

299. Stoffwechsel-Endprodukte von Phyllochinon¹⁾, Menachinon-4¹⁾, Ubichinon-9¹⁾ und Hexahydroplastoquinon-4 (Phytylplastoquinon)

von U. Gloor, J. Würsch, H. Mayer, O. Isler und O. Wiss

(15. X. 66)

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das *d,l*- α -Tocopheramin zu dem gleichen Metaboliten abgebaut wird wie *d,l*- α -Tocopherol [1]. Es handelt sich um ein γ -Lacton, das nach Oxydation des Chromanringes zum Chinon und nach oxydativer Verkürzung der Seitenkette um 13 C-Atome gebildet wird. Dieser Metabolit wurde zuerst von SIMON *et al.* [2] im Harn von Ratten nachgewiesen, wo er als Konjugat, vermutlich als Glucuronid, ausgeschieden wird. Nach Verabreichung von *d,l*- γ -Tocopherol bzw. von *d,l*-N-Methyl- γ -tocopheramin konnte aus Rattenharn der analoge Metabolit isoliert werden [1]. Es konnte auch gezeigt werden, dass in allen Fällen sowohl nach *d,l*- α -Tocopherol, *d,l*- γ -Tocopherol, *d,l*- α -Tocopheramin und *d,l*-N-Methyl- γ -tocopheramin das entsprechende Tocopherolchinon im Stoffwechsel gebildet wird [1]. Es war deshalb nicht überraschend festzustellen, dass auch das α -Tocopherolchinon in den sogenannten SIMON-Metaboliten umgewandelt wird. Die Tatsache, dass nach Verabreichung von α -Tocopherolchinon mehr davon ausgeschieden wird als nach der von α -Tocopherol, macht es wahrscheinlich, dass das α -Tocopherolchinon als Zwischenstufe in der Abbaufolge auftritt.

Es gibt eine Reihe von Wirkstoffen, die ähnliche isoprenoide Seitenketten wie die Tocopherole besitzen. Unterschiede existieren hinsichtlich Länge und Grad der Ungesättigtheit. Von solchen Verbindungen wurden K, MK-4, Hexahydroplastoquinon-4 und Q-9 untersucht mit der Fragestellung, ob sie in analoger Weise wie das α -Tocopherol bzw. Tocopherolchinon zu Stoffwechsel-Endprodukten abgebaut werden.

Die Verbindungen wurden in radioaktiv markierter Form Ratten verabreicht und die gebildeten Metabolite mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode identifiziert. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst.

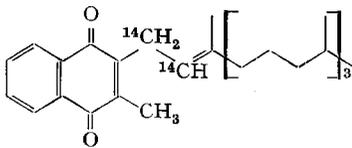
Es geht daraus hervor, dass aus allen untersuchten Substanzen dem SIMON-Metaboliten analoge Stoffwechsel-Endprodukte gebildet werden, unabhängig von der Länge und dem Grad der Ungesättigtheit der Seitenkette. Es zeigt sich somit, dass dem Abbau, wie er zuerst am α -Tocopherol nachgewiesen werden konnte [2], allgemeinere Bedeutung zukommt. Das γ -Lacton wird auch gebildet, wenn anfänglich in der Seitenkette keine Hydroxylgruppe vorliegt. Alle Metabolite werden als Konjugate ausgeschieden. Es ist zu vermuten, dass es sich um Glucuronide handelt, da sich der Metabolit aus *d,l*- α -Tocopherol durch Glucuronidase spalten lässt [2]. Ungeklärt ist die Bindungsstelle der Glucuronsäure. Es kommen in erster Linie die phenolischen Hydroxylgruppen [3] der reduzierten Formen oder die tertiären alkoholischen Hydroxylgruppen der Seitenkette in Betracht.

1) Abkürzungen: Phyllochinon = K; Menachinon-4 = MK-4; Ubichinon-9 = Q-9.

Verabreichte Substanzen und ausgeschiedene Metabolite

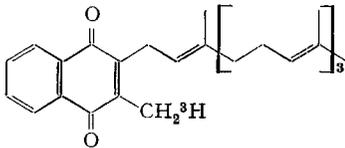
Verabreichte Substanzen

Ausgeschiedene Metabolite im Urin



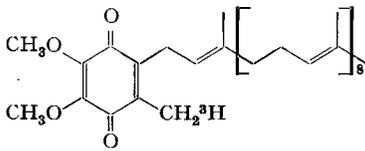
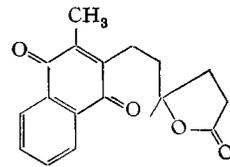
Phyllochinon

