

Urofuransäuren – eine bisher unbekannte Klasse von Stoffwechselprodukten

Michael Spiteller ^{*)}, Gerhard Spiteller ^{*)*} und Georg-Alexander Hoyer ^{**)}

Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Bayreuth, Universitätsstr. 30, D-8580 Bayreuth ^{*)}, und Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen, Müllerstr. 170 – 178, D-1000 Berlin 65 ^{**)}

Eingegangen am 17. Mai 1979

Aus 10 l Harn wurde durch Kombination verschiedener chromatographischer Verfahren 1 mg Pentylurofuransäure, eine Dicarbonsäure $C_{14}H_{20}O_5$, isoliert. Ihr kommt nach spektroskopischer Untersuchung in Kombination mit Mikroabbaureaktionen die Konstitution 3-Carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropanoic acid (**1a**) zu, die durch Synthese gesichert wurde. Die Pentylurofuransäure kommt nicht nur im Harn (0.5 – 2 mg/24 h), sondern auch im Blut vor. Begleitverbindungen unterscheiden sich von ihr nur durch den Bau der Seitenkette in Stellung 5.

Urofuranic Acids – a Hitherto Unknown Class of Metabolic Compounds

By a combination of chromatographic methods 1 mg of pentylurofuranic acid, a dicarboxylic acid $C_{14}H_{20}O_5$, was isolated from 10 l urine. According to spectroscopic measurements in combination with reactions in microscale its structure is 3-carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropanoic acid (**1a**). This was confirmed by synthesis. Pentylurofuranic acid does not only occur in urine, but also in blood. Accompanying compounds differ only in the construction of the side chain in position 5.

Die Entwicklung potenter Trennmethode in Verbindung mit spektroskopischen Verfahren hat in den letzten beiden Jahrzehnten wesentlich zur Isolierung und Konstitutionsaufklärung zahlreicher niedermolekularer neuer Pflanzeninhaltsstoffe beigetragen. Sehr viel weniger wurden diese Untersuchungen bei der Analyse biologischer Flüssigkeiten verwendet – offenbar in der Annahme, daß in ihnen die meisten niedermolekularen Stoffe bereits bekannt sind.

Erst in jüngster Zeit ist durch die Anwendung der Glaskapillargaschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie klargeworden, daß unser Wissen über die Inhaltsstoffe biologischer Flüssigkeiten sehr begrenzt ist^{1,2)}. In dieser Arbeit werden am Beispiel der Konstitutionsaufklärung der bisher unbekanntenen Urofuransäuren prinzipielle Wege zur Identifizierung solcher Spurenstoffe beschrieben.

Isolierung und Charakterisierung der Urofuransäuren

Durch Adsorption an XAD-Harzen können die sauren Bestandteile des Harns von salzartigen Bestandteilen abgetrennt und durch Waschen mit Methanol wieder eluiert werden³⁾. Unterwirft man die mit Diazomethan erhältlichen Methylester einer gaschro-

matographischen Trennung, so findet man einen Peak mit dem Retentionsindex (RI) 1937 (auf OV 101), dessen Massenspektrum durch Schlüssel-Ionen der Masse 179, $M - 31$, $M - 57$, $M - 60$ und $M - 73$ gekennzeichnet ist (Abb. 1). Die Verbindung ist in stark wechselnden Mengen in allen Harnproben vorhanden²⁾. Ihr charakteristisches Massenspektrum wurde kürzlich als das einer „unbekannten Verbindung“ auch in einer anderen Arbeit erwähnt⁴⁾. Sie tritt nicht nur im Harn, sondern auch in der Dicarbonsäurefraktion des Blutes auf²⁾ und wird immer begleitet von einer um 28 Masseneinheiten (ME) niedrigeren homologen Verbindung, in der anstelle des Schlüssel-Ions bei $M - 57$ eines der Masse $M - 29$ vorhanden ist (Abb. 2).

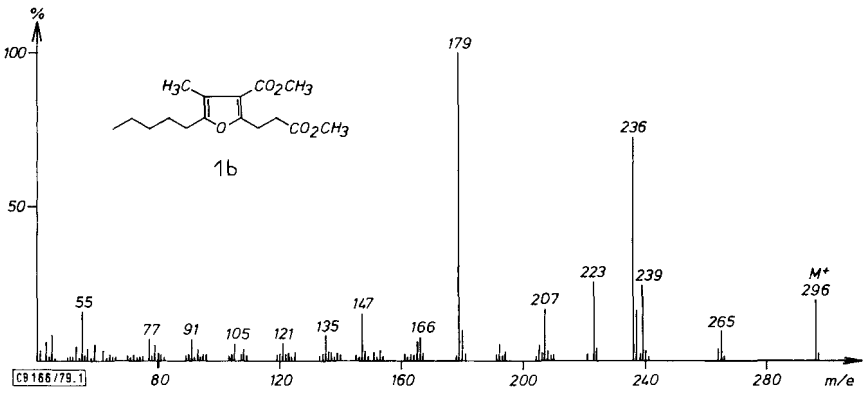


Abb. 1. Massenspektrum des Pentylurofuran säure-dimethylesters (1b)

