

# Über ein Auftreten von (+)-*p*-Menthen-(1)-diol-(8.9) im Humanharn

Von

**Rudolf Tschesche und Ingolf Duphorn**

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Bonn

und **Karl Gelissen**

Aus der Universitäts-Kinderklinik Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. Hungerland)

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. Januar 1966)

1956 berichtete Kodicek<sup>1</sup> über den Nachweis von Steroiden im Harn von Patienten mit einer sog. Vitamin-D-resistenten Rachitis, die er bei gesunden Vergleichspersonen nicht feststellen konnte. Bei der Nachprüfung dieser Befunde bei einem 7jährigen Mädchen mit der gleichen Erkrankung konnten wir im dünn-schichtchromatographischen Vergleich mit den entsprechenden Harnextrakten der Eltern, der drei Geschwister und 17 älterer „normaler“ Kinder keinen Hinweis für das Auftreten der von Kodicek erwähnten Steroide finden. Dagegen ließen sich im Harn unserer Patientin sowohl nach saurer Hydrolyse als auch nach enzymatischer Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase im Ätherextrakt beträchtliche Mengen einer Substanz nachweisen, die als (+)-*p*-Menthen-(1)-diol-(8.9) (Ia) erkannt wurde. Diese Substanz wurde in geringer Menge mit einer Ausnahme bei allen erwähnten Vergleichspersonen gefunden, bei einem Kind mit einem sog. braunen (Riesenzell-)Tumor ebenfalls in größerer Menge, während von 7 Säuglingen nur einer sicher Ia und ein anderer fraglich Ia ausschieden. In allen Fällen waren die applizierten Medikamente bekannt. Es konnte ausgeschlossen werden, daß Ia das Ausscheidungsprodukt eines dieser Medikamente darstellte.

Da cyclische Monoterpene bisher nur im Pflanzenreich gefunden wurden, erscheint es naheliegend zu vermuten, daß es sich bei Ia um ein im menschlichen Körper umgewandeltes Monoterpene pflanzlichen Ursprungs handeln könnte. So wurde bereits vor über 50 Jahren festgestellt<sup>2, 3</sup>, daß cyclische Terpene nach eventueller Oxydation zu Monohydroxyderivaten vom tierischen Organismus als Glucuronide ausgeschieden werden. Auch Ia dürfte als Glucuronid vorliegen, da es sich aus dem Harn erst nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase durch Äther extrahieren läßt. Die Bildung von Ia wäre in diesem Sinne z. B. durch eine Hydroxylierung der  $\Delta^8$ -Doppelbindung von Limonen zu erklären.

<sup>1</sup> E. Kodicek in Ciba Foundation Symposium on Bone Structure and Metabolism, S. 201 ff., J. & A. Churchill Ltd., London 1956.

<sup>2</sup> J. Hämäläinen, Skand. Arch. Physiol. **29**, 60 [1913]; **27**, 141 [1912].

<sup>3</sup> E. Fromm u. H. Hildebrandt, diese Z. **33**, 579 [1902]; H. Hildebrandt, ebenda **36**, 452 [1902].

Interessant dabei ist das Auftreten der 8.9-Glykolgruppierung in der Isopropylseitenkette, die bisher bei natürlich vorkommenden Monoterpenen noch nicht beobachtet worden ist<sup>4</sup>. Da die Verbindung aber in über 90% der untersuchten Fälle auftrat, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um einen Metaboliten der Isoprenoid-Biosynthese handelt (entstanden durch Cyclisierung auf der C<sub>10</sub>-Stufe). Irgendwelche Zusammenhänge zwischen Stoffwechselstörungen und dem vermehrten Auftreten von Ia sind aber bisher nicht bewiesen.

