurde über Natriumsulfat getrocknet und mit Magnesiumanilin[88] umgesetzt. Nach halbstündigem Kochen des Reaktionsgemisches zersetzte man den Ueberschuss an Magnesiumanilin unter Erwärmen mit 20 ml 2N Salzsäure. Führte man diese Zersetzung erst nach dem Erkalten durch, so färbte sich das Reaktionsgemisch tiefbraun bis schwarz. Nach der üblichen Aufarbeitung mit Aether erhielt man als Neutralteil 96 mg eines gelben Oels mit einer Aktivität von 1 imp/min.mg(Alu). Das Rohprodukt wurde an der 800-fachen Menge eines

2:1 Gemisches Silicagel-Celite chromatographiert. Mit Benzol-Aether 19:1 eluierte man 40 mg einer kristallinen leicht gelblichen Substanz. Die nach Dünnschichtchromatogrammen im System Benzol-Essigester 1:1 reinen Fraktionen (26 mg) wurden zweimal aus Pentan umkristallisiert bis zum Smp. 142-144° und zur konstanten Aktivität von 2,8 imp/min.mg(Alu). Die auf diese Weise erhaltenen 18 mg (18% der Theorie) Anilid verwendete man zum weiteren Abbau.

Zur Analyse wurde das Produkt eines zweiten Ansatzes aus 150 mg α-Spinasterin zweimal wie oben beschrieben chromatographiert und durch Umkristallisieren aus Pentan und Methylenchlorid-Methanol bis zur konstanten Aktivität (2,8 imp/min.mg(Alu)) gereinigt. Man erhielt 10 mg Anilid vom Smp. 140-142°, die zur Analyse im Hochvakuum bei 100° sublimiert wurden.

$[\alpha]_D^{20} = +21 \pm 4^{o}$ (c = 1,7)

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Banden bei 3420, 3320, 1675-1685, 1600, 1375 und 1390 cm^{-1}.

IR.-Spektrum (Nujol): u.a. Banden bei 3270, 1650, 1610 und 1380-1390 cm^{-1}.

$C_{13}H_{19}ON$					spez. Aktivität
	ber:	C 76,05%	H 9,33%	N 6,82%	
	gef:	C 76,00%	H 9,38%	N 6,81%	
		C 78,43%	H 9,56%		42,9 imp/sec.mMol CO_2
		C 75,40%	H 8,95%		38,7 imp/sec.mMol CO_2

Massenspektrum: Piks u.a. bei m/e = 205 (M); 190 (M-15); 187 (M-18); 176 (M-29); 172 (M-33); 163 (M-42); 148 (M-57); 134 (M-71); 120 (M-85); 113 (M-92); 106 (M-99); 97 (M-108); 93 (M-112); 85 (M-120); 77 (M-128); 69 (M-136).

Synthese von Aethylisopropylessigsäure[89] und Ueberführung der Säure ins Anilid

Aethylisopropylessigsäure wurde nach Crossley und Le Sueur[89] aus Aethylmalonsäurediäthylester und Isopropylbromid dargestellt. Die Säure wurde mit Diazomethan verestert und nach der oben angegebenen Vorschrift ins Anilid überführt. Nach dem Umkristallisieren aus Aether-Hexan erhielt man ein Anilid vom Smp. 119-120° in 81-proz. Ausbeute. Eine Probe dieses Anilids wurde bei 90° im Hochvakuum sublimiert.

IR.-Spektrum (Chloroform): deckungsgleich mit dem IR.-Spektrum des Anilids aus dem Abbau von α-Spinasterin.

IR.-Spektrum (Nujol): Kleine Unterschiede im Fingerprintgebiet.

$C_{13}H_{19}ON$				
	ber.	C 76,05%	H 9,33%	N 6,83%
	gef.	C 76,54%	H 9,25%	N 6,82%

Kuhn-Roth-Abbau des Anilids von Aethylisopropylessigsäure

Die durch den Abbau erhaltene Probe des Anilids (18 mg) wurde mit 152 mg synthetischem racemischem Material verdünnt. In 7 Ansätzen erhitzte man je 20 - 30 mg dieser Substanz mit je 4 ml Kuhn-Roth-Reagens *) im Phosphorsäurebad während 30 Min. auf 120 - 160°. Pro Ansatz wurden 160 ml Destillat aufgefangen und mit 0,01N Natriumhydroxydlösung in Portionen von 20 ml gegen Phenolphthalein titriert. Der Totalverbrauch an Natronlauge betrug 106 ml, was einer mittleren Ausbeute von 64 % entspricht. Die wässrigen Lösungen wurden vereinigt und im Vakuum bei einer Temperatur von 60 - 80° zur Trockene eingedampft.

Trennung von Propion- und Essigsäure

Die Trennung der Propion- und Essigsäure wurde nach der von Bueding und Yale [92] beschriebenen Methode durchgeführt unter Verwendung folgender Reagenzien:

Celite:	Johns-Manville 535, gewaschen mit peroxydfreiem Aether, im Vakuum über Calciumchlorid getrocknet.
Chloroform:	Mit destilliertem Wasser während 4 Std. percoliert zum Entfernen des allfällig vorhandenen Methanols.
Phosphatpuffer:	pH = 3,5 ± 0,04; 4,9 ml 2N Phosphorsäure in 100 ml 2N primären Kaliumphosphat.

Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch mit der Pufferlösung äquilibriert (2 - 5 ml Puffer pro 100 ml Lösungsmittel).

1. Trennung

In eine Kolonne von 3 cm Durchmesser, die beim Ausfluss mit Glaswolle und einer Porzellanfilterplatte versehen war, legte man mit Puffer äquilibriertes Chloroform vor. 40 g Celite und 24 ml Phosphatpuffer, im Mörser gut vermengt, wurden in mit Puffer behandeltem Chloroform aufgeschlämmt und in kleinen Portionen in die Kolonne gespült. Das Celite presste man dabei am Anfang mit einem in die Säule passenden Glasstempel und später unter Anwendung von Druck gut zusammen.

---

*) Kuhn-Roth-Reagens: 67 g Chrom(VI)-oxyd gelöst in 125 ml konz. Schwefelsäure und 500 ml Wasser [90].

Die Höhe der Säulen betrug 15 cm. Das durch den Kuhn-Roth-Abbau erhaltene Gemisch von Natriumpropionat und -acetat spülte man in drei gleichen Teilen je in ein Zentrifugenglas und engte die Lösungen bis auf ca. 0,5 ml ein. Die Freisetzung[149] der Säuren bewirkte man durch Zugabe von 3-4 g pulverisiertem wasserfreiem Kaliumhydrogensulfat, wobei ein Brei entstand, aus dem die freien Säuren mit viermal je 4 ml Chloroform ausgewaschen und auf die vorbereiteten Säulen aufgetragen wurden. Es wurden Fraktionen von 20 ml eluiert (Lösungsmittel: mit Puffer behandeltes Chloroform), das Eluat mit 20 ml Wasser verdünnt und unter starkem Rühren mit 0,01N Natriumhydroxydlösung gegen Bromthymolblau titriert. Nach dem Absinken des Titrationswertes auf den Blindwert (0,13 ml 0,01N NaOH pro 20 ml Eluat) wurde das Lösungsmittel gewechselt und mit äquilibriertem Chloroform-n-Butanol 19:1 weiter eluiert. Die Titration führte man wie oben beschrieben durch. Die Gesamtmenge des Eluats pro Trennung betrug in den drei ausgeführten Versuchen zwischen 400 und 600 ml. Die Ausbeuten lagen zwischen 83,4 und 94%, die durchschnittliche Ausbeute betrug 87,5%. Mit Chloroform wurden total 0,3085 mMol Propionsäure, mit Chloroform-n-Butanol 19:1 0,6177 mMol Essigsäure eluiert. Nach dem Abtrennen des Chloroforms dampfte man die wässrigen Phasen im Vakuum ein. Die einzelnen Propion- und Essigsäurefraktionen wurden papierchromatographisch auf ihre Reinheit untersucht. (Allgemeine Vorschrift siehe Seite 68). Dabei erwiesen sich die Essigsäure enthaltenden Fraktionen als rein, während die "Propionsäurefraktionen" eine ca. 10-proz. Verunreinigung an Essigsäure enthielten. Die Propionsäure wurde deshalb einer zweiten Trennung unterworfen.

2. Trennung

Je eine Hälfte der noch leicht verunreinigten "Propionsäurefraktionen" (0,3085 mMol) des ersten Chromatographieansatzes wurden einer zweiten Trennung nach der gleichen Methode unterzogen. Man verwendete Kolonnen mit einem Durchmesser von 12 mm, in welchen 8 g Celite (imprägniert mit 4,8 ml Phosphatpuffer) eine Säule von 13,5 cm Höhe ergaben. Der Titrationsblindwert für eine Säule dieser Grösse betrug 0,07 ml 0,01 N Natriumhydroxyd pro 20 ml Eluat. Zum Auftragen der freien Säuren verwendete man viermal 2 ml Chloroform, das man nach dem Auswaschen des Kaliumhydrogensulfatbreies mit je 10 ml mit Puffer behandeltem Chloroform verdünnte. Es wurden wiederum Fraktionen von 20 ml auf die oben beschriebene Art titriert. Die Gesamtmenge des Eluats betrug 200 bis 220 ml. Mit Chloroform

wurden aus beiden Chromatogrammen total 0,25 mMol Propionsäure, mit Chloroform-n-Butanol 19:1 0,0456 mMol Essigsäure eluiert. Die Totalausbeute betrug 95 %, das Verhältnis von Propion- zu Essigsäure 11:2 (berechnet aus den Titrationswerten). Die Vor-, Haupt- und Nachfraktionen wurden vereinigt und wiederum papierchromatographisch untersucht. Dabei erwies sich eine Propionsäurefraktion (0,0835 mMol) papierchromatographisch als rein; die restlichen Fraktionen wurden einer 3. Trennung unterworfen.