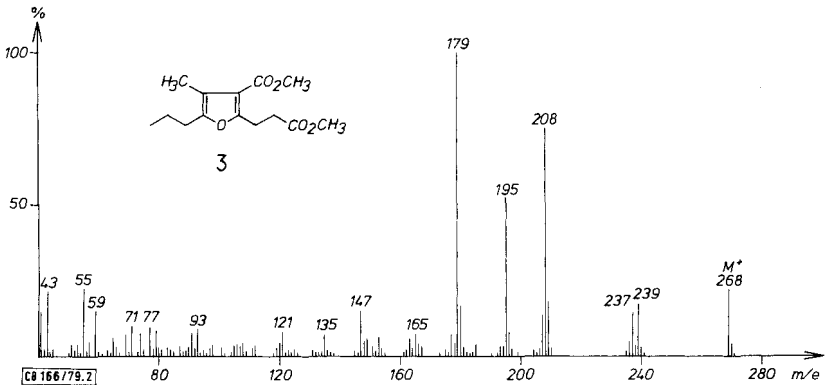


Abb. 2. Massenspektrum des Propylurofuran säure-dimethylesters (3)

Um die Bruttoformel der Verbindung sicherzustellen, wurde die gesamte Methyl esterfraktion an einem präparativen Gaschromatographen (GC) in Fraktionen geschnitten (Abb. 3) und jede Fraktion mit der Kombination Glaskapillargaschromatograph-Massenspektrometer (GC-MS) untersucht, um zu ermitteln, in welcher Fraktion die Verbindung der Masse 296 angehäuft war (Abb. 4).

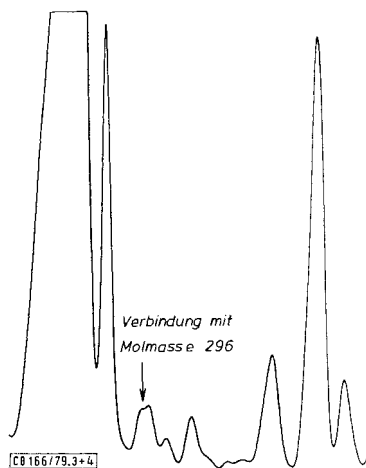


Abb. 3

Abb. 3. Ausschnitt aus dem an einem präparativen GC erhaltenen Gaschromatogramm der mit Diazomethan methylierten Säurefraktion aus Harn. Der Pfeil zeigt an, an welcher Stelle die Verbindung mit Molmasse 296 durchbricht

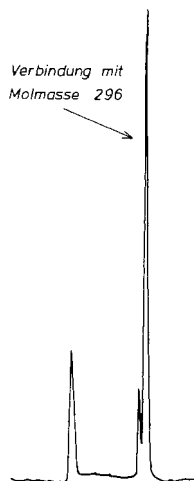


Abb. 4

Abb. 4. Glaskapillargaschromatogramm der Fraktion, die an der mit Pfeil gekennzeichneten Stelle der präparativen GC-Trennung gesammelt wurde, in der die Verbindung mit Molmasse 296 als Hauptkomponente enthalten war

Dadurch konnten einige μg der unbekanntes Verbindung angereichert werden. Diese Menge reichte aus, um durch „peak matching“-Technik die Bruttoformeln der wichtigsten Ionen zu bestimmen (eine Bestimmung der Bruttoformeln gelingt zwar direkt mit Rechneinsatz von einzelnen Peaks in Glaskapillargaschromatogrammen, doch sind wegen der notwendigen Reduktion der Auflösung die erhaltenen Werte nicht genügend verlässlich).

Konstitutionsaufklärung

Die Verbindung der Molmasse 296 hat demnach die Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5$. Das Schlüssel-Ion bei 265 ($M - 31$) entspricht dem Verlust von $\cdot\text{OCH}_3$, das bei 236 ($M - 60$) dem Verlust von CO und CH_3OH , das der Masse 223 ($M - 73$) entsteht durch Abspaltung von $\cdot\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$. Derartige Zerfallsreaktionen sind typisch für Carbonsäure-methylester, die über eine $-\text{C}-\text{CH}_2-$ Brücke an einen Aromaten oder an eine olefinische Doppelbindung geknüpft sind. Beispielsweise zeigt das Massenspektrum von 3-Phenylpropionsäure-methylester ebenfalls Schlüssel-Ionen, die dem Verlust $\text{CO} + \text{CH}_3\text{OH}$ und $\cdot\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ entsprechen.

Das Ion der Masse 239 ($M - 57$) wird durch Verlust von $\cdot\text{C}_4\text{H}_9$ gebildet und läßt somit das Vorliegen einer gesättigten C_4 -Teilstruktur erkennen. Es ist weiter abbaubar unter Verlust von $\text{CO} + \text{CH}_3\text{OH}$ zum Hauptspaltstück der Masse 179 mit der Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3$, aus dem nochmals eine Abspaltung von Methanol zum Ion der Masse 147 möglich ist. Diese erneute Methanolabspaltung läßt vermuten, daß das Molekül noch eine zweite Methoxycarbonylgruppe enthält.

Die Bruttoformel zeigt das Vorhandensein von 5 Doppelbindungsäquivalenten an, von denen eines mit Sicherheit und ein zweites mit hoher Wahrscheinlichkeit als CO_2CH_3 -Gruppe vorliegen. Die verbliebenen drei Doppelbindungsäquivalente schließen das Vorliegen eines 6-Ringaromaten aus.