13,7 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$



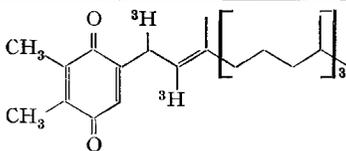
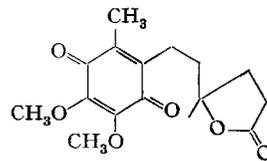
Menachinon-4

160 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$



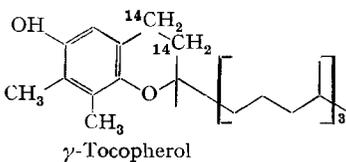
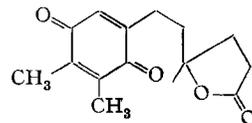
Ubichinon-9

46 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$



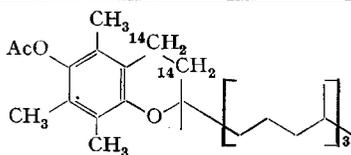
Hexahydroplastochinon-4

355 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$



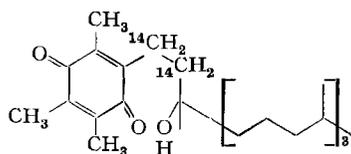
γ -Tocopherol

4,5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$



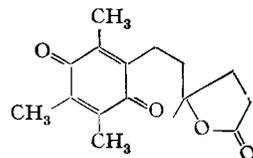
d,l- α -Tocopherylacetat

13,3 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$



d,l- α -Tocopherolchinon

1,4 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$



Experimenteller Teil

1. Synthesen. – Allgemeines. – Die Smp. sind unkorrigiert.

Die *Spektren* wurden in unserer physikalischen Abteilung (Leitung Dr. M. KOFLER) aufgenommen: die UV.-Spektren mit einem CARY-Spektrophotometer, Modell 14, in Feinsprit, die IR.-Spektren mit einem PERKIN-ELMER-Zweistrahlspektrophotometer, Modell 21, und die Kernresonanz-(NMR.)-Spektren mit einem VARIAN-A-60-Spektrometer bei 60 MHz, in CDCl_3 -Lösung. Die Signale sind in Hz angegeben und werden durch folgende Abkürzungen charakterisiert: s (Singlett), m (Multipllett). Die in Klammern angefügten Zahlen bezeichnen die durch elektronische Integration ermittelte, auf- bzw. abgerundete Protonenzahl. Als Bezugssignal diente internes Tetramethylsilan.

Die *Analysen* wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. A. DIRSCHERL) ausgeführt. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Extraktion des Reaktionsgemisches mit Äther, Waschen der ätherischen Lösung mit Wasser (bei Acetylierungen zusätzlich mit 1N Schwefelsäure und verdünnter NaHCO_3 -Lösung) bis zum Neutralpunkt, Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat und Eindampfen im Rotationsverdampfer im Vakuum bei 40–50°.

Hergestellte Verbindungen. – Die Synthesen der markierten Verbindungen sind in ihren Grundzügen schon dargelegt worden [4]. Im einzelnen verliefen sie wie folgt:

Menachinon-4 (Ringmethyl- ^3H) (MK-4). 700 mg (4 mMol) 2-Methyl- ^3H -1,4-naphtochinon mit einer spez. Aktivität von 400 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (hergestellt nach BILLETER & MARTIUS [5]) wurden in einem mit Rührer, Rückflusskühler und Gaseinleitungsrohr versehenen Dreihals-Spitzkolben in 1,7 ml abs. Dioxan gelöst, mit 42 mg wasserfreiem Zinkchlorid und 90 μl Bortrifluorid-ätherat versetzt und unter Argon auf 50° erwärmt. Unter Rühren liess man eine Lösung von 1160 mg (4 mMol) Geranyl-linalool in 1,2 ml Dioxan während 15 Min. eintropfen und rührte dann noch 20 Min. bei 50°.