3. Trennung

Die verbleibenden 0,1546 mMol Propionsäure wurden an einer auf die gleiche Art und Weise bereiteten Celitesäule, wie sie bei der zweiten Trennung verwendet worden war, zum dritten Mal getrennt. Mit 180 ml Lösungsmittel wurden 0,1267 mMol Säure eluiert, was einer Ausbeute von 82 % entspricht. Das Verhältnis von Propion- zu Essigsäure betrug hier 22:1. Die Papierchromatogramme der einzelnen Fraktionen zeigten keine Verunreinigungen von Essigsäure mehr (Reinheit der Propionsäure 97,5 - 98,5 %).

Papierchromatographische Untersuchung von Propion- und Essigsäure[93) 94)]

Von den zu untersuchenden Fraktionen wurde je 0,1 ml einer wässrigen Lösung, 2 mg des entsprechenden Salzes pro 1 ml Lösung enthaltend, auf eine Säule (0,5 x 8 cm) von "Dowex 50 W" aufgetragen, die vorher mit destilliertem Wasser solange neutral gewaschen wurde, bis 1 Tropfen 0,01N Natriumhydroxyd zur Titration von 5 ml Eluat gegen Phenolphthalein genügte. Man liess die aufgetragene Lösung einsickern und spülte dreimal mit je 1 ml und einmal mit 5 ml destilliertem Wasser nach. Das Filtrat (8 ml) wurde mit 4 ml einer 20-proz. Lösung von Aethylamin in n-Butanol versetzt und die Lösung im Vakuum bei 30 - 40° auf 1 - 2 Tropfen eingeengt. Diese wurden als drei Flecken im Verhältnis 1:2:3 mit einer Kapillare auf ein Papier "Whatman No. 1" aufgetragen. Mit n-Butanol (gesättigt mit Wasser), das 0,025 Mol/Lt. Aethylamin enthielt, wurde nachgespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls aufgetragen. Man verwendete die von Lindquist und Storgards[94)] beschriebenen Phasen und Standardlösungen (0,2N). Als mobile Phase diente mit Wasser gesättigtes n-Butanol. Die in der Wanne vorhandene Dampfphase bestand aus mit Wasser gesättigtem Butanol mit 0,025 Mol/Lt. Aethylamin. Es wurde absteigend chromatographiert bei einer Laufzeit von 6 - 8 Std. Nach dem Entwickeln der Chromato-

gramme wurden diese während einer Stunde bei Zimmertemperatur getrocknet und anschliessend mit einer Lösung von 2,5 g Bromkresolgrün in 500 ml Aethanol und 500 ml n-Butanol besprüht. Die besten Resultate erzielte man mit Mengen von 50-60 γ Säure, wobei noch 3-5 γ sichtbar waren. Bei zu hohen Konzentrationen neigten die Flecken zu Schwanzbildung. Durch Auftragen von verschieden grossen Mengen konnten die relativen Verunreinigung der einzelnen Fraktionen abgeschätzt werden.

Abbau von Essigsäure nach Schmidt[95]

Allgemeine Vorschrift

Der Abbau von Essigsäure wurde in Anlehnung an die von Britt[95] ausgearbeiteten Reaktionsfolgen unter Verwendung der von ihm beschriebenen Apparatur durchgeführt. Im folgenden Abschnitt werden diese Reaktionen kurz beschrieben. Die in den einzelnen durchgeführten Abbauversuchen gefundenen Resultate sind in Tabelle 7 (S. 70) zusammengestellt.

0,2 - 0,3 mMol Natriumacetat wurden in möglichst wenig Methanol gelöst und in einen Schenkel des zweischenkligen Reaktionsgefässes eingefüllt. Nach dem Abblasen des Lösungsmittels mit Stickstoff unter gleichzeitigem Erwärmen im Wasserbad fügte man 40 - 50 mg Natriumazid ("Fluka", puriss.) zum Rückstand und gab in den zweiten Schenkel 0,9 - 1,2 g Polyphosphorsäure[107] [108]. Anschliessend evakuierte man und liess die Polyphosphorsäure zum Natriumacetat und -azid fliessen. Das Gemisch wurde während 2 Std. im Wasserbade auf 80° erhitzt. Im Verlauf dieser Zeit entstand eine vollkommen klare Lösung von hoher Viskosität. Nach dem Erkalten des Reaktionsgemisches wurde das Kohlendioxyd unter Vakuum im abgeschlossenen System durch Erwärmen der Lösung (ca. 50°, 10 Min.) freigesetzt und in 10 ml einer vorgewärmten gesättigten Bariumhydroxydlösung[95] aufgefangen. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung dekantiert. Das Bariumcarbonat wurde je drei Mal mit quarzdestilliertem Wasser und Methanol aufgeschlämmt und zentrifugiert. Die letzte Zentrifugation führte man in einer Ultrazentrifuge durch. Als Gefäss diente ein Kupferrohr, dessen unteres Ende durch ein tariertes Aluminiumschälchen abgeschlossen war, wie sie zur Messung der radioaktiven Präparate verwendet wurden. Nach dem Dekantieren des Methanols wurde das Bariumcarbonat unter einer Infrarotlampe getrocknet und gewogen.

Die im Reaktionsgefäss zurückbleibende viskose Flüssigkeit wurde mit 5 ml carbonatfreier 20-proz. Natriumhydroxydlösung alkalisch gemacht und das Wasser

zusammen mit dem entstandenen Methylamin bis zur beginnenden Kristallisation des Reaktionsgemisches abdestilliert. Man fing das Destillat in einem Gefäss mit 2 ml 0,5N Schwefelsäure auf. Das ganze System war durch ein mit Natronasbest gefülltes Chlorcalciumrohr gegen das Kohlendioxyd der Luft abgeschlossen. Das Methylamin wurde mit 3 ml 10-proz. wässriger Kaliumpermanganatlösung und 2 ml 1N Natronlauge während 60 Min. im Wasserbad bei 80° oxydiert. Das System war wiederum durch ein mit Natronasbest gefülltes Chlorcalciumrohr gegen das Kohlendioxyd der Luft geschützt. Durch Zugabe von 5 ml 1N Schwefelsäure setzte man das Kohlendioxyd im evakuierten System aus der Oxydationslösung frei und fing es wiederum in gesättigter Bariumhydroxydlösung auf. Der Niederschlag wurde wie oben beschrieben, gewaschen und in ein Aluminiumplättchen zentrifugiert.

Abbau der markierten Essigsäure aus der Trennung

Man baute 0,24 mMol aus der Trennung erhaltenes Natriumacetat nach der oben beschriebenen allgemeinen Vorschrift ab. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Die Aktivität der Bariumcarbonatproben wurde zuerst direkt mit einem fensterlosen Durchflusszähler (Helium-Gas) mit einem "Tracerlab 1000 Scaler" als Verstärker gemessen. Die so bestimmten Werte sind mit Hilfe von Korrekturtabellen auf "unendliche Schichtdicke" umgerechnet. Nach der direkten Messung der Präparate setzte man das Kohlendioxyd durch Zugabe von Schwefelsäure frei und bestimmte seine spezifische Aktivität mit einem Proportionalzählrohr.

Tabelle 7

	Ausbeute an Bariumcarbonat		Aktivität	
	mg	%	imp/min. ∞	imp/sec. mMol CO_2
-COOH	33,3	71	13,9 ± 1,25	11,99
$-CH_3$	31	66	15,8 ± 1,4	11,33

Abbau der Propionsäure nach Schmidt [95) 96)]

Der Abbau der Carboxylgruppe der Propionsäure (0,19 mMol) wurde auf die gleiche Art und Weise wie bei der Essigsäure durchgeführt. Das entstandene Aethylamin destillierte man wie im Falle des Methylamins beim Abbau der Essigsäure nach Zugabe von 5 ml 10-proz. Natriumhydroxydlösung und fing das Destillat in 2 ml 0,5N Schwefelsäure auf. Diese Lösung wurde mit 3 ml 10-proz. Kaliumpermanganatlösung und 2 ml 1N Natronlauge wie oben beschrieben oxydiert. Nach Abschluss der Reaktion säuerte man das Gemisch mit 5 ml 1N Schwefelsäure an und unterwarf die saure Lösung in der Kuhn-Roth-Apparatur einer Wasserdampfdestillation. Das Destillat (130 ml) wurde mit 0,01N Natronlauge in Stickstoffatmosphäre gegen Phenolphthalein titriert. Der Verbrauch an Natronlauge betrug dabei 13,56 ml (71 %). Das Destillat wurde nach der Titration mit einer Lösung mit 0,0689 mMol inaktivem Natriumacetat *) verdünnt (Verdünnungsfaktor 1,5) und die vereinigten Lösungen im Vakuum zur Trockene eingedampft. Den Rückstand baute man wie oben beschrieben zu zwei Proben Bariumcarbonat ab. Die durch diesen Abbau erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Die Aktivität der Bariumcarbonatproben wurde zuerst direkt auf einem "Tracerlab 100 Scaler" und in einem fensterlosen Durchflusszähler (Helium-Strom) mit einem "Tracerlab 1000 Scaler" als Verstärker gemessen. Die auf diese Art bestimmten Werte sind mit Hilfe von Korrekturtabellen auf "unendliche Schichtdicke" umgerechnet. Nach der direkten Messung der Präparate setzte man durch Zugabe von Schwefelsäure das Kohlendioxyd frei und bestimmte die spezifische Aktivität des Gases in einem Proportionalzählrohr.