Abbauversuche

Um weitere Informationen zu erhalten, wurde eine Probe der angereicherten Substanz (ca. 30 μg) einer katalytischen Hydrierung mit Pd/Aktivkohle in Ethanol unterworfen. Nach der Reaktion wurde die Probe mit der Kombination GC-MS untersucht. Die Massenspektren zeigten, daß keine Wasserstoffaufnahme erfolgt war. Auch mit PtO_2 in Eisessig gelang keine Hydrierung. Beim Versuch, die Zahl der Carbonylgruppen durch LiAlH_4 -Reduktion zu bestimmen, ließ sich kein Umsetzungsprodukt finden (Adsorption der geringen Menge an Umsetzungsprodukt oder zu hohe Wasserlöslichkeit?). Die Umsetzung mit $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ in ethanolischer HCl (Umesterung) lieferte eine Verbindung der Molmasse 310 und bestätigte damit das Vorhandensein mindestens einer CO_2CH_3 -Gruppe im Ausgangsmolekül. Auch Acetylierungs- und Silylierungsversuche lieferten nur unversehrtes Ausgangsmaterial zurück und erbrachten somit den Beweis, daß das 5. Sauerstoffatom nicht als Hydroxylgruppe vorliegen kann.

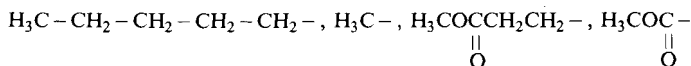
NMR-Spektren

Um Material zur Aufnahme von NMR-Spektren zu gewinnen, wurden 10 l Harn aufgearbeitet. Da sich die Anreicherung der nur in kleiner Menge vorkommenden Verbindung durch präparative GC als zeitraubend erwies, wurde die erhaltene Säurefraktion auf Dünnschichtplatten mit Ether/Cyclohexan (4:5) in 8 Zonen getrennt und die in der vordersten Zone enthaltene Verbindung der Molmasse 296 nach Abkratzen mit Methanol eluiert. Nach mehrmaliger Chromatographie mit Benzol als Laufmittel wurde eine stark angereicherte Probe (1 mg) erhalten, die eine spektroskopische Untersuchung erlaubte.

Das Protonen-NMR-Spektrum ist durch zwei OCH_3 -Singulets ($\delta = 3.70$ und 3.82) gekennzeichnet, die nach ihren chemischen Verschiebungen einer Methoxycarbonylgruppe an einem gesättigten System und einer an einem ungesättigten System entsprechen⁵⁾. Ein weiteres Singulett bei $\delta = 2.08$ zeigt eine an ein $\text{sp}^2\text{-C}$ -Atom gebundene CH_3 -Gruppe an, ein Triplett bei $\delta = 0.93$ eine CH_3 -Gruppe am Ende einer aliphatischen Kette.

Das Triplett einer Methylengruppe bei $\delta = 2.70$ koppelt mit einem bei $\delta = 3.28$. Dieses A_2M_2 -System entspricht einer $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ -Gruppe, die zwischen einer Methoxycarbonylgruppe und einem $\text{sp}^2\text{-C}$ -Atom liegt. Das Zwei-Protonen-Triplett bei $\delta = 2.53$, das Zwei-Protonen-Quintett bei $\delta = 1.60$, das Vier-Protonen-Multiplett bei $\delta = 1.32$ und die oben erwähnte aliphatische Methylgruppe bilden eine n-Pentylgruppe an einem $\text{sp}^2\text{-C}$ -Atom. Entkopplungsexperimente bestätigen die getroffenen Zuordnungen.

Damit ist die Bindungsart sämtlicher 24 Wasserstoffe des Moleküls geklärt. Nimmt man an, daß die beiden Methoxygruppen als Methoxycarbonylgruppen vorliegen, sind auch 12 der 16 Kohlenstoffatome und 4 der 5 Sauerstoffe in Form von Strukturteilen festgelegt, und zwar



Die fehlenden 4 Kohlenstoffatome und das Sauerstoffatom müssen einem Strukturelement entsprechen, das die 3 Doppelbindungsäquivalente enthält. Dafür kommt nur ein tetrasubstituiertes Furan in Frage.

Diese Schlußfolgerungen werden durch das breitbandenkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 5) weiter gestützt. Das Spektrum zeigt das Vorhandensein von 20 anstelle der erwarteten 16 C-Signale.

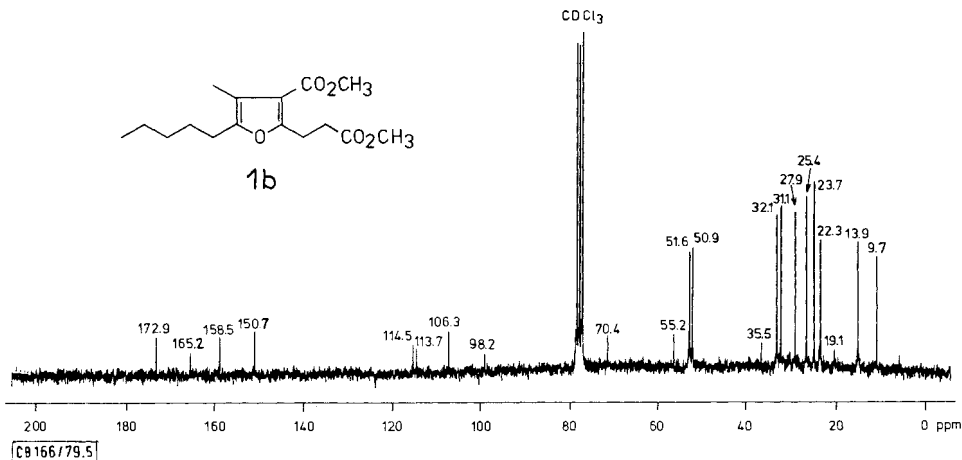


Abb. 5. Breitbandenkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum des Pentylurofuran-2,5-dimethylesters (**1b**)