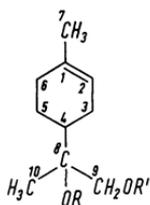
(+)-*p*-Menthen-(1)-diol-(8.9) (Ia) läßt sich im Ätherextrakt des hydrolysierten Harns mittels der Dünnschichtchromatographie einfach nachweisen: Beim Besprühen der heißen Platte mit Vanillin-Phosphorsäure treten sofort leuchtend violette Flecke auf, die etwa auf der Höhe des Cortisons liegen (System f, s. exp. Teil). Die Substanz wurde aus dem Ätherextrakt durch wiederholte Chromatographie an Kieselgel als farb- und geruchloses, rechtsdrehendes Öl gewonnen.

Erste Anhaltspunkte über die Natur von Ia lieferte das Massenspektrum: es zeigte neben einem sehr schwachen Molekularion ( $m/e = 170$ , entsprechend C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>) markante Peaks bei  $m/e = 152$  (M - 18), 139 (M - 31, Verlust von CH<sub>2</sub>OH) und 121 (139 - 18). Hieraus ließ sich bereits das Vorhandensein von zwei Hydroxylgruppen, von denen eine primär ist, ableiten. Das Vorliegen einer Doppelbindung wurde durch die positive Tetranitromethanprobe, die katalytische Hydrierung an Platin sowie das Massenspektrum der gesättigten Verbindung II bewiesen:  $m/e = 173$  (M + 1)<sup>5</sup>, 172 (M<sup>+</sup>), 141 (M - 31) und 123 (141 - 18). Damit war gleichzeitig eine Ringstruktur in Ia sichergestellt. Die Beobachtung<sup>5</sup>, daß die Massenspektren cyclischer Monoterpene nur sehr schwache oder überhaupt keine Molekularionen aufweisen, ließ sich bestätigen. Im Falle der ungesättigten Verbindungen (Diol, Mono- und Diacetat) trat der Base-Peak jeweils bei  $m/e = 43$  auf, während bei den gesättigten Verbindungen die Fragmentierung durch Verluste in oder von der gesamten Seitenkette bestimmt wurde.

Die Protonen-Resonanz-Spektroskopie von Ia zeigt zwei Methylsingulets bei  $\tau = 8,95$  (entsprechend  $\begin{matrix} \text{R} \\ \text{R}' \diagdown \\ \text{C} \\ \text{R}'' \diagup \end{matrix} \text{—CH}_3$ ) und  $\tau = 8,38$  ( $\begin{matrix} \text{R} \\ \text{R}' \diagdown \\ \text{C} \\ \text{R}'' \diagup \end{matrix} \text{—CH}_3$ ), eine  $\begin{matrix} \text{R} \\ \text{R}' \diagdown \\ \text{C} \\ \text{R}'' \diagup \end{matrix} \text{—CH}_2\text{OH}$ -Gruppierung bei  $\tau = 6,57$  als Singulett und ein Vinylproton bei  $\tau = 4,58$ . Nach der Hydrierung zu II war

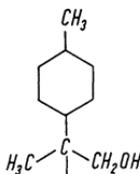
<sup>4</sup> Ia und seine Acetylderivate wurden durch Umsetzung von Terpenen mit Bleitetraacetat erhalten: Y. Ogata u. Y. Matsubara, J. chem. Soc. Japan, ind. chem. Sect. [Kōgyō Kagaku Zasshi] **56**, 775 [1953]; Y. Matsubara, J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. [Nippon Kagaku Zasshi] **75**, 809 [1954]; T. Aratani, ebenda **80**, 528 [1959].

<sup>5</sup> E. v. Sydow, Acta chem. skand. **17**, 2504 [1963].