Tabelle 8

	Menge Bariumcarbonat		Aktivität		
	mg	%	imp/min. ∞ "100 Scaler"	imp/min. ∞ "1000 Scaler"	imp/sec. mMol CO_2
-COOH	22,6	60	-	-	0,536
$-CH_2$	24,8	62	2,45	23,28 ± 1,4	15,54
$-CH_3$	21,4	53,5	2,28	23,76 ± 1,4	15,8 **)

*) Mittlerer Titrationswert von 20 ml einer verdünnten Essigsäurelösung.
**) Infolge eines experimentellen Missgeschickes konnte dieser Wert nicht im Proportionalzählrohr gemessen werden. Das angegebene Resultat berechnet sich aus den Ergebnissen der direkten Messung.

Isolierung von Betulinsäuremethylester (40)

Der aus dem ersten Züchtungsversuch mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin gewonnene Aetherextrakt (4,5 g, vgl. S. 60) wurde zweimal mit je 250 ml Aether ausgekocht. Die ätherischen, dunkelgrünen Lösungen trennte man vom unlöslichen Rückstand ab, engte auf 50 ml ein und veresterte mit je 100 ml Diazomethanlösung. Nach dem Absaugen des überschüssigen Diazomethans und des Lösungsmittels wurden die beiden Rohprodukte (1,651 g) je an der 50-fachen Menge Aluminiumoxyd (Woelm, Akt. II) chromatographiert. Mit Benzol und Benzol-Aether 19:1 eluierte man total 192 mg einer farblosen, kristallinen Substanz. Durch zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol erhielt man 49 mg Betulinsäuremethylester vom Smp. 222-224° und einer konstanten Aktivität von 1,65 imp/min. mg(Alu). Zur Analyse sublimierte man eine Probe zweimal im Hochvakuum bei 200°, Smp. 228°.

$C_{31}H_{50}O_3$				spez. Aktivität
	ber.	C 79,09 %	H 10,71 %	
	gef.	C 77,64 %	H 10,29 %	24,3 imp/sec. mMol CO_2
		C 76,88 %	H 10,00 %	24,9 imp/sec. mMol CO_2

O-Acetyl-Derivat von Betulinsäuremethylester (41)

Eine Mutterlauge aus der Kristallisation von Betulinsäuremethylester (117 mg) wurde mit 5 ml Pyridin und 5 ml Acetanhydrid über Nacht stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch befreite man am Vakuum vom Lösungsmittel. Der gelbliche ölige Rückstand zeigte bei dünnschichtchromatographischen Untersuchungen im System Benzol-Essigester 1:4 2 Flecken. Die Reinigung des O-Acetyl-Derivats von Betulinsäuremethylester wurde durch Chromatographie an Silicagel durchgeführt. Die rohe Substanz trug man mit Benzol-Essigester 1:4 auf eine Silicagelkolonne (1,8 x 35 cm) auf und eluierte mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch. Es wurden Fraktionen von je 2 ml aufgefangen und dünnschichtchromatographisch wiederum im gleichen Lösungsmittelsystem untersucht. Nach 38 leeren Fraktionen eluierte man innerhalb von 5 Fraktionen reines O-Acetyl-Derivat von Betulinsäuremethylester. Nach einer Umkristallisation aus Methanol erhielt man 75 mg Acetat vom Smp. 200°. Das Produkt wurde bei 160° im Hochvakuum sublimiert und ein zweites Mal aus Methanol umkristallisiert. Man erhielt auf diese Art und Weise Kristalle vom Smp. 200-202° und einer konstanten Aktivität von 1,55 imp/min. mg(Alu). Zur Analyse wurde eine Probe im Hochvakuum bei 160° sublimiert.

$C_{33}H_{52}O_4$				spez. Aktivität
	ber.	C 77,29 %	H 10,22 %	
	gef.	C 76,91 %	H 10,08 %	23,4 imp/sec. mMol CO_2
		C 77,49 %	H 10,09 %	24,3 imp/sec. mMol CO_2

Reduktion des O-Acetyl-Derivats (41) mit Lithiumaluminiumhydrid

Zu einer Suspension von 48 mg Lithiumaluminiumhydrid in 2 ml absolutem Aether tropfte man eine Lösung von 32 mg O-Acetyl-Derivat von Betulinsäuremethylester (Smp. 200 - 202°) in 2 ml Dioxan. Nach 16-stündigem Kochen unter Rückfluss zerstörte man das überschüssige Reagens mit Wasser und arbeitete das Gemisch auf die übliche Art mit Aether auf. Den Neutralteil (38 mg) reinigte man durch Chromatographie an einer Silicagelkolonne (1,2 x 35 cm). Eluierung mit Benzol-Essigester 1:1 ergab nach 38 ml innerhalb 6 ml 22 mg reines Betulin (42) vom Smp. 254° und einer Aktivität von 1,9 imp/min. mg(Alu). Zur Analyse wurde eine Probe im Hochvakuum bei 160° sublimiert.

$C_{30}H_{50}O_2$				spez. Aktivität
	ber.	C 81,39 %	H 11,39 %	
	gef.	C 80,39 %	H 11,13 %	25,6 imp/sec. mMol CO_2
		C 80,45 %	H 10,97 %	25,9 imp/sec. mMol CO_2

Isolierung von Pentaacetylloganin (56)

Getrocknete Stengel, Blätter und Rhizome von Menyanthes trifoliata wurden pulverisiert und hintereinander mit Petroläther (Sdp. 50-80°), Aether und Aceton je 4 Tage im Soxhlet extrahiert. Je nach Pflanzenmaterial betrug die Ausbeute an Petrolätherextrakt zwischen 1,4 und 2,3 %, an Aetherextrakt 0,8 - 2,3 % und an Acetonextrakt zwischen 2,5 und 5,4 % des Trockenmaterials.

41 g des auf diese Weise gewonnenen Acetonextrakts wurden mit Benzol verschiedene Male am Vakuum zur Trockene eingedampft. Den dunkelgrünen Rückstand liess man mit 200 ml Acetanhydrid und 200 ml Pyridin über Nacht stehen und entfernte darauf die Lösungsmittel am Vakuum. Man erhielt 70 g eines grünen klebrigen Oels. Dieses wurde an der vierfachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Fluka, Akt. II) filtriert. Mit Benzol eluierte man 49,339 g eines dunkelgrünen Oels. Dieses unterwarf man einer zweiten Chromatographie an der zehnfachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Fluka, Akt. II). Mit Benzol und Benzol-Aethergemischen 9:1 und 4:1

eluierte man 27,685 g einer leicht gelblichen, teilweise kristallinen Substanz. Durch zweimaliges Umkristallisieren aus absolutem Aethanol konnten 10,759 g Pentaacetylloganin vom Smp. 139 - 140° gewonnen werden. Dies entspricht einem Gehalt von 17% Loganin im Rohextrakt. Zur Analyse wurde eine Probe während 14 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

$[\alpha]_D^{20} = -68,7 \pm 3^o$ (c = 1,78).

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Banden bei 1740-1760, 1710 und 1640 cm^{-1}.

UV.-Spektrum: λ_{max} = 235 mμ (log ε = 4,1)

$C_{27}H_{36}O_{15}$ ber. C 53,98% H 6,05%
gef. C 54,34% H 5,64%

NMR.-Spektrum: ($CDCl_3$) Signale bei δ = 1,05 (d, J = 7 Hz, 3H, >CH-CH_3); 1,2 - 1,8 (m, 2H); 1,83 - 2,06 (m, 16H); 2,2 (m, 1H); 2,3 - 3,15 (m, 2H); 3,67 (s, 3H, -$COOCH_3$); 4,08 - 4,3 (m, 2H, >CH-CH_2-$OCOCH_2$); 4,75 - 5,25 (m, 6H); 7,25 (s, 1H, >C=CH-O-).