Ein gleichzeitig aufgenommenes Spektrum der Beimengungskomponente, die ebenfalls angereichert wurde, zeigt Signale bei $\delta = 106.3$, 70.4 , 55.2 und 35.5 , die demnach zu vernachlässigen sind. Durch ein Off-Resonanz-Spektrum ließ sich zeigen, daß die Signale bei $\delta = 9.7$, 13.9 , 50.9 und 51.6 Methylquartetts sind, die im Bereich zwischen 20 und 35 ppm Methylen-tripletts zugehören. Die Zuordnung der einzelnen Signale zu den Methyl- und Methylen-Gruppen der vier Strukturelemente (s. o.) erfolgte durch die Größe der Restaufspaltung im Off-Resonanz-Spektrum, die stark vom Abstand zwischen Protonensignal und Off-Resonanz-Frequenz abhängt, und nach Abschätzungen der chemischen Verschiebungen durch Inkrementberechnungen⁶⁾. Die Singulett-Signale bei 172.9 und 165.2 entsprechen Carbonylgruppen. In Verbindung mit den chemischen Verschiebungen der beiden Methoxygruppen ($\delta = 50.9$ und 51.6) beweisen diese Werte das Vorliegen einer Methoxycarbonylgruppe an einem gesättigten und einer an einem ungesättigten System⁷⁾. Insofern werden alle bisherigen Aussagen, die aufgrund des ^1H -NMR- und Massenspektrums gemacht wurden, bestätigt.

Die restlichen Kohlenstoffatome sind als Singulett erkennbar. Nach der chemischen Verschiebung müssen zwei der vier C-Atome α - ($\delta = 158.5$ und 150.7) und zwei C-Atome β -ständig ($\delta = 114.5$ und 113.7) zu einem Sauerstoff sein. Damit wird das Vorhandensein eines Furanringes erkennbar. Die mögliche alternative Konstitution eines α - oder γ -Pyrons läßt sich ausschließen, da eine aromatische Methoxygruppe im ^{13}C -NMR-Spektrum einen δ -Wert von 54.0 zeigen müßte⁷⁾, aber nur solche von 50.9 und 51.6 gefunden wurden, und die Carbonylgruppen schon für die beiden Methoxycarbonylgruppen vergeben sind.

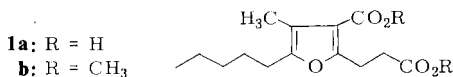
Ermittlung der Stellung der Substituenten

Um die Stellung der Substituenten am Furanring zu ermitteln, wurde eine Hydrierung mit Rhodium als Katalysator in Eisessig bei 100°C und unter 150 atü H₂-Druck versucht. Das erwartete Tetrahydrofuran sollte bevorzugt im Massenspektrometer unter Verlust der α -ständigen Substituenten abgebaut werden und somit diese eindeutig erkennen lassen. Im Gegensatz zu dieser Erwartung zeigte die Untersuchung der Reaktionsprodukte mit der Kombination Glaskapillargaschromatograph-Massenspektrometer, daß im wesentlichen zwei Dihydroderivate entstanden waren. Das Spektrum des einen war durch Schlüssel-Ionen der Massen 115 und 55 geprägt, die dem Strukturelement $O = \overset{\dagger}{C} - CH_2CH_2CO_2CH_3$ zuzuordnen sind. Die Bildung dieses Fragments zeigt, daß die H₃COCOCH₂CH₂-Seitenkette in einer α -Position am Furanring sitzen muß.

Die Stellung der restlichen drei Substituenten wurde durch folgende Überlegungen ermittelt: Während α -ständige Methylgruppen an einem Furanring δ -Werte von 2.26 (in CDCl₃; α -Methylfuran)⁸⁾ bzw. 2.23 (in CDCl₃; α, α' -Dimethylfuran)⁹⁾ zeigen, liegen β -ständige bei $\delta = 2.02$ (in CCl₄; β -Methylfuran)¹⁰⁾. Danach sollte die Methylgruppe die Stellung 3 oder 4 einnehmen. Da eine benachbarte Alkylgruppe eine geringe Hochfeldverschiebung (0.1–0.2 ppm; vgl. Verhältnisse bei *o*-Methylbenzolen)¹¹⁾ auslöst, muß angenommen werden, daß diese kompensiert wird, was durch den Anisotropieeffekt einer benachbarten Methoxycarbonylgruppe verursacht sein könnte.

Die Signallage der direkt an das Furan in α -Stellung gebundenen Methylengruppe der Methoxycarbonylethylgruppe ist mit $\delta = 3.28$ anomal (in Dihydrozimtsäure liegt das entsprechende Signal bei $\delta = 2.90$)¹²⁾. Daher sollte die Methoxycarbonylgruppe benachbart sein, die mit ihrer magnetischen Anisotropie die Signallage der Methylengruppe paramagnetisch verschiebt.

Da die Methoxycarbonylethylgruppe an einem α -C-Atom sitzt, muß am benachbarten β -Kohlenstoffatom die Methoxycarbonylgruppe lokalisiert werden. Die Methylgruppe sollte dann die andere β -Stellung einnehmen und die Alkylkette am benachbarten α -C-Atom sitzen. Es ergibt sich somit für die im Harn vorkommende Säure als wahrscheinlichste Konstitution die einer 3-Carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropansäure (**1a**) und für den Dimethylester (Verbindung der Molmasse 296) die Konstitution **1b**.