Man kühlte ab und nahm das Reaktionsgemisch in Petroläther (Sdp. 60–90°) und 75-proz. wässrigem Methanol auf. Man extrahierte die Petrolätherphase fünfmal mit wässrigem Methanol und die Extrakte fortlaufend mit Petroläther. Die vereinigten Petrolätherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Den Rückstand löste man in 10 ml abs. Äther, fügte 600 mg Silberoxid zu und schüttelte das Gemisch 30 Min. bei Raumtemperatur, worauf filtriert und eingedampft wurde. Das erhaltene rohe MK-4 (1610 mg) wurde nun an Kieselgel (MERCK) chromatographiert. Auf einen Vorlauf von 220 mg folgte eine ebenfalls mit Petroläther/Äther 9:1 eluierte Fraktion von 400 mg, die fast die gesamte Menge des gebildeten MK-4 in noch ziemlich unreiner Form enthielt. Man löste diese Fraktion in 1 ml tiefs. Petroläther, kühlte auf –10°, impfte mit *all-trans*-MK-4 an und hielt 1 Std. bei –40°, nachdem die Kristallisation eingesetzt hatte. Man filtrierte ab und wusch die Kristalle mit –40° kaltem Petroläther aus. Man kristallisierte nochmals auf die gleiche Weise um und erhielt schliesslich 100 mg annähernd schmelzpunkt-reines MK-4 mit einer spez. Aktivität von 160 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

2,3-Dimethyl-5-phytyl-[1', 2'- ^3H]-benzochinon. – a) *Isophytol-[1, 2- ^3H].* 2,96 g Dehydroisophytol (10 mMol) wurden in 30 ml Petroläther (Siedebereich 60–90°), der 1% Chinolin enthielt, in Gegenwart von 300 mg LINDLAR-Katalysator bei 6–8° hydriert. Dem Wasserstoff waren 830 μl Tritium (ca. 2 Ci) beigemischt worden. Nach 30 Min. und Aufnahme von 245 ml Wasserstoff kam die Hydrierung zum Stehen. Man filtrierte vom Katalysator und arbeitete auf: Extraktion des Chinolins mit verd. Schwefelsäure, Neutralwaschen mit Wasser. Man erhielt nach dem Eindampfen und Trocknen des Rückstandes 2,972 g Isophytol-[1, 2- ^3H] mit einer spez. Aktivität von 510 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

b) *Kondensation mit 2,3-Dimethylbenzohydrochinon.* 1,015 g Isophytol-[1, 2- ^3H], 2,1 g 2,3-Dimethylbenzohydrochinon und 1 g wasserfreies Zinkchlorid, gelöst in 20 ml abs. Äther, wurden vermischt. Das Hydrochinon löste sich nicht vollständig. Man entfernte den Äther im Rotationsverdampfer, nahm den Rückstand in 24 ml abs. Dioxan auf und kochte 2 Std. unter Rückfluss. Man dampfte das Gemisch im Wasserstrahlvakuum möglichst gut ein und verteilte den Rückstand wie üblich zwischen Petroläther (Siedebereich 60–90°) und Methanol/Wasser 3:1. Die Petrolätherphasen lieferten ein Öl, das in 20 ml abs. Äther gelöst 30 Min. bei Raumtemperatur mit 1,2 g Silberoxid geschüttelt wurde. Die vom Silber abfiltrierte Lösung liess nach dem Abdampfen 1,257 g Substanz zurück. Dieser Rückstand wurde, wie bei Q-9 beschrieben, mittels

präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt. Man erhielt schliesslich 395 mg 2,3-Dimethyl-5-phythyl[1', 2'-³H]-benzochinon mit einer spez. Aktivität von 355 μ Ci/mg und einer Extinktion $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 414$ (252,5 nm, Hexan).

Ubichinon-9 (Ringmethyl-³H) (Q-9). – a) *Herstellung der markierten Ringkomponente, 5,6-Dimethoxy-3-methyl-³H-1,4-benzochinon.* 2,16 g (10 mMol) 3,4,5-Trimethoxybenzylchlorid wurden in 24 ml einer Lösung von 3 g KOH in 100 ml Methanol in Gegenwart von 200 mg Palladiumkohle (5%) mit tritiumhaltigem Wasserstoff hydrogenolysiert. Die Wasserstoffaufnahme war nach 15 Min. beendet. Man filtrierte vom Katalysator ab und arbeitete in ätherischer Lösung auf. Das im Wasserstrahlvakuum bei 130–135° destillierte Rohprodukt lieferte 1,445 g T-markiertes 3,4,5-Trimethoxytoluol.

Man löste dieses in 11 ml Alkohol, kühlte auf 0° und liess unter Rühren eine filtrierte Lösung von 1,55 g diazotiertem *p*-Nitroanilin in ca. 20 ml innert 30 Min. eintropfen. Nachdem während 40 Std. bei Zimmertemperatur weitergerührt worden war, filtrierte man das ausgefallene Material ab, kristallisierte aus 90-proz. Alkohol um und erhielt 1,724 g 2,3,4-Trimethoxy-6-methyl-³H-4'-nitroazobenzol.