Bromhydrin (57) von Pentaacetylloganin

144 mg Pentaacetylloganin wurden in 4 ml eines Gemisches von Tetrahydrofuran-Wasser 1:1 gelöst und die Lösung tropfenweise mit einer solchen von 60 mg Brom in 0,6 ml Tetrahydrofuran-Wasser 1:1 bei Zimmertemperatur und unter starkem Rühren versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 3,5 Std. nahm man in viel Aether auf. Die braune ätherische Lösung wurde durch Waschen mit 10-proz. Natriumbisulfitlösung vom überschüssigen Brom befreit, dann mit 2N Natriumbicarbonatlösung und anschliessend mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und der Entfernung des Aethers erhielt man 155 mg eines leicht gelblichen Oels, das beim Bespritzen mit Hexan kristallisierte. Sechsmaliges Umkristallisieren aus Aether-Hexan lieferte 32 mg (19%) farblose Kristalle vom Smp. 157°. Aus den Mutterlaugen konnten noch weitere 17 mg (10%) Kristalle vom Smp. 149 - 151° gewonnen werden. Die totale Ausbeute betrug somit 29%. Die Mutterlaugen zersetzten sich auch in der Kälte unter Abspaltung von Brom. Zur Analyse wurde das Präparat während 48 Std. im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

$[\alpha]_D^{21} = -38 \pm 4^o$ (c = 1,923)

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Banden bei 3550 und 1735-1760 cm^{-1}.

IR.-Spektrum (Nujol): u.a. Banden bei 3460, 1745-1755, 1730 und 1715 cm^{-1}.

UV.-Spektrum: keine Absorptionsbanden zwischen 210 - 400 mμ.

$C_{27}H_{37}O_{16}Br$ ber. C 46,49% H 5,35% Br 11,46%
gef. C 46,41% H 5,43% Br 10,80%

Oxydation des Bromhydrins (57)

1,007 g Pentaacetylloganin wurden wie oben beschrieben in 38 ml Tetrahydrofuran-Wasser 1:1 mit 420 mg Brom in 4 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhielt man 1,206 g rohes Bromhydrin, das in 10 ml Eisessig gelöst und mit 2,9 g einer 5-proz. Lösung von Chrom(VI)-oxyd in Eisessig versetzt wurde. Nach einer Reaktionszeit von 24 Std. fügte man noch weitere 2,864 g Oxydationslösung zum grüngefärbten Gemisch und liess wiederum während 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Das überschüssige Reagens wurde mit Methanol zerstört, das Gemisch auf Eis gegossen und die wässrige Lösung mit Aether extrahiert. Die übliche Aufarbeitung lieferte 1,037 g eines Oels, das beim Bespritzen mit Aether sofort kristallisierte. Nach dreimaligem Umkristallisieren erhielt man 298 mg (26%) Kristalle vom Smp. 173°. Durch Kristallisation der Mutterlaugen konnten weitere 310 mg (27%) Substanz (Smp. 170°) gewonnen werden. Die restlichen Mutterlaugen zersetzten sich auch in der Kälte unter Abspaltung von Brom. Zur Analyse wurde eine Probe vom Smp. 173° 48 Std. im Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

$[\alpha]_D^{18} = -31,4 \pm 3^o$ (c = 1,568).

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Bande bei 1735-1760 cm^{-1}.

$C_{27}H_{35}O_{16}Br$ ber. C 46,63% H 5,07% Br 11,49%
gef. C 46,85% H 5,13% Br 11,41%

NMR.-Spektrum: ($CDCl_3$) Signale bei δ = 1,03 (d, J = 7Hz, 3H, $>CH-CH_3$); 1,16 - 2,0 (m, 2H); 2 - 2,1 (m, 15H, $-O-CO-\underline{CH_3}$); 2,16 (s, 1H); 2,2-3,8 (m, 3H); 3,86 (s, 3H, $-COOCH_3$); 4,12 (d, J = 4Hz, 2H, $>CH-\underline{CH_2}-OCOCH_3$); 4,9 - 5,25 (m, 5H); 5,89 (d, J = 6Hz, 1H).

Behandlung des Bromlactons (58) mit Zink und Eisessig

928 mg Bromlacton (58) wurden in 50 ml 96-proz. Essigsäure gelöst und mit 2,070 g Zinkstaub über Nacht stehen gelassen. Nach Abschluss der Reaktion filtrierte man vom Unlöslichen ab und goss das Filtrat auf Eis. Die übliche Aufarbeitung mit Aether lieferte 1 g eines öligen Neutralteils, der beim Stehenlassen an der Luft kristallisierte. Durch Umkristallisation aus Aceton-Hexan konnten 363 mg (41 %) plättchenförmige Kristalle vom Smp. 175° gewonnen werden. Zur Analyse wurde eine Probe im Hochvakuum bei Zimmertemperatur während 48 Std. getrocknet.

$[\alpha]_D^{21} = -38,4 \pm 3^o$ (c = 4,95).

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Bande bei 1730-1770 cm^{-1}.

IR.-Spektrum (Nujol): u.a. Banden bei 1715 und 1740-1760 cm^{-1}.

$C_{27}H_{36}O_{16}$ ber. C 52,59 % H 5,89 %
gef. C 52,57 % H 5,95 %

NMR.-Spektrum: ($CDCl_3$) Signale bei δ = 1,07 (d, J = 7Hz, 3H, $>CH-CH_3$); 1,16 - 1,92 (m, 2H); 2 - 2,1 (m, 15H, $-O-CO-CH_3$); 2,1 - 3,7 (m, 4H); 3,82 (s, 3H, $-COOCH_3$); 3,82 - 4,16 (m, 1H); 4,85 - 5,55 (m, 6H); 4,22 (d, J = 4Hz, 2H, $>CH-CH_2-OCOCH_3$).

Es liegt ein Lacton der Struktur (59) vor.

Weiteres Umkristallisieren der Mutterlaugen aus Aether-Hexan lieferte 48 mg (5,5 %) filzige Kristalle vom Smp. 149 - 152°. Der Mischschmelzpunkt der beiden Proben lag bei 154°. Das dünnschichtchromatographische Verhalten beider Substanzen in verschiedenen Lösungsmittelsystemen war identisch. Zur Analyse wurde eine Probe im Hochvakuum bei Zimmertemperatur während 48 Std. getrocknet.

$[\alpha]_D^{20} = +9,12 \pm 5^o$ (c = 3,46)

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Bande bei 1730 - 1770 cm^{-1}. Identisch mit dem IR.-Spektrum des Hauptprodukts vom Smp. 175°.

IR.-Spektrum (Nujol): u.a. Bande bei 1730-1770 cm^{-1}.

$C_{27}H_{36}O_{16}$ ber. C 52,59 % H 5,89 %
gef. C 52,52 % H 5,82 %

NMR.-Spektrum: ($CDCl_3$) Signale bei δ = 1,06 (d, J = 7Hz, 3H, $>CH-CH_3$); 1,16 - 1,93 (m, 2H); 1,95 - 2,1 (m, 15H, $-OCOCH_3$); 2,16 - 3,7 (m, 4H); 3,78 (s, 3H, $-COOCH_3$); 3,95 (d, J = 7 Hz, 1H); 4,23 (m, 2H, $>CH-CH_2-OCOCH_3$); 4,93 - 5,3 (m, 5H); 5,44 (s, 1H).

Es liegen zwei am Kohlenstoffatom 4 epimere Verbindungen (59) vor.

Verseifung des Lactons (59)

642 mg Substanz (Smp. 175°) wurden in 14 ml frisch destilliertem Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 6 g carbonatfreiem Kaliumhydroxyd in 14 ml Wasser versetzt, wobei sich das Gemisch hellbraun färbte. Man kochte in Stickstoffatmosphäre unter Rückfluss während 3 Std., verdünnte anschliessend mit 100 ml Wasser und schüttelte mit Aether aus. Der basische wässrige Auszug wurde mit konz. Schwefelsäure auf einen pH von 2-3 gebracht, mit Kochsalz gesättigt und im Kutscher-Steudel-Apparat während 64 Std. mit Aether extrahiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels erhielt man 283 mg eines dunkelbraunen Oels. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung im System Benzol-Essigester-Methanol 8:8:1 zeigte beim Entwickeln mit Joddämpfen neben dunkelbraunen Verunreinigungen einen Hauptfleck mit einem R_f-Wert von ca. 0,5. Der dunkelbraune Rückstand wurde auf eine Silicagelkolonne (2,5 x 35 cm) aufgetragen und mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch entwickelt, wie es für die Dünnschichtchromatogramme verwendet wurde. Nachdem die Säule mit 200 ml Lösungsmittel gewaschen worden war, fing man Fraktionen von je 2 ml auf und untersuchte sie wiederum mit Hilfe von Dünnschichtchromatogrammen. Die Fraktionen 18-25 enthielten 44 mg (25%) einer kristallinen Substanz vom Smp. 114-116°, welche zur weiteren Reinigung an der 100-fachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Woelm, Akt. II) chromatographiert wurde. Die Benzoleluate (19 mg) besassen nach der Sublimation im Hochvakuum bei 65° einen konstanten Smp. von 122-124°. Proben gleicher Reinheit erhielt man auch beim zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Hexan der an Silicagel gereinigten Substanz.

$[\alpha]_D^{20} = +83 \pm 5^\circ$ (c = 1,41).

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Bande bei 1730-1760 cm^{-1}.

$C_9H_{12}O_3$	ber.	C 64,27%	H 7,19%
	gef.	C 64,61%	H 7,35%

NMR.-Spektrum: ($CDCl_3$) Signale bei δ = 1,05 - 1,33 (m, 4H); 2,16 - 3,05 (m, 6H); 4,2 - 4,6 (m, 2H, $>CH-CH_2-O-$).