Diese Konstitutionsableitung erfährt durch das ¹³C-NMR-Spektrum eine weitere Stütze.

Das ¹³C-NMR-Signal bei $\delta = 158.5$ muß entweder C-2 oder C-5 entsprechen. Dieser relativ hohe Wert ist nach Inkrementberechnungen unter Zugrundelegung des Furans oder 2,5-Dimethylfurans¹³⁾ und den Substituenten-Inkrementen an Doppelbindungen¹⁴⁾ nur erreichbar, wenn an C-2 eine Pentyl- oder Methoxycarbonylethylgruppe und an C-3 eine Methoxycarbonylgruppe steht.

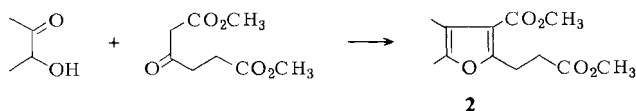
Eine Berechnung der ¹³C-Signallagen aller vier Ring-C-Atome mit Substituenten-Inkrementen, ausgehend von den Werten für 2,5-Dimethylfuran, ergibt die angegebenen chemischen Verschiebungen, die den gefundenen gegenübergestellt werden^{13,14)}.

	C-2	C-3	C-4	C-5
Ber.	158.9	114.3	116.5	149.1
Gef.	158.5	113.7	114.5	150.7

Die Übereinstimmung zwischen berechneten und gefundenen Werten ist gut, so daß der obige Konstitutionsvorschlag eine große Wahrscheinlichkeit besitzt.

Synthese

2,4,5-Trialkylsubstituierte 3-Furancarbonsäuren lassen sich nach *Hanson* et al.¹⁵⁾ aus Acyloinen und β -Ketoestern in Gegenwart von $ZnCl_2$ darstellen. In Analogie zu dieser Syntheseroute wurde zunächst durch Umsetzung von Acetoin mit 3-Oxadipinsäuredimethylester die Modellverbindung **2** hergestellt.



Ein Vergleich der 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten von **2** und **1b** zeigt fast völlige Übereinstimmung mit Ausnahme des C-5 entsprechenden Signals. Der Ersatz der 5-Methylgruppe durch die 5-Pentylgruppe und die Berechnung der Signallagen von C-4 und C-5 mit Inkrementen¹⁴⁾ ergibt eine fast vollständige Übereinstimmung mit den gefundenen Werten.

Daraufhin wurde durch radikalische Chlorierung von 2-Octanon 3-Chlor-2-octanon dargestellt¹⁶⁾, dieses zum entsprechenden Acyloin verseift¹⁷⁾ und mit 3-Oxadipinsäuredimethylester umgesetzt.

Das durch gaschromatographische Reinigung aus dem Reaktionsansatz erhaltene Hauptprodukt zeigte ein mit dem Naturprodukt übereinstimmendes Massenspektrum und übereinstimmenden Retentionsindex. Die Koinjektionsprobe ergab nur einen Peak. Die 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren des Synthese- und Naturproduktes stimmen ebenfalls überein. Damit ist die Konstitution der Pentylurofuranensäure (**1a**) gesichert.

Begleitverbindungen

Der Verbindung der Molmasse 268 kommt demnach die Konstitution **3**, 3-Methoxycarbonyl-4-methyl-5-propyl-2-furanpropansäure-methylester, zu.

Außerdem wurden in geringen Spuren noch weitere Verbindungen gefunden, die in ihren Massenspektren den charakteristischen Peak der Masse 179 und die Ionen $M - 60$ und $M - 73$ aufweisen.

Eine dieser Verbindungen zeigt die Molmasse 310. Schlüssel-Ionen der Masse 43 und $M - 58$ im Massenspektrum (Abb. 6) zeigen an, daß in dieser Verbindung in der in Stellung 5 sitzenden Pentylseitenkette die CH_2 -Gruppe in Position 4' durch CO ersetzt ist (**4**). Bei einem weiteren Vertreter mit der Molmasse 312 ist die Carbonylgruppe durch eine HOCH-Gruppe ausgetauscht (**5**).

3: R = CH₃

4: R = CH₃COCH₂

5: R = CH₃CH(OH)CH₂

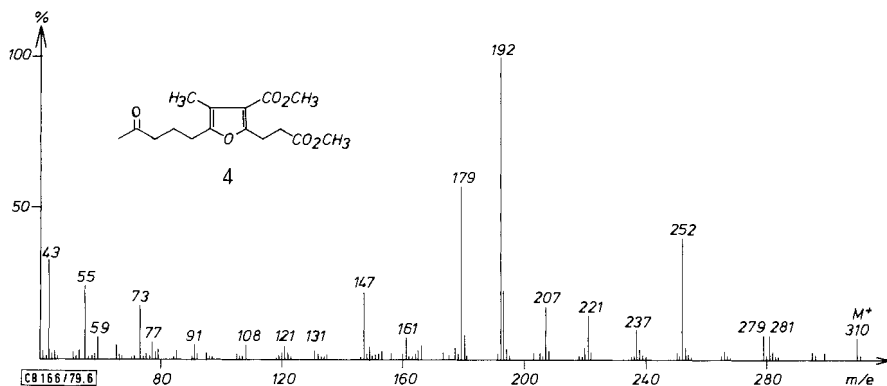
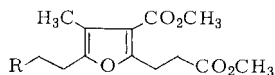