Man löste es in 10 ml Methanol und hydrierte in Gegenwart von 200 mg Palladiumkohle (5-proz.). Innert 1 Std. wurden 650 ml Wasserstoff (23°, 740 Torr) aufgenommen. Die filtrierte Lösung wurde zur Trockne eingedampft. Unter möglichstem gutem Luftausschluss extrahierte man das 4,5,6-Trimethoxy-*o*-toluidin mit 3 und 2 ml Äther aus einem Gemisch mit dem schwerer löslichen *p*-Phenylendiamin.

Es wurden auf diese Weise 1,070 g des gewünschten Produktes erhalten, das man, in 10 ml 3*N* Schwefelsäure gelöst, in einem Dreihalskolben unter Rühren und Begasung mit Argon während 45 Min. mit einer Lösung von 750 mg Kaliumdichromat in 30 ml Wasser bei 23–25° versetzte. Man rührte noch 30 Min., kühlte dann im Eisbad ab, nutschte nach 15 Min. ab und wusch mit wenig kaltem Wasser. Man kristallisierte das Produkt aus 8 ml Petroläther (Siedebereich 60–90°) um und erhielt nach zusätzlicher Aufarbeitung der Mutterlaugen insgesamt 737 mg 5,6-Dimethoxy-3-methyl-³H-1,4-benzochinon, das durch katalytische Hydrierung in methanolischer Lösung über Palladiumkohle in das Hydrochinon übergeführt wurde. Der kristalline Eindampfrückstand aus dieser Operation wurde in einem Rundkolben während 30 Min. im Hochvakuum bei 40° getrocknet.

b) *Kondensation mit Solanesol.* Man fügte 500 mg reines natürliches Solanesol und 250 mg wasserfreies, in 5 ml abs. Äther gelöstes Zinkchlorid zum trockenen Hydrochinon, schwenkte um bis alles in Lösung gegangen war und dampfte im Wasserstrahlvakuum ein. Das dickflüssige Material wurde im evakuierten, verschlossenen Kolben während 20 Min. bei 45° gehalten, dann abgekühlt, zwischen hochsiedendem Petroläther und 75-proz. wässrigem Methanol verteilt und wie bei MK-4 beschrieben aufgearbeitet. Die Petrolätherphasen lieferten nach dem Eindampfen ein Öl, das, in 5 ml abs. Äther gelöst, 1 Std. bei Zimmertemperatur mit 300 mg Silberoxid geschüttelt wurde. Man trennte das Silber ab und dampfte zur Trockne ein. Chromatographie des Rückstandes an Silicagel lieferte 450 mg rohes Ubichinon-9, das noch nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Man unterzog es einer präparativen Dünnschichtchromatographie auf einer 1 m langen Platte (Silicagel, Laufmittel tiefs. Petroläther/Äther 9:1). Die dabei erhaltenen 270 mg Konzentrat lieferten nach zweimaliger Kristallisation aus Aceton/Methanol bei –10° 179 mg Q-9 (Ringmethyl-³H) mit einer Extinktion $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 177$ (270 nm, Hexan). Die spez. Aktivität betrug 46 μ Ci/mg.

Phyllochinon-¹⁴C (K) [6]. In einem trockenen, mit Rührer, Rückflusskühler und Gaseinleitungsrohr versehenen Dreihals-Spitzkolben legte man 390 mg 1-O-Benzoyl-2-methyl-napthohydrochinon und 2 ml trockenen peroxidfreien Dibutyläther vor, erwärmte unter Argon auf 100°, gab unter gutem Rühren zuerst 20 μ l frisch destilliertes Bortrifluorid-ätherat zu und liess dann während 5 Min. eine Lösung von 234 mg Isophytol-[1, 2-¹⁴C] [7] (ca. 5 mCi) in 1 ml Dibutyläther eintropfen. Man spülte mit 0,5 ml Dibutyläther nach, rührte noch 10 Min. bei 100° und kühlte dann ab.

Die Mischung wurde mit Dibutyläther in einen Scheidetrichter gebracht, wo sie mit Wasser, 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und wieder mit Wasser gewaschen wurde, unter Rück-

extraktion der wässrigen Waschflüssigkeiten mit Dibutyläther. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Wasserstrahlvakuum bei 50° abgedampft. Man fügte 2 ml hochsiedenden Petroläther zum Rückstand und liess während 30 Min. bei 0° kristallisieren. Das ausgefallene überschüssige 1-O-Benzoyl-2-methyl-naphthohydrochinon wurde dann abgenutscht und mit 5 ml kaltem Petroläther ausgewaschen. Der letztere wurde eingedampft und der Rückstand zwischen Petroläther und Methanol/Wasser 9:1 verteilt. Die vereinigten Petrolätherphasen wurden eingedampft. Die Lösung des Rückstandes in 20 ml hochsiedendem Petroläther wurde bei 0° fünfmal mit je 2 ml 2-proz. methanolisch-wässriger (95:5), auf -10° gekühlter Kalilauge ausgezogen. Diese Auszüge wurden mit 6 ml Petroläther extrahiert (Petroläther verworfen) und dann nach Ansäuern mit 0,4 ml Eisessig und Verdünnen mit 10 ml Wasser gründlich mit Petroläther extrahiert, die Petrolätherphase neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Man erhielt 400 mg 1-O-Benzoyl-phyllhydrochinon.