NMR.-Spektrum (aufgenommen bei 100 MHz): ($CDCl_3$) Signal bei δ = 4,2 - 4,6 aufgelöst in 8 Linien, δ = 4,41 (2q, J_{AX} = 5Hz, J_{BX} = 4Hz, J_{AB} = 13Hz, 2H, $>CH-CH_2-O-$).

Massenspektrum: Piks u.a. bei m/e = 168 (M); 153 (M-15); 140 (M-28); 127 (M-41); 113 (M-55); 109 (M-59); 96 (M-72), 81 (M-87); 68 (M-100); 55 (M-113).

Es handelt sich bei dieser Verbindung um das Ketolacton (60). Die Verseifung der am Kohlenstoffatom 4 epimeren Verbindung vom Smp. 149 - 152° ergab in analoger Ausbeute die gleiche Verbindung.

Ketodimethylester (62)

Durch eine Lösung von 411 mg Pentaacetylloganin in 30 ml Methylenchlorid leitete man während 15 Min. bei - 80° einen ozonhaltigen Sauerstoffstrom (31 mg Ozon/Min.). Die tiefblaue Lösung wurde innerhalb 30 Min. auf Zimmertemperatur gebracht und das Lösungsmittel unter leichtem Erwärmen im Vakuum abgesaugt. Den Rückstand erhitzte man nach Zugabe von 1,3 g frisch gefälltem Silberoxyd, 3 ml 10-proz. Natronlauge und 3,5 ml dest. Wasser während 4 Std. auf 80-90°. Drei solche Ansätze wurden vereinigt, mit 3 ml konz. Schwefelsäure angesäuert und das Gemisch einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Das Destillat (30 ml) titrierte man mit 0,05N Natriumhydroxydlösung gegen Phenolphthalein, wobei 59 ml Natronlauge verbraucht wurden. Nach dem Eindampfen des Wassers im Vakuum wurde der Rückstand papierchromatographisch (vgl. S. 68) untersucht, wobei nur Essigsäure nachgewiesen werden konnte.

Der saure wässrige Destillationsrückstand wurde mit 10-proz. Natronlauge auf einen pH von 9-10 gebracht. Die übliche Aufarbeitung dieser basischen Lösung lieferte 67 mg eines neutralen nicht näher untersuchten Oels. Die basische Lösung extrahierte man nach dem Ansäuern auf pH 2-3 mit konz. Schwefelsäure mit Aether während 16 Std. im Kutscher-Steudel-Apparat und erhielt nach dem Absaugen des Lösungsmittels als sauren Anteil 271 mg (72 %) eines gelben Oels. Dieses wurde in 14 ml Aether gelöst und mit 100 ml einer ätherischen Diazomethanlösung verestert. Nach dem Absaugen des überschüssigen Diazomethans und des Lösungsmittels erhielt man 309 mg eines gelben Oels, welches wahrscheinlich hauptsächlich aus Hydroxymethylesternbestand. Das IR.-Absorptionsspektrum zeigte Banden bei 3570, 3450 und 1725 cm^{-1}. Gaschromatographische Untersuchungen ergaben auf der apolaren Kolonne *) Signale bei I^{A}_{210} = 1392 und 1501 und auf der polaren Kolonne *) bei I^{P}_{210} = 2118 und 2218.

---

*) I^{A}_{t} = Retentionsindex an der apolaren stationären Phase Apiezon-L auf Celite bei der Temperatur t.

I^{P}_{t} = Retentionsindex an der polaren stationären Phase Emulphor-O auf Celite (vgl. Kováts[158]).

140 mg dieses rohen Hydroxymethylesters wurden in 10 ml Aceton gelöst und unter Eiskühlung tropfenweise mit 0,4 ml Chrom(VI)-oxyd-lösung (2,67 g Chrom(VI)-oxyd gelöst in 2,3 ml konz. Schwefelsäure, mit dest. Wasser verdünnt auf 10 ml) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Min. zerstörte man den Ueberschuss an Reagens mit Methanol und verdünnte das Reaktionsgemisch mit 150 ml Wasser. Die übliche Aufarbeitung zweier solcher Ansätze ergab als Neutralteil 244 mg eines gelben Oels, welches zweimal im Kugelrohr bei einer Temperatur von 80 - 120° und einem Druck von 0,001 Torr destilliert wurde. Man erhielt auf diese Weise 165 mg eines farblosen Oels.

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Bande bei 1740 cm^{-1}.

Gaschromatogramm: I^{A}_{210} = 1405; 1443.
I^{P}_{210} = 1955; 2047.

Zur präparativen gaschromatographischen Auftrennung des erhaltenen Gemisches benutze man eine Apiezon L-Kolonne bei einer Temperatur von 195°. Die grösste Fraktion (59 mg), entsprechend dem Retentionsindex I^{A}_{210} = 1405, ein farbloses Oel, wurde ohne weitere Reinigung zur Analyse gegeben.

$[\alpha]^{19}_{D}$ = - 20,6 ± 4,7^{o} (c = 1,69).

IR.-Spektrum (Chloroform): u.a. Bande bei 1720-1750 cm^{-1}.

UV.-Spektrum: keine Absorptionsbanden zwischen 210 und 400 mμ, in Aethanol oder 0,01N KOH/Aethanol.

$C_{10}H_{14}O_5$ ber. C 56,07% H 6,59%
gef. C 56,15% H 6,57%

NMR.-Spektrum: ($CDCl_3$) Signale bei δ = 1,2 (d, J = 6,5Hz, 3H, >CH-$\underline{CH_3}$); 1,8 - 3,5 (m, 5H); 3,8 (s, 3H, -COO$\underline{CH_3}$); 3,83 (s, 3H, -COOCH_3).

Massenspektrum: Piks u.a. bei m/e = 214 (M); 199 (M-15); 186 (M-28); 182 (M-32); 167 (M-47); 159 (M-55); 154 (M-60); 139 (M-75); 127 (M-87); 122 (M-92); 114 (M-100); 101 (M-113); 95 (M-119); 85 (M-129); 69 (M-145); 59 (M-155).

Es handelt sich um einen 3-Methyl-4-keto-cyclopentan-1,2-dicarbonsäure-dimethylester (62).

Reduktion des Ketodimethylester (62) nach Clemmensen

21 mg Ketoester (62) in 0,6 ml Eisessig und 0,2 ml Toluol wurden mit 250 mg frisch amalgamiertem Zink *) versetzt und das Gemisch mit 0,4 ml konz. Salzsäure während 22 Std. unter Rückfluss gekocht. In Portionen gab man während dieser Zeit noch 0,8 ml konz. Salzsäure zu. Die übliche Aufarbeitung des Reaktionsgemisches lieferte 21 mg eines gelben Oels, das beim Bespritzen mit Hexan kristallisierte. Umkristallisation aus Aceton-Hexan lieferte 15 mg Produkt vom Smp. 92 - 97°. Dieses zeigte im Dünnschichtchromatogramm im System Benzol-Eisessig 7:3 beim Entwickeln mit einer Glucose-Anilin-Sprühlösung[151] zwei Flecken. Die Reinigung der Substanz erfolgte durch Dünnschichtchromatographie im gleichen Lösungsmittelsystem. Die entsprechenden Zonen wurden mit Essigester-Eisessig 19:1 verschiedene Male extrahiert. Beim Abdampfen des Lösungsmittels erhielt man 15 mg eines farblosen Rückstands, der mit Benzol ausgewaschen wurde. Dieser zweite Extrakt ergab beim Eindampfen 5 mg einer kristallinen Substanz vom Smp. 110-112°. *Zur Analyse wurde eine Probe bei 60° im Hochvakuum sublimiert.*

$[\alpha]_D^{21} = -1,2 \pm 4^\circ$ (c = 0,41).

$C_8H_{12}O_4$	ber.	C 55,80 %	H 7,04 %
	gef.	C 55,90 %	H 7,06 %

Massenspektrum: *Piks u.a. bei m/e = 126 (M-46); 108 (M-64);* 99 (M-73); 82 (M-90); 67 (M-105); 53 (M-119).

pK^*_{MCS} I/II = 6,04; ca. 9,46; Aequivalentgewicht: 172 **).

Isolierung von Pentaacetylloganin aus dem Züchtungsversuch mit (2-^{14}C)-Mevalonsäure

56 mg des Acetonextrakts aus dem Züchtungsversuch mit (2-^{14}C)-Mevalonsäure (vgl. S. 61) wurden mit 58 mg reinem inaktivem Pentaacetylloganin verdünnt und das Gemisch mit 1 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid während 18 Std. stehen gelassen. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels am Wasserstrahlvakuum erhielt man 155 mg eines braunen Oels, das an der 10-fachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Fluka, Akt. II) chromatographiert wurde. Mit Benzol eluierte man 79 mg einer

*) 240 mg Zinkwolle, 18 mg Sublimat, 0,6 ml Wasser und 0,012 ml konz. Salzsäure wurden während 5 Min. gut geschüttelt. Man dekantierte die Lösung ab und verwendete das Zinkamalgam sofort.