Abb. 6. Massenspektrum von 3-Methoxycarbonyl-4-methyl-5-(4-oxopentyl)-2-furanpropanoic acid-methylester (4)

Da die Urofuransäuren sowohl im Harn als auch im Blut vorkommen und eine gewisse Ähnlichkeit mit den Prostaglandinen vorhanden ist, könnten sie wichtige biologische Wirkungen im menschlichen Organismus ausüben. Weitere Untersuchungen sind vor allem der Klärung dieser Möglichkeit vorbehalten.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*, dem *Fonds der Chemischen Industrie* und der *Doktor Robert Pflieger-Stiftung* für Sachbeihilfen. Herrn Dr. *G. Remberg* danken wir für die Messung der Hochauflösungswerte und Herrn Dr. *J. Reiner* für die Herstellung der Glaskapillarsäulen. Herrn *W. Kern* danken wir für die tatkräftige experimentelle Mitarbeit und Herrn Prof. Dr. *H. Lackner* (Göttingen) für die Mithilfe bei der Auswertung der NMR-Spektren. Für die Aufnahme des ¹³C-NMR-Spektrums des Pentylurofuran Säure-dimethylesters (**1b**) sind wir Herrn Dr. *V. Formacek* von der Firma Bruker zu großem Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil

Geräte

A) *Massenspektrometer-Gaschromatograph*: LKB-2091-Gerät mit getrennten Öldiffusionspumpen (150 l/s Saugleistung) für Quelle und Einlaß. E. I. Ionenquelle, 250°C, Elektronenenergie 70 eV, Beschleunigungsspannung 3.5 KV, TIC-Signal bei 20 eV registriert. Separator: zweistufiger Molekül-Jet-Separator (nach Becker-Ryhage) und „sliding valve“ zur Trennung von GC- und MS-Teil, Temperatur 250°C.

Gaschromatograph: Pye-Unicam-Ein-Säulengerät, Temperaturprogramm 2°C/min, Dünnschicht-Glaskapillarsäule 25 m, OV 101, Trägergas Helium, 2 ml/min.

Schreiber: a) UV-Schreiber 1600 Hz mit drei Empfindlichkeitsspuren 1:10:100. b) Potentiometer-Schreiber LKB-Biocal 2066, Bereich 100 mV, Papiervorschub 0.5 cm/min, Papierbreite 25 cm.

Datensystem: LKB-2130, PDP-11-Rechner (16 bit Memory) mit Disk-System der Firma Digital Equipment Corporation, Sichtschirm Tektronix 4012 und Versatec-Plotter.

B) *Gaschromatograph:* Carlo Erba Modell 2301; Doppelsäulengerät mit Flammenionisationsdetektor. Trägergas Wasserstoff (2 ml/min), 25 m OV 101-Dünnschichtglaskapillarsäule mit Platin-kapillaran-schluß. Injizierte Menge 0.2–0.8 µl, Injektor-Temp. 275 °C, Detektor-Temp. 275 °C, Ofen-Temp. 75 °C, 7 min isotherm, Temperaturprogramm 2 °C/min → 280 °C; Splitverhältnis 1 : 20, Abschwächer (Attenuator) 32.

Präparativer Gaschromatograph: Carlo Erba Fractovap 2400 T, Säule 1.5 m, 6 mm Durchmesser, gefüllt mit 3% SE 30 auf Supelcoport 80/100 mesh. Injizierte Menge 30 µl, Injektor-Temp. 275 °C, Detektor-Temp. 275 °C, Ofen-Temp. 100 °C, Temperaturprogramm 100 °C, 2 min isotherm, 3 °C/min → 270 °C; Splitverhältnis 1 : 100, Abschwächer (Attenuator) 64.

C) *IR-Spektren:* Als Film, Perkin-Elmer PE 580.

D) *UV-Spektren:* In Methanol, Varian Cary 17.

Anreicherung und Isolierung von Pentylurofuransäure (3-Carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropansäure) (1a)

Variante A (Analytische Anreicherung): Zur Entsalzung des Urins wurde ein Aliquot von 10 ml mit 2 N HCl auf pH 1 eingestellt und auf eine mit XAD-4 beschickte Säule (Durchmesser 1 cm, Länge 80 cm, Bettvolumen 40 ml – das entspricht einer Füllhöhe von 50 cm – am Auslauf mit einem silanisierten Glaswollepfropfen versehen und mit einem Teflonhahn bestückt) gebracht. Die Säule wurde vor Gebrauch mit 50 ml 5proz. Natriumchlorid-Lösung gewaschen.

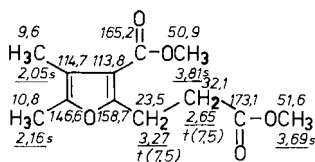
Die Adsorptionsgeschwindigkeit für die Urinprobe wurde so gewählt, daß eine Durchlauf-rate von 0.5 ml pro min eingehalten werden konnte. Danach wurde portionsweise so lange mit Wasser/Methanol (1 : 1, 2 ml/min) nachgewaschen, bis am Auslauf der Säule kein Chlorid mehr nachgewiesen werden konnte. Die zurückgehaltenen Stoffe wurden mit 150 ml über Weinsäure destilliertem Methanol mit einer Tropfgeschwindigkeit von 3 ml/min eluiert. Sowohl die wäbr. Phase des Urins als auch das nachgespülte Wasser wurden getrennt aufgefangen. Zur Verbesserung des Adsorptionsergebnisses wurde die wäbr. Phase noch einmal über die Säule geschickt. Das Methanol-Eluat wurde dem ersten hinzugefügt.