Unter guter Begasung mit Argon und Rühren wurde dieses Produkt in einem Dreihals-Spitzkolben nach Zusatz von 3 ml hochsiedendem Petroläther, 3 ml methanolischer Kalilauge (3,6 g KOH, 2,5 ml Wasser, mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt) und 0,3 ml Natriumdithionit-Lösung (0,5 g Na₂S₂O₄ in 10 ml H₂O) während 1 Std. bei Zimmertemperatur verseift. Nach Trennung der Phasen pipettierte man unter ständiger intensiver Begasung die obere Schicht ab, fügte noch zweimal je 5 ml mit Dithionitlösung vorbehandelten Petroläther hinzu, rührte um und pipettierte nach der Phasentrennung erneut ab. Nun überschichtete man mit 10 ml Petroläther und saugte ohne Rühren während 10 Min. mit der Wasserstrahlpumpe Luft, die durch ein bis auf die tiefste Stelle des Spitzkolbens reichendes Glasrohr eintrat, durch das Reaktionsgemisch. Nach 7 Min. schlug die grüne Zwischenfarbe nach Rotbraun um. Man extrahierte im Scheidetrichter mit Petroläther, wusch letzteren neutral, trocknete über Natriumsulfat und dampfte ein. Das Rohprodukt wurde an neutralem Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe III gereinigt. Man wusch die Säule bis zum Auftreten von K im Eluat zunächst mit Petroläther und eluierte dann das K mit Petroläther/Äther 9:1, wobei man 230 mg K-[¹⁴C] in einer Ausbeute von 64%, bezogen auf Isophytol-[¹⁴C], erhielt. Die spez. Aktivität betrug 13,7 µCi/mg, die Extinktion E_{1cm}^{1%} 414 (248 nm, Hexan).

d,l-α-Tocopherol-[1',2'-¹⁴C]-chinon. 16,8 mg *d,l*-α-Tocopheryl-[3,4-¹⁴C]-acetat [1] mit einer spez. Aktivität von 13,3 µCi/mg wurden mit LiAlH₄ reaktiv gespalten [8]. Die so erhaltenen 16 mg ¹⁴C-markiertes Tocopherol wurden mit 97 mg inaktivem *d,l*-α-Tocopherol verdünnt und an Aluminiumoxid (neutral, Aktivität I, mit 7% H₂O desaktiviert) chromatographiert. Mit Petroläther/Äther 98:2 und 95:5 wurden 110 mg reines Tocopherol eluiert, das man in 10 ml Äther löste, fünfzehnmal mit je 5 ml Eisen(III)-chlorid-Lösung (13,2 g FeCl₃·6H₂O wurden in 50 ml H₂O gelöst und 50 ml Methanol zugegeben) schüttelte und über Nacht stehen liess. Die Ätherphase wurde neutral gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand an 5 g Aluminiumoxid (neutral, Aktivität I, mit 7% H₂O desaktiviert) chromatographiert. Petroläther/Äther 80:20 eluierte 105 mg reines *d,l*-α-Tocopherolchinon mit einer spez. Aktivität von 1,4 µCi/mg.