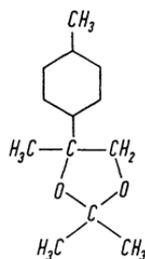


I a, b, c

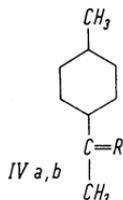
a: R-R'-H

b: R-H; R'-CO·CH<sub>3</sub>c: R-R'=CO·CH<sub>3</sub>

II



III



IV a, b

a: R=O

b: R=N·NH·C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

das Methylsignal bei  $\tau = 8,38$  durch ein Dublett bei  $\tau = 9,05$  ersetzt worden. Aus Ia ließen sich unter milden Bedingungen das Monoacetat Ib und bei erhöhter Temperatur das Diacetat Ic gewinnen. Da sich bei Ic ein Methylsignal des Diols ( $\tau = 8,95$ ) verschiebt ( $\tau = 8,67$ ), war die  $\alpha$ -Stellung einer Hydroxylgruppe bewiesen. Aus diesen Daten ließ sich

bereits die Struktur der Seitenkette als zu  $\text{R}-\text{C} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{OH} \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{matrix}$  ableiten.

Wie erwartet, bildete die hydrierte Verbindung II glatt das Acetonid III und mit Perjodsäure das Methylketon IV a. Das gleiche Keton wurde durch katalytische Hydrierung von *p*-Methyl-acetophenon erhalten und in Form des 2,4-Dinitro-phenylhydrazons mit IV b verglichen. Beide Verbindungen stimmten in ihren physikalischen Eigenschaften überein. Damit ist die Struktur von Ia als *p*-Menthen-(1)-diol-(8.9) bewiesen, unklar bleibt jedoch noch die Stereochemie an den beiden Asymmetriezentren C-4 und C-8.

Wir danken Herrn Dr. H. W. Fehlhaber für die Anfertigung der Massenspektren mit dem Atlas-Massenspektrometer CH 4 (Atlas-Werke, Bremen), für die zur Verfügungstellung dieses Apparates sind wir der Volkswagen-Stiftung zu großem Dank verpflichtet.

### Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden am Mikroskop-Heiztisch nach C. Weygand bestimmt, die optischen Drehungen mit dem Polarimeter 141 von Perkin-Elmer in Chloroform gemessen.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit nachstehenden Geräten: Perkin-Elmer 21 und 221 (mit Gitter-Prismen-Austauscheinheit) (IR), Varian A 60 (in Tetrachlorkohlenstoff mit Tetramethylsilan als Bezugssubstanz [ $\tau_{\text{TMS}} = 10,000$ ]) (KMR) und MS CH-4 von Atlas mit Ionenquelle TO-4 und Gaskasten (Massen-

spektralen). Für die Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel G und H (Merck) verwendet, die Detektion der Flecke erfolgte mit einer konzentrierten Lösung von Vanillin in 80proz. Phosphorsäure<sup>6</sup>. Die Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel (63—90  $\mu$ ) der Fa. Gebr. Herrmann, Köln, durchgeführt.

Gewinnung der Lipoidanteile: Die Aufbereitung des Harns erfolgte entweder nach a) oder b).

a) 100 ml der Harnprobe wurden filtriert, mit 10 ml konz. Salzsäure versetzt und 15 Min. auf einen siedenden Wasserbad erhitzt. Die Lösung wurde anschließend in einem Eisbad abgekühlt, dreimal mit je 50 ml Äther extrahiert, die äther. Phase mit Wasser, 2N NaOH und dann wieder mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde der Äther an der Wasserstrahlpumpe entfernt.

b) 100 ml der gefilterten Probe wurden mit 0,1 ml „Schneckenferment“ ( $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase, „Suc *D'Helix Pomatia*“ der Industrie Biologique Francaise S. A., Gennevilliers/Seine) inkubiert und drei Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde wie unter a) aufgearbeitet.

Dünnschichtchromatographie: Folgende Fließmittel wurden verwendet, um insbesondere auch Steroide zu erfassen: a) Petroläther (80—110°), b) Benzol, c) Chloroform, d) Diisopropyläther, e) Diisopropyläther/Äthylacetat 5:2, f) Chloroform/Methanol/Wasser 188:12:1, g) Äthylacetat/Chloroform/