**) Die pK^*_{MCS}-Werte wurden im Lösungsmittelsystem 80 Gew.-Proz. Methylcellosolve/20 Gew.-Proz. Wasser bestimmt (vgl. Simon et al. [152]).

kristallinen farblosen Substanz. Diese kristallisierte man einmal um aus absolutem Aethanol (Smp. 139 - 140°; Aktivität 0,87 imp/min. mg(Alu)). Sechsmaliges Umkristallisieren aus absolutem Aethanol führte zu einem Präparat vom Smp. 140 - 141° und einer Aktivität von 0,04 imp/min. mg(Alu).

Isolierung von Pentaacetylloganin aus dem Züchtungsversuch mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin

Der Acetonextrakt (1,717 g) aus dem zweiten Züchtungsversuch mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin (vgl. S. 60) wurde auf die übliche Art mit 20 ml Acetanhydrid und 20 ml Pyridin acetyliert. Das acetylierte Rohprodukt, 2,582 g eines grünen Oels, chromatographierte man an der 10-fachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Fluka, Akt. II). Mit Benzol eluierte man 1,338 g teilweise kristallines Material mit einer Aktivität von 37 imp/min. mg(Alu). Dieses wurde einer zweiten Chromatographie an der 10-fachen Menge Aluminiumoxyd (Fluka, Akt. II) unterworfen. Mit Benzol eluierte man wiederum nur teilweise kristallines Material mit einer je nach Fraktion schwankenden Aktivität von 24 bis 42 imp/min. mg(Alu). Die Fraktionen, in welchen dünnschichtchromatographisch Pentaacetylloganin nachgewiesen werden konnte (1,1 g), wurden zusammengenommen und an der zweifachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Woelm, Akt. II) filtriert. Die mit Benzol und Benzol-Aether 4:1 eluierten Fraktionen kristallisierte man aus Methanol bis zum Smp. 137 - 139° und einer konstanten Aktivität von 75 imp/min. mg(Alu). Die auf diese Art und Weise erhaltenen 73 mg Substanz verdünnte man mit 657 mg inaktivem Material und erhielt so Pentaacetylloganin vom Smp. 137 - 139° und einer Aktivität von 5,9 imp/min. mg(Alu) (105 imp/min. ∞). Zur Analyse wurde eine Probe 14 Std. im Hochvakuum bei 50° getrocknet.

$C_{27}H_{36}O_{15}$				spez. Aktivität
	ber.	C 53,98%	H 6,05%	
	gef.	C 53,78%	H 6,04%	232,9 imp/sec. mMol CO_2
		C 53,87%	H 5,98%	230,5 imp/sec. mMol CO_2

Verseifung des radioaktiv markierten Pentaacetylloganins

300 mg Pentaacetylloganin (5,9 imp/min. mg(Alu)), 1,653 g Bariumhydroxyd und 6 ml Wasser wurden in einen Erlenmeyerkolben mit Schliff eingefüllt, der über einen Dreiweghahn mit einem zylindrischen Auffanggefäss verbunden war. Das Reaktionsgemisch erhitzte man während zwei Stunden im geschlossenen System auf dem Wasserbad. Zur Vermeidung eines Ueberdrucks in der Apparatur kühlte man während dieser Zeit

das Auffanggefäss mit flüssiger Luft. Nach Abschluss der Reaktion brachte man das an den Wänden kondensierte Wasser durch Erwärmen wieder in das Reaktionsgefäss zurück. Darauf kühlte man die ganze Apparatur mit flüssiger Luft und evakuierte über den Dreiweghahn. Die beiden Gefässe wurden miteinander verbunden und die Kühlfalle vom Reaktionsgefäss entfernt. Nach dem Auftauen des Reaktionsgemisches destillierte man 3 ml der Lösung ins Auffanggefäss. Dieses Destillat versetzte man mit 100 mg Natriumacetat und 1 ml 40-proz. Natronlauge und tropfte darauf unter Kühlen mit Eis 0,5 ml einer 5-proz. Lösung von 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in Ligroin-Benzol 1:4 [153] zum Gemisch. Es wurde abwechslungsweise während 30 Min. geschüttelt und im Eis gekühlt und darauf 2 Std. im Eisbad stehen gelassen. Nach Abschluss der Reaktion brachte man die rote viskose Lösung auf Zimmertemperatur und extrahierte mit dreimal 12 ml Aether. Die ätherischen Lösungen wurden mit Wasser neutralgewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels erhielt man 8 mg (6,1 %) kristallinen 3,5-Dinitrobenzoesäuremethylester. Umkristallisation aus Hexan ergab 5,232 mg Substanz, die mit 7,447 mg inaktivem Material verdünnt und weiter umkristallisiert wurden. Man erhielt so 11 mg 3,5-Dinitrobenzoesäuremethylester vom Smp. 107°. Zur Analyse trocknete man 14 Std. im Hochvakuum bei Zimmertemperatur.

$C_8H_6O_6N_2$				spez. Aktivität
	ber.	C 42,48 %	H 2,68 %	
	gef.	C 43,97 %	H 2,99 %	326,4 imp/sec. mMol CO_2
		C 43,06 %	H 2,90 %	331,6 imp/sec. mMol CO_2

Die wässrige alkalische, im Reaktionsgefäss zurückbleibende Lösung wurde erwärmt und mit 10-proz. Schwefelsäure auf einen pH von 3-4 gebracht. Vom ausfallenden Bariumsulfat filtrierte man ab und dampfte die saure wässrige Lösung im Vakuum ein. Den Rückstand (260 mg) eine glasartige, erstarrte Masse, acetylierte man mit 4 ml Acetanhydrid und 4 ml Pyridin. Die Lösungsmittel wurden am Vakuum entfernt und der oelige Rückstand (250 mg) zweimal aus Methanol umkristallisiert. Man erhielt 35 mg Pentaacetylnorloganinsäure, Smp. 98° und 175-176° [112] mit einer Aktivität von 1 imp/min. ∞. Zur Analyse wurde eine Probe 14 Std. im Hochvakuum getrocknet.

$C_{26}H_{34}O_5$			
	ber.	C 53,24 %	H 5,84 %
	gef.	C 52,64 %	H 5,92 %

Für die Ausführung der Analysen und die Aufnahme der Spektren danke ich den folgenden Herren und ihren Mitarbeitern:

Herrn P.-D. Dr. P. Jordan für die unter seiner Leitung im Isotopenlabor des organisch-chemischen Laboratoriums der ETH ausgeführten radioaktiven Analysen.

Herrn W. Manser für die unter seiner Leitung an der mikroanalytischen Abteilung durchgeführten Analysen.

Herrn P.-D. Dr. W. Simon für die in seinem Laboratorium aufgenommenen IR.-, NMR.- und UV.-Spektren sowie für die Bestimmung der $pK^*_{MCS^-}$ Werte und der Molekulargewichte.

Herrn Dr. J. Seibl für die Aufnahme und Interpretation von Massenspektren.

Herrn Dr. E. Kováts und Fräulein Dr. D. Felix für die gaschromatographischen Untersuchungen.

Herrn H. Grossmann danke ich für die Aufarbeitung grösserer Mengen Pflanzenmaterials.

ZUSAMMENFASSUNG

a) Auf Grund von Einbauversuchen mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin in Menyanthes trifoliata, dem Wasser- oder Bitterklee, konnte gezeigt werden, dass die Methylgruppe von Methionin ein Vorläufer beider Kohlenstoffatome der Aethylseitenkette von α-Spinasterin darstellt. Mögliche Mechanismen für die Entstehung dieser Seitenkette werden kurz diskutiert.

b) Die Ergebnisse spektroskopischer und chemischer Untersuchungen zeigen, dass Loganin, der glucosidische Bitterstoff aus Menyanthes trifoliata, Struktur (65) oder (66) besitzt.

c) In biosynthetischen Versuchen gelang es nicht, (2-^{14}C)-Mevalonsäure in Loganin einzubauen. Experimente mit L-(Methyl-^{14}C)-Methionin ergaben einen ausschliesslichen Einbau von Radioaktivität in die Methylgruppe der Carbomethoxyeinheit. Die Bedeutung dieser Beobachtung wurde im Hinblick auf die Biogenese von Loganin kurz erörtert.

LITERATURVERZEICHNIS

1) L. Guglielmetti, Diss. ETH, Nr. 3299 (1962).
2) M. Bridel, J. Pharm. Chim. VIII, 9, 49 (1911).
3) A. Heusner, Handbuch der Pflanzenphysiologie, S. 132 (1958).
4) G. Popják und J. W. Cornforth, Advances in Enzymology, 22, 281 (1960).
5) G. Popják, 5. Int. Congress of Biochemistry, Moscow, VII, 207 (1961).
6) F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning und I. Kessel, Angew. Chem. 70, 738 (1958).
7) G. Popják, Tetrahedron Letters, No. 19, 19 (1959).
8) D. W. S. Goodman und G. Popják, J. Lipid Research, 1, 286 (1960).
9) G. Popják, D. W. S. Goodman, J. W. Cornforth, R. H. Cornforth und R. Ryhage, J. biol. Chem. 236, 1934 (1961).
10) G. Popják, J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, R. Ryhage und D. W. S. Goodman, J. biol. Chem. 237, 56 (1962).
G. Popják, G. Schröpfer, J. W. Cornforth, Biochem. Biophys. Research Communications, 6, 438 (1962).
J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger, G. Popják, G. Ryback und G. J. Schoepfer, Biochem. Biophys. Research Communications, 11, 129 (1963).
11) C. R. Childs und K. Bloch, J. biol. Chem. 237, 62 (1962).
12) J. W. Cornforth, G. Ryback, G. Popják, C. Donninger und G. Schroepfer, Biochem. Biophys. Research Communications, 9, 371 (1962).
13) B. Samuelsson und D. W. S. Goodman, J. biol. Chem. 239, 98 (1964).
14) G. Krishna, D. H. Feldbruegge und J. W. Porter, Biochem. Biophys. Research Communications, 14, 363 (1964).
15) T. T. Tchen und K. Bloch, J. biol. Chem. 226, 921, 931 (1957).
16) R. K. Maugdal, T. T. Tchen und K. Bloch, J. Amer. chem. Soc. 80, 2589 (1958).
17) J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, A. Pelter, M. G. Horning und G. Popják, Proc. chem. Soc. 1958, 112.
J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, A. Pelter, M. G. Horning und G. Popják, Tetrahedron, 5, 311 (1959).