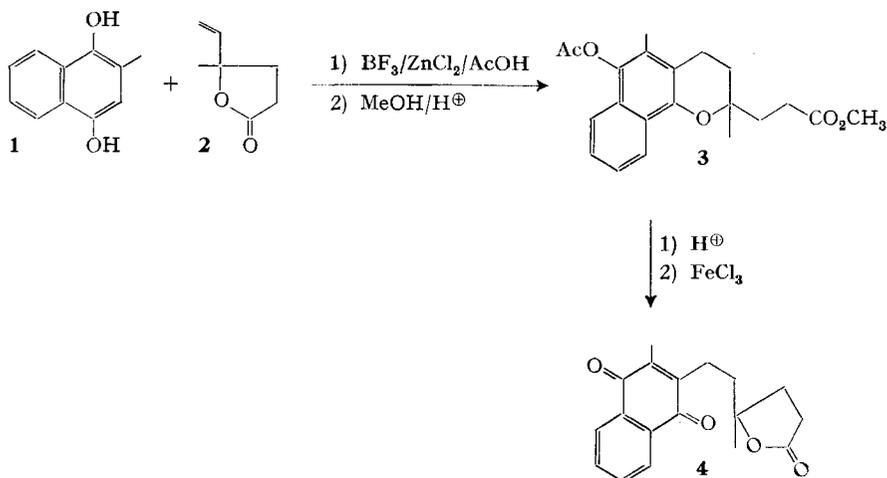
6-Acetoxy-2-(β-carbomethoxyäthyl)-3,4-dihydro-2,5-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]-[pyran (3). Man erhitzte das Gemisch aus 52,2 g (0,3 Mol) 2-Methyl-1,4-naphthohydrochinon (1), 25,2 g (0,2 Mol) γ-Vinyl-γ-valerolacton (2), 430 ml Eisessig, 47,5 g Zinkchlorid (wasserfrei), 8 g Bortrifluorid-ätherat und 40 ml Acetanhydrid in einer Stickstoffatmosphäre 6 Std. unter Rühren auf 120°. Nach dem Abkühlen goss man auf Eiswasser, extrahierte mit Äther und arbeitete wie üblich auf. Der ölige, braune Rückstand (69 g) wurde in einem Gemisch aus 420 ml trockenem Äthylenchlorid und 100 ml abs. Methanol gelöst, unter Umschütteln mit 2,5 ml konz. Schwefelsäure versetzt und 3 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen goss man auf Eis, extrahierte mit Äther und arbeitete wie üblich auf, wobei man 68 g braunes Öl erhielt, das in 70 ml Pyridin und 70 ml Essigsäureanhydrid gelöst wurde. Nach 16-stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur arbeitete man wie üblich auf. Es resultierten 64,5 g rotbraunes Öl, das an 1,75 kg Aluminiumoxid (CAMAG, neutral, Aktivität III) chromatographiert wurde. Petroläther (Sdp. 60–90°)/Benzol (1:4) eluierten 22,5 g zähes farbloses Öl, das beim Anreiben mit Benzol/Petroläther kristallisierte. 12,25 g (17%) farblose Kristalle vom Smp. 103–105°. Aus Benzol/Petroläther Smp. 104,5–106°. – UV.-Maxima bei

302, 313, 327 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 159, 139, 105$). IR.-Spektrum (KBr): 5,73, 6,35, 8,22 8,65 μ (Ester); 6,12, 6,27, 6,66 μ (Aromat); 13,0 μ (*o*-disubst. Benzol). NMR.-Spektrum: 79/s (3) CH_3 -2; 129/s (3) CH_3 -5; 145/s (3) OAc; 217/s (3) COOCH_3 ; 432-495/m (4) H an Aromat.

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5$ (356,4) Ber. C 70,76 H 6,79% Gef. C 70,76 H 6,77%

2-[β -(2-Methyl-5-oxo-tetrahydro-2-furyl)- α thyl]-3-methyl-1,4-naphthochinon (4). Man versetzte die Lösung von 5 g 3 in 75 ml Dioxan mit einem Gemisch aus 5 ml Wasser und 5 ml konz. Schwefelsäure und kochte in einer Stickstoffatmosphäre 3 Std. unter Rückfluss. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit Wasser und arbeitete wie üblich auf, wobei man 4,2 g rotbraunes zähes Öl erhielt. Zu der Lösung dieses Öls in 100 ml Methanol wurden bei Raumtemperatur unter Rühren in 10 Min. 110 ml einer Lösung von 22,5 Ferrichlorid-hexahydrat in 85 ml Wasser und 85 ml Methanol getropft. Man rührte noch 2 Std. bei Raumtemperatur, dampfte dann den Hauptteil des Methanols im Vakuum ab, sättigte mit Ammoniumchlorid und arbeitete wie üblich auf. Man erhielt 3,8 g (89%) langsam kristallisierendes, rotbraunes Öl. Aus Benzol/Petroläther 2,9 g (70%) gelbe Kristalle vom Smp. 93-95°. - UV-Maxima bei 245, 253, 271 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 573, 555, 569$). IR.-Spektrum (KBr): 5,66 μ (γ -Lacton); 6,04 μ (Chinon); 6,19, 6,27 μ (Aromat). NMR.-Spektrum: 91/s (3) CH_3 -4; 132/s (3) CH_3 an Chinon; 455-490/m (4) H an Aromat.