Zur Abtrennung der Neutralteile und Basen wurde die methanolische Lösung auf einen Ionenaustauscher gebracht (Amberlite A-26, Serva, Tropfgeschwindigkeit 0.5 ml/min). Der Ionenaustauscher wurde vor der Benutzung mit 0.1 N HCl und 0.1 N NaOH regeneriert. Für 10 ml Urin reichten 10 ml Amberlite A-26 in der OH⁻-Form in methanolischer Lösung aus. Die Neutralstoffe und Basen wurden mit 50 ml Methanol entfernt und die Säuren mit 100 ml Methanol, das mit HCl-Gas bis zu einer 0.1 N Lösung angereichert war, eluiert. Während der Elution wurde der pH-Wert am Auslauf der Säule mit Pyridin auf pH 5 gehalten.

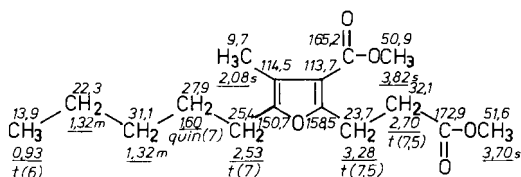
Variante B (präparative Anreicherung): Portionen von 1.5 l Urin wurden mit 6 N HCl auf pH 1 eingestellt und zweimal mit 700 ml Essigester extrahiert. Die eingedampfte organische Lösung wurde mit 10 ml frisch hergestellter etherischer Diazomethan-Lösung so lange versetzt, bis die gelbe Farbe bestehen blieb. Das überschüssige Diazomethan wurde im Stickstoffstrom abgedampft und die konzentrierte Probe an Kieselgel aufgetrennt (Säulendurchmesser 4 cm, 40 cm hoch mit Kieselgel 60, Merck, beschickt). Laufmittel Ether/Cyclohexan (5 : 4). Es wurden Fraktionen zu 75 ml aufgefangen und einzeln massenspektrometrisch untersucht.

Die Fraktionen Nr. 3 und 4 enthielten die gesuchte Verbindung. Der Eindampfrückstand dieser beiden Fraktionen wurde nochmals mit Ether/Cyclohexan (5 : 4) und anschließend mit Benzol auf Kieselgelplatten gereinigt. Die gesuchte Verbindung ließ sich unter der UV-Lampe bei 366 nm als stark blau fluoreszierende Zone erkennen. Die abgekratzten Zonen wurden mit Methanol im Soxhlet-Extraktor 5 h extrahiert, der Extrakt wurde getrocknet. Die Summenformel wurde durch

hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt. Massenspektrum siehe Abb. 1. Die NMR-Daten sind in den Formeln zusammengefaßt; die ^1H -Werte sind unterstrichen.



Vergleichsverbindung 2



Naturprodukt 1b

Hydrierung von Pentylurofursäure-dimethylester (1b): 50 µg Substanz wurden in 0,5 ml Eisessig bei 100 °C und 150 atü Wasserstoff in einem Mini-Autoklaven (Fa. Roth) unter Zusatz von Rhodium auf Aluminiumoxid 10 h hydriert. Das Reaktionsprodukt wurde vom Katalysator durch Zentrifugieren abgetrennt, das Lösungsmittel abgezogen und das in 10 µl Methanol aufgenommene Reaktionsprodukt in der Kombination Glaskapillargaschromatograph-Massenspektrometrie untersucht.

MS der Hydrierungsprodukte

Hauptprodukt 1: $m/e = 298$ (M^+ , 2%), 269 ($\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_4$, 8), 240 ($\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_3$, 9), 237 (8), 229 ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_5$, 30), 227 ($\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_3$, 18), 209 (10), 197 (28), 188 ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_5$, 35), 185 ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_2$, 18), 173 (12), 169 (58), 165 (28), 156 ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_4$, 93), 141 (41), 128 (38), 115 (24), 113 (31), 111 (73), 109 (33), 99 (34), 95 (33), 87 (32), 85 (29), 81 (56), 72 (38), 69 (90), 59 (44), 55 (100), 43 (53), 41 (87).

Hauptprodukt 2: $m/e = 298$ (M^+ , $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_5$, 18%), 283 (7), 267 (20), 266 ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4$, 17), 251 ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_4$, 53), 223 ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$, 13), 209 ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_3$, 100), 153 ($\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3$, 17), 115 ($\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_3$, 53), 59 ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$, 34), 55 ($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}$, 63).

Synthese von Methylurofursäure-dimethylester (3-Methoxycarbonyl-4,5-dimethyl-2-furanpropansäure-methylester) (2): In Analogie zur Synthese von 2,4,5-trialkylsubstituierten 3-Furancarbonsäuren nach Hanson et al.¹⁵⁾ wurden 1,2 g Acetoin, 2,5 g 3-Oxadipinsäure-dimethylester, 2 ml Methanol und 1,33 g ZnCl_2 über Nacht unter Rückfluß erhitzt und nach Abkühlen der Lösung 12 ml Wasser zugesetzt. Die Lösung wurde mit Benzol extrahiert und der Extrakt mit Wasser, 30proz. NaHSO_3 -Lösung, 5proz. Natronlauge, wäßr. Salzsäure und nochmals mit Wasser gewaschen. Das Benzol wurde abdestilliert. 1,0 g des öligen Rückstandes wurde auf präparativen Dünnschichtplatten (Kieselgel HF, Schichtdicke 1 mm, Laufmittel Ether/Cyclohexan 1:1) gereinigt. Ausb. 200 mg Reinprodukt (98proz. nach GC-Analyse).