18) A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger und D. Arigoni, Helv. 38, 1890 (1955).

19) F. Gautschi und K. Bloch, J.biol.Chem. 233, 1343 (1958).

20) J. A. Olson, M. Lindberg und K. Bloch, J.biol.Chem. 226, 941 (1957).

21) K. Bloch, Ciba Foundation, Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols, J. & A. Churchill Ltd. London, S. 4 (1959).

22) M. W. Biggs, R. M. Lenmon und F. T. Pierce, Arch. Biochem. Biophys. 51, 155 (1954).

23) A. A. Kandutsch, A. E. Russell, J.biol.Chem. 235, 2256 (1960).

24) D. H. Neiderhiser und W. W. Wells, Arch. Biochem. Biophys. 81, 300 (1959).

25) C. Djerassi, G. W. Krakower, A. J. Lemin, L. H. Liu, J. S. Mills und R. Vilotti, J.Amer.chem.Soc. 80, 6284 (1958).

26a) G. Gros und E. Leete, Chem. and Ind. 1963, 698.

26b) J. V. Euw und T. Reichstein, Helv. 47, 711 (1964).

27) R. D. Bennet, E. Heftmann, A. E. Purcell und J. Bonner, Science, 134, 671 (1961).

28) H. J. Nicholas, J.biol.Chem. 237, 1476 (1962).

29) H. J. Nicholas, J.biol.Chem. 237, 1481 (1962).

30) H. J. Nicholas, J.biol.Chem. 237, 1485 (1962).

31) D. J. Baisted, E. Capstack und W. R. Nes, Biochemistry, 1, 537 (1962).

32) D. F. Johnson, E. Heftman und G. V. C. Houghland, Arch. Biochem. Biophys. 104, 102 (1964).

33) E. Ramstad und J. L. Beal, Chem. and Ind. 1960, 177.

34) E. Heftmann, R. D. Bennet und J. Bonner, Arch. Biochem. Biophys. 92, 13 (1961).

35) H. Sander und H. Griesebach, Z. Naturforsch. 13b, 755 (1958).

36) A. R. Guseva, M. G. Borikhina und V. A. Paseschnischenko, Biokhimiya, 25, 282 (1960), Doklady Akad. Nauk S.S.S.R. 133, 228 (1960).

37) K. Tsuda, S. Agaki und Y. Kishida, Chem. Pharm. Bull. Tokyo, 6, 101 (1958).

38) R. D. Bennet, E. Heftmann, W. H. Preston und J. R. Haun, Arch. Biochem. Biophys. 103, 74 (1963).

39) D.F.Johnson, R.D.Bennett und E.Heftmann, Science, 140, 198 (1963).

40) A.G.Gonzales und A.H.Toste, Anales real soc. espan. Fis. Quim. 1952, 483, 493; C. A. 5585 (1964).

41) Y.Mazur, A.Weizman und F.Sondheimer, J.Amer.chem.Soc. 80, 6293 (1958).

42) K.Schreiber und G.Osske, Experientia, 19, 69 (1963).

43) C.Djerassi, J.C.Knight und D.I.Wilkinson, J.Amer.chem.Soc. 85, 835 (1963).

44) D.J.Hanahan und S.J.Wakil, J.Amer.chem.Soc. 75, 273 (1953); W.G.Dauben, T.W.Hutton und G.A.Boswell, J.Amer.chem.Soc. 81, 403 (1959).

45) W.G.Dauben, Y.Ban und J.H.Richards, J.Amer.chem.Soc. 79, 968 (1957);
W.G.Dauben und J.H.Richards, J.Amer.chem.Soc. 78, 5329 (1956).

46) D.F.Johnson, B.E.Wright und E.Heftmann, Arch.Biochem. Biophys. 97, 232 (1962).

47) H.Danielsson und K.Bloch, J.Amer.chem.Soc. 79, 500 (1957).

48) W.G.Dauben, G.J.Fonken und G.A.Boswell, J.Amer.chem. Soc. 79, 1000 (1957).

49) G.J.Alexander, A.M.Gold und E.Schwenk, J.Amer.chem. Soc. 79, 2967 (1957).

50) G.J.Alexander und E.Schwenk, J.Amer.chem.Soc. 79, 4554 (1957).

51) L.W.Parks, J.Amer.chem.Soc. 80, 2023 (1958).

52) F.M.Huennekens und M.J.Osborn, Advances in Enzymology, 21, 369 (1959).

53) D.Greenberg, Advances in Enzymology, 25, 395 (1963).

54) G.L.Cantoni, J.biol.Chem. 189, 203, 745 (1951).

55) C.N.Remy, J.biol.Chem. 234, 1485 (1959).

56) G.L.Cantoni und P.J.Vigros, J.biol.Chem. 209, 647 (1954).

57) J.Axelrod und R.Tomchick, J.biol.Chem. 233, 702 (1958).

58) S.K.Shapiro, Biochim. et Biophys. Acta, 29, 405 (1958).

59) G.Cantoni, J.Amer.chem.Soc. 74, 2942 (1952).

60) E.Schwenk, G.J.Alexander, A.M.Gold und D.F.Stevens, J.biol.Chem. 233, 1211 (1958).

61) A. J. Birch, P. Fitton, E. Pride, A. J. Ryan, H. Smith und W. B. Whalley, J. chem. Soc. 1958, 4576.

62) A. J. Birch, R. J. English, R. A. Massy-Westropp, M. Slaytor und H. Smith, J. chem. Soc. 1958, 365.

63) A. J. Birch, D. W. Cameron, P. W. Holloway und R. W. Rickards, Tetrahedron Letters, 25, 26 (1960).

64) J. F. Snell, A. J. Birch und P. L. Thomson, J. Amer. chem. Soc. 82, 2402 (1960).

65) H. Griesebach, H. Achenbach und W. Hofheinz, Tetrahedron Letters, 1961, 234.

66) J. Mayer, M. Půža, L. Doležilowá und Z. Vaněk, Chem. and Ind. 1961, 669.

67) R. Bray und D. Shemin, Biochim. et Biophys. Acta, 30, 647 (1958); J. Biol. Chem. 238, 1501 (1963).

68) W. J. Lennarz, G. Scheuerbrandt und K. Bloch, J. biol. Chem. 237, 664 (1962).

69) K. Hofmann und T. Y. Liu, Biochim. et Biophys. Acta, 37, 364 (1960); Federation Proc. 19, 227 (1960).

70) Sir Robert Robinson, "The Structural Relations of Natural Products" Oxford Univ. Press, London, S. 19 (1955).

71) D. Arigoni, Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols, J. & A. Churchill Ltd. London, S. 244 (1959).

72) H. Tabor, S. M. Rosenthal und C. W. Taylor, J. Amer. chem. Soc. 79, 2978 (1957).

73) K. Lendrich, Arch. Pharm. 230, 38 (1892).

74) J. Zellner, Arch. Pharm. 263, 161 (1925).

75) L. F. Fieser, M. Fieser und R. N. Chakravarti, J. Amer. chem. Soc. 71, 2226 (1949).

76) D. H. R. Barton und J. D. Cox, J. chem. Soc. 1948, 1354.

77) P. Crabbé, E. A. Azpeitia und C. Djerassi, Bull. Soc. chim. Belg. 70, 168 (1961).

78) Y. Kishida, Chem. & Pharm. Bull. Japan, 8, 357 (1960).
K. Tsuda, Y. Kishida und R. Hayatsu, J. Amer. chem. Soc. 82, 3396 (1960).