$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (298,3) Ber. C 72,46 H 6,08% Gef. 72,52 H 6,22%



2. Isolierungsversuche. - Die Isolierungsversuche wurden von Frau K. SCHIEDT durchgeführt. - Für die Ausscheidungsversuche wurden Ratten von ca. 150 g Körpergewicht verwendet und vor der oralen Verabreichung über Nacht nüchtern gehalten.

Die verschiedenen Substanzen wurden in einer Dosierung von 2 mg/Tier als Emulsion in 0,5 ml TWEEN 80/physiol. NaCl-Lösung (5% TWEEN 80-Endkonzentration) verabreicht. Eine Ausnahme bildete das *d,l*- α -Tocopherolchinon, von dem wegen seiner geringeren spezifischen Aktivität 10 mg /Tier gegeben wurden.

Der Urin wurde während drei Tagen bei Trockenciskühlung gesammelt und die ausgeschiedene Aktivität, sowohl diejenige im Frischharn als auch die der isolierten Metabolite, nach Verbrennung [9] und anschließender Messung im TRI-CARB-Scintillationszähler 314 A bei einer Zählausbeute von 43% für ^{14}C und 9% für ^3H bestimmt.

Isolierung der Metabolite aus dem Harn. - a) Nach Verabreichung von ^{14}C -markiertem Phyllochinon. Der Drei-Tage-Harn von zwei Ratten wurde durch Dicalite SPEEDEX filtriert und auf 50 ml im Rotationsverdampfer bei 45° konzentriert. Davon wurde $^{1/100}$ präparativ auf eine Silicagel-Platte aufgetropft und in dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Äther/Äthanol 16:4:3

entwickelt. Analog zu Versuchen mit α -Tocopherol [10] blieb die ganze Aktivität am Start, so dass angenommen werden kann, dass es sich auch hier um ein Konjugat, vermutlich ein Glucuronid, handelt.

Zur Spaltung des Konjugats wurden nach Zusatz von 17 mg 2-[β -(2-Methyl-5-oxo-tetrahydro-2-furyl)-äthyl]-3-methyl-1,4-naphtochinon (4) dem Harn-Konzentrat 50 ml 6N HCl zugegeben und $1\frac{1}{2}$ Std. bei 75° unter N₂ und Rückfluss hydrolysiert. Es wurde dreimal mit Essigester extrahiert, die vereinigten Extrakte neutral gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand (48 mg) präparativ auf sieben Silicagel-Platten mit 2% ZS Super in dem oben genannten System aufgetrennt. Der Metabolit-Streifen wurde unter der kurzwelligen UV.-Lampe bezeichnet (Rf-Wert 0,4), abgekratzt und mit Äther/Äthanol 1:1 eluiert. Dieser Streifen enthielt nun die Hauptaktivität. Anhand des UV.-Spektrums in Feinsprit (Max. 270 nm) wurde der Gehalt an Metabolit berechnet. Dabei zeigte sich, dass nur noch ca. 40% des ursprünglich als Träger zugesetzten Metaboliten vorhanden waren. Offenbar wird durch die Hydrolyse des Harns ein wesentlicher Teil zerstört. Parallel zu diesem Verlust geht ein Verlust an Radioaktivität.

Der Rückstand des dünn-schichtchromatographisch gereinigten Metaboliten wurde zusammen mit 148 mg Träger aus Äthanol bei 4° bis zu einem konstanten Smp. von 95-97° und einer konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert.

b) Nach Verabreichung von ³H-markiertem Menachinon-4 konnte der gleiche Metabolit wie nach Gabe von K in analoger Weise wie in Versuch a) isoliert werden.

Die vier Kristallisate zeigten eine konstante spezifische Aktivität.

c) Nach Verabreichung von [¹⁴C]-d,l- α -Tocopherolchinon wurde der dem α -Tocopherol entsprechende «SIMON-Metabolit» in Analogie zu früheren Versuchen [1] isoliert. Er wurde ebenfalls bis zu einer konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert.

d) Nach Verabreichung von [³H]-Hexahydroplastochinon-4 wurde der dem γ -Tocopherol entsprechende «SIMON-Metabolit» in Analogie zu früheren Versuchen [1] isoliert. Er wurde bis zu einer konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert.

e) Nach Verabreichung von [³H]-Ubichinon-9 wurde die Aufarbeitung des Harns leicht modifiziert: Der Drei-Tage-Harn von zwei Ratten wurde auf 20 ml konzentriert. Davon wurde 0,2 ml präparativ auf einer Silicagel-Platte mit 2% ZS Super in dem Lösungsmittelgemisch Cyclohexan/Äther/Äthanol 15:5:5 aufgetrennt. Die gesamte Radioaktivität blieb am Start, so dass es sich auch hier um ein Konjugat handeln muss, das hydrolytisch gespalten werden kann.