^1H - und ^{13}C -Daten siehe oben. – IR (Film): 1742 (aliph. CO_2CH_3), 1718 (olefin. CO_2CH_3), 1640, 1580 ($\text{C}=\text{O}$), 1295 (olefin. $=\text{C}-\text{O}$), 1210 ($=\text{C}-\text{O}$), 1085 ($\text{C}-\text{O}$), 1175 ($=\text{C}-\text{O}$) cm^{-1} . – UV (Methanol): $\lambda_{\text{max}} = 262$ nm (log $\epsilon = 3,59$).

Synthese von Pentylurofuransäure-dimethylester (3-Methoxycarbonyl-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropansäure-methylester) (1b)

a) 32 g (0.25 mol) 2-Octanon wurden mit 28.2 g (0.21 mol) Sulfurylchlorid unter Zusatz von 0.14 g Azobis(isobutyronitril) 12 h unter Rückfluß erhitzt. Das entstandene 3-Chlor-2-octanon wurde mit wenig Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und i. Vak. über eine 20-cm-Vigreuxkolonne fraktioniert. Ausb. 25.0 g (61%), Sdp. $72^\circ C/0.8$ Torr.

b) 25 g 3-Chlor-2-octanon (0.15 mol) wurden mit 50 ml 40proz. $NaHCO_3$ -Lösung versetzt und 8 h bei $90^\circ C$ gerührt. Das Acyloin (3-Hydroxy-2-octanon) wurde aus der wäßr. Phase durch Extraktion mit Ether isoliert. Ausb. 18 g (81%), Sdp. $120 - 123^\circ C/50$ Torr.

c) 3.0 g 3-Hydroxy-2-octanon (21 mmol) und 5.5 g 3-Oxoadipinsäure-dimethylester (29 mmol), 5 ml Methanol und 2.2 g $ZnCl_2$ (wasserfrei) wurden 20 h unter Rückfluß erhitzt und nach Abkühlen der Lösung 15 ml Wasser zugesetzt¹⁵⁾. Die Lösung wurde mit Benzol extrahiert und der Extrakt mit Wasser, 30proz. $NaHSO_3$ -Lösung, 5proz. Natronlauge, wäßr. Salzsäure und nochmals mit Wasser gewaschen. Das Benzol wurde abdestilliert. 3.0 g des öligen Rückstandes wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel HF, Schichtdicke 2 mm, Laufmittel Benzol) getrennt. Ausb. 1.0 g (16%) (88% **1b** nach GC-Analyse) und 10% 3-Methoxycarbonyl-5-methyl-4-pentyl-2-furanpropansäure-methylester.

IR (Film): 1745 (aliph. CO_2CH_3), 1720 (olefin. CO_2CH_3), 1632, 1580 ($C=C$), 1285 (olefin. $C-O$), 1200, 1175 ($C-O$), 1090 ($C-O$) cm^{-1} . — UV: $\lambda_{max} = 262$ nm ($\log \epsilon = 3.57$). — 1H , ^{13}C und MS übereinstimmend mit dem Naturprodukt (s. allg. Teil und Abb. 1, 5).

$C_{16}H_{24}O_5$ (296.4) Ber. C 64.84 H 8.16 O 26.99 Gef. C 64.75 H 8.37 O 26.62

Literatur

- 1) E. Jellum, J. Chromatogr. **143**, 427 (1977).
- 2) G. Spiteller, Pure Appl. Chem. **50**, 205 (1978).
- 3) H. L. Bradlow, Steroids **II**, 265 (1968).
- 4) G. K. Brown, O. Stokke und E. Jellum, J. Chromatogr. **145**, 177 (1978).
- 5) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl und W. Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, H 140, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1976.
- 6) Lit. ⁵⁾, C 10.
- 7) Lit. ⁵⁾, C 30, C 170.
- 8) C. J. Pouchert und J. R. Campbell, The Aldrich Library of NMR Spectra, Bd. 8, 4 B, Aldrich Chem. Comp., Milwaukee 1974.
- 9) The Sadtler Standard Spectra, Sadtler Research Laboratories, 1976, NMR 19339 M.
- 10) J. D. Prugh, A. C. Huitric und W. C. McCarthy, J. Org. Chem. **29**, 1991 (1964).
- 11) Lit. ⁸⁾, Bd. 4, 1 B, 8 B, 12 C.
- 12) Lit. ⁸⁾, Bd. 6, 105 B.
- 13) J. B. Stothers, Carbon-13 NMR Spectroscopy, S. 253, 256, Academic Press, New York-London 1972.
- 14) Lit. ⁵⁾, C 85, C 90.
- 15) J. C. Hanson, J. H. C. Naylor, T. Taylor und P. H. Gore, J. Chem. Soc. **1965**, 5984.
- 16) Organikum, Org.-chem. Grundpraktikum, 15. Aufl., S. 209, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1976.
- 17) S. H. McAllister, W. M. A. Bailey jr. und C. M. Bouton, J. Am. Chem. Soc. **62**, 3212 (1940).