79) P. J. Godin, H. S. Inglis, M. Snarey und E. M. Thain, J. chem. Soc. 1963, 5878.
80) R. I. Reed, J. chem. Soc. 1958, 3432.
81) S. S. Friedland, G. H. Lane, R. T. Longman, K. E. Train und M. J. O'Neal, Anal. Chem., 31, 169 (1959).
82) E. Fernholz und W. L. Ruigh, J. Amer. chem. Soc. 62, 2341 (1940).
83) N. E. Bachmann, M. P. Cava und A. S. Dreiding, Helv. 42, 1790 (1959).
84) Z. Guiteras, Z. physiol. Chem. 214, 89 (1933).
85) E. v. Rudloff, Canadian J. Chem. 33, 1714 (1955); R. U. Lemieux und E. v. Rudloff, ibid. 33, 1710 (1955); E. v. Rudloff, ibid. 34, 1413 (1956).
86) G. Slomp jr. und J. L. Johnson, J. Amer. chem. Soc. 80, 914 (1958); W. Discherl und H. Nahm, Ber. deutsch. chem. Ges. 76 B, 635 (1943).
87) F. Asinger, Ber. deutsch. chem. Ges. 75 B, 656 (1942).
88) C. F. Koelsch und D. Tennenbaum, J. Amer. chem. Soc. 55, 3049 (1933). D. V. N. Hardy, J. chem. Soc. 1936, 398.
89) A. W. Crossley und H. R. Le Sueur, J. chem. Soc. 1900 T, 83.
90) E. Wiesenberger, Microchimica Acta, 33, 51 (1948).
91) H. Bickel, H. Schmid und P. Karrer, Helv. 38, 664 (1955).
92) E. Bueding und H. W. Yale, J. biol. Chem. 193, 411 (1951).
93) C. F. Gabers, H. Schmid und P. Karrer, Helv. 37, 1336 (1954).
94) B. Lindquist und T. Storgards, Acta chem. scand. 7, 87 (1953).
95) J. J. Britt, Diss. ETH, Nr. 2948 (1959).
96) E. F. Phares, Arch. Biochem. Biophys. 33, 173 (1951).
97) M. Barbier, M. F. Hugel und E. Lederer, Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 91 (1960); M. F. Hugel, W. Vetter, H. Audier, M. Barbier und E. Lederer, Phytochemistry, 3, 7 (1964).
98) M. J. Thomson, S. J. Louloudes, W. E. Robbins, J. A. Waters, J. A. Steele und E. Mosettig, Biochem. Biophys. Research Communications, 9, 113 (1962).
99) J. D. Loerch und M. F. Mellette, Federation Proc. I, 22, 233 (1963).
100) R. A. Mc Rorie, G. L. Sutherland, M. S. Lewis, A. D. Barton, M. R. Glazener und W. Shive, J. Amer. chem. Soc. 76, 115 (1954).

101) W. v. E. Doering und A. K. Hoffmann, J. Amer. chem. Soc. 77, 521 (1955).

102) C. K. Jngold und J. A. Jessop, J. chem. Soc. 1930, 713.

103) G. Wittig und G. Felletschin, Liebigs Ann. Chem. 555, 133 (1944).

104) T. Thompson und T. S. Stevens, J. chem. Soc. 1932, 69.

105) J. W. Cornforth, G. D. Hunter und G. Popják, Biochem. J. 54, 597 (1953).

106) J. W. Cornforth und Y. Youhotsky-Gore, Biochem. J. 65, 94 (1957).

107) U. S. Patent 1564, 631.

108) R. C. Gilmore und W. J. Horton, J. Amer. chem. Soc. 73, 1411 (1951).

109) W. R. Dunstan und F. W. Short, Pharm. Journ. and Trans. XIV, 3, 1025 (1883/84).

110) L. Rosenthaler, Schweiz. Apotheker Ztg. 61, No. 31 (1923).

111) K. W. Merz und K. G. Krebs, Arch. Pharm. 275, 217 (1937).

112) A. J. Birch und E. Smith, Austr. J. Chem. 9, 234 (1956).

113) K. W. Merz und H. Lehmann, Arch. Pharm. 290, 543 (1957).

114) G. Büchi und R. E. Manning, Tetrahedron, 18, 1049 (1962) und dort zitierte Arbeiten.

115) O. Halpern und H. Schmid, Helv. 41, 1109 (1958).

116) A. J. Birch und J. Grimshaw, J. chem. Soc. 1961, 1407.

117) R. B. Bates, E. J. Eisenbraun und S. McElvain, J. Amer. chem. Soc. 80, 3413 (1958).

118) M. Karplus, J. chem. Physics, 30, 11 (1959).

119) H. S. Gutowsky, M. Karplus und D. M. Grant, J. chem. Physics, 31, 1278 (1959).

120) W. Haegele, F. Kaplan und H. Schmid, Tetrahedron Letters, 1961, 110.

121) C. Djerassi, T. Nakano, A. N. James, L. H. Zalkow, E. J. Eisenbraun und J. N. Shoolery, J. org. Chemistry, 26, 1192 (1961).

122) R. B. Bates, E. J. Eisenbraun und S. McElvain, J. Amer. chem. Soc. 80, 3413 (1958).

123) K. Sheth, E. Ramstad und J. Wolinsky, Tetrahedron Letters, 1961, 394.

124) J. Grimshaw, Chem. and Ind., 1961, 403.

125) J.M.Bobbitt, D.W.Spiggle, S.Mahboob, W.v.Philipsborn und H.Schmid, Tetrahedron Letters, 1962, 321.
126) G.Albers-Schönberg und H.Schmid, Chimia 14, 127 (1960).
127) G.Albers-Schönberg, W.v.Philipsborn, L.M.Jackman und W.Schmid, Helv. 45, 1406 (1962).
128) H.Inouye, T.Arai, Y.Miyoshi und Y.Yaoi, Tetrahedron Letters, 1963, 1031.
129) G.W.K.Cavill und D.L.Ford, Austr.J.Chem. 13, 296 (1960).
130) R.B.Bates, E.J.Eisenbraun und S.M.McElvain, J.Amer. chem.Soc. 80, 3420 (1958).
131) H.C.Beyermann, L.A.van Dijck, J.Levisalles, A.Melera und W.L.C.Veer, Bull.Soc.chim.France, 1812 (1961).
132) L.Canonica, F.Belizzoni, P.Manitto und G.Jommi, Tetrahedron Letters, 24, 7 (1960).
133) T.Kubota und Y.Tomita, Tetrahedron Letters, 1961, 176.
134) T.R.Govindachari, K.Nagarajan und S.Rajappa, J.chem.Soc. 1957, 551.
135) K.Balenović, H.U.Däniker, R.Goutarel, M.M.Janot und V.Prelog, Helv. 35, 2519 (1952).
136) G.Barger und C.Scholz, Helv. 16, 1343 (1933).
G.Hahn und H.Werner, Liebigs Ann.Chem. 520, 123 (1935).
137) L.Panizzi, M.L.Scarpati und G.Oriente, Gazz.chim.ital. 90, 1449 (1960).
138) R.B.Woodward, Angew.Chem., 68, 13 (1956); Nature, 162, 155 (1948).
139) R.Robinson, Nature, 162, 524 (1948).
140) E.Wenkert und N.V.Bringi, J.Amer.chem.Soc., 81, 1474 (1959).
E.Wenkert, J.Amer.chem.Soc. 84, 98 (1962).
141) R.Thomas, Tetrahedron Letters, 1961, 544.
142) E.Leete, S.Ghosal und P.N.Edward, J.Amer.chem.Soc. 84, 1068 (1962).
143) E.Leete und S.Ghosal, Tetrahedron Letters, 1962, 1179.
144) A.R.Battersby, R.Binks, W.Lawrie, G.V.Parry und B.R.Webster, Proc.chem.Soc. 1963, 369.
145) E.J.Herbert und G.W.Kirby, Tetrahedron Letters, 1963, 1505.
146) H.Simon, H.Daniel und J.F.Klebe, Angew.Chem. 71, 303 (1959)

147) R.C.Anderson, Y.Delabarre und A.A.Bothner-By, Anal.Chem. 24, 1298 (1952).

148) J.D.Roberts und C.Green, Anal. Chem. 18, 335 (1946).

149) S.R.Elsden, Biochem.J. 40, 252 (1946).

150) M.W.Wendt, W.Haegele, E.Simonitsch und H.Schmid, Helv. 43, 1440 (1960).

151) F.Cramer, Papierchromatographie, S. 156, (1958).

152) W.Simon, E.sz.Kováts, L.H.Chopard-dit-Jean und E.Heilbronner, Helv. 37, 1812 (1954).

153) W.N.Lipscombe und R.H.Baker, J.Amer.chem.Soc. 64, 179 (1942).

154) D.H.R.Barton, R.H.Hesse und G.W.Kirby, Proc.chem.Soc. 1963, 267.

155) A.R.Battersby, R.J.Francis, M.Hirst und J.Staunton, Proc. chem. Soc. 1961, 268.

156) M.Castle, G.Blondin und W.R.Nes, J.Amer.chem.Soc. 85, 3306 (1963).

157) H.J.Nicholas und S.Moriarty, Federation Proc. 22, 529 (1963).

158) P.Tóth, E.Kugler und E.Kováts, Helv. 42, 2519 (1959).

Lebenslauf

Am 12. November 1937 wurde ich als Tochter des Emil Bader und der Hedwig Bader, geb. Mettler in Zürich geboren. Nach dem Besuch der Primarschule absolvierte ich das Gymnasium der Töchterschule der Stadt Zürich, das ich im Herbst 1956 mit dem Maturitätszeugnis Typus B verliess. Anschliessend immatrikulierte ich mich an der Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule und schloss im Herbst 1960 mit dem Diplom als Naturwissenschafterin ab. Seit Anfang des Jahres 1961 arbeitete ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Arigoni im Organisch-chemischen Laboratorium hauptsächlich an der vorliegenden Promotionsarbeit.

Zürich, im Mai 1964