20 ml Urin-Konzentrat wurden zu 80 g Na₂SO₄ getropft. Das Ganze wurde zu einem homogenen Pulver verrieben, das man nach Zusatz von 10 mg 2-[β -(2-Methyl-5-oxo-tetrahydro-2-furyl)-äthyl]-5,6-dimethoxy-1-methyl-benzochinon [11] als Träger mit 150 ml destilliertem Aceton 3 Std. schüttelte und anschließend über Nacht unter N₂ stehen liess. Dann wurde abgenutscht und nochmals eine Stunde mit 50 ml Aceton stengelassen. Die beiden vereinigten Filtrate ergaben einen Rückstand von 3 g.

Die Hydrolyse erfolgte mit 50 ml 1,5N HCl unter N₂ bei 75° während $1\frac{1}{2}$ Std. Dann wurde zweimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft; 69 mg Rückstand, der 75% der Radioaktivität des Aceton-Extrakts enthielt. Dieser Rückstand wurde auf 5 Silicagel-Platten mit 2% ZS Super in dem oben genannten System aufgetrennt. Der Ubichinon-Metabolit-Streifen (Rf-Wert 0,35) wurde unter der kurzwelligen UV.-Lampe bezeichnet, abgekratzt und mit Äthanol eluiert. Die Hauptaktivität lag nun in diesem Streifen vor. Anhand des UV.-Spektrums in Feinsprit (Max. 276 nm) liess sich ein Gehalt von 74% des ursprünglich als Träger zugesetzten Metaboliten berechnen.

Da der Ubichinon-Metabolit nicht kristallin ist, musste ein kristallines Derivat dargestellt werden.

Reduzierende Acetylierung: Der dünn-schichtchromatographisch gereinigte Ubichinon-Metabolit wurde zusammen mit weiteren 200 mg Träger nach Zusatz von 200 mg Zinkstaub, 10 ml Essigsäureanhydrid und 2 ml abs. Triäthylamin 15 Min. bei 90° unter N₂ und Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde durch Glaswatte filtriert und mit Äther nachgewaschen. Das Reaktionsgemisch

wurde zweimal mit je 10 ml 0,3 N HCl, dann mit Wasser neutral gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Abdampfen des Äthers erhielt man 259 mg rohes Dihydro-diacetat, das an Aluminiumoxid (neutral, Aktivität I, mit 7% H₂O desaktiviert) chromatographiert wurde. Mit Petroil-äther/Äther 1:1 liessen sich 206 mg dünn-schichtchromatographisch reiner Ester gewinnen, der viermal aus 80-proz. Äthanol bei 4° umkristallisiert wurde.

Die vier Kristallisate zeigten einen konstanten Smp. von 97–99° und eine konstant bleibende spezifische Aktivität.

SUMMARY

Phylloquinone, menaquinone-4, ubiquinone-9 and hexahydroplastoquinone-4, *i.e.* compounds with isoprenoid side-chains which differ by their length and degree of unsaturation, are degraded in the rat in the same way as tocopherols. After oxidative shortening of the side-chain to seven C-atoms, the metabolites are excreted in the urine as conjugates, presumably glucuronides, which, after hydrolysis, can be isolated as γ -lactones.

Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A.G.,
Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] U. GLOOR, J. WÜRSCH, U. SCHWIETER & O. WISS, *Helv.* **49**, 2303 (1966).
 - [2] E. J. SIMON, CH. S. GROSS & A. T. MILHORAT, *J. biol. Chemistry* **221**, 797 (1956).
 - [3] E. J. SIMON, E. EISENGART, L. SUNDHEIM & A. T. MILHORAT, *J. biol. Chemistry* **221**, 807 (1956).
 - [4] O. ISLER, H. MAYER, R. RÜEGG & J. WÜRSCH, *Vitamins & Hormones* **24** (1966), im Druck.
 - [5] M. BILLETER & C. MARTIUS, *Biochem. Z.* **333**, 430 (1960).
 - [6] H. LINDLAR, U.S. Pat. 2839570 (Priority 12. 8. 1953).
 - [7] J. WÜRSCH, *Atompraxis* **7**, 463 (1961).
 - [8] D. E. DUGGAN, *Arch. Biochem. Biophysics* **84**, 116 (1959).
 - [9] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Helv.* **44**, 1956 (1961).
 - [10] F. WEBER & O. WISS, *Helv. physiol. Acta* **21**, 131 (1963).
 - [11] L. BLÁHA & J. WEICHET, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* **30**, 2068 (1965).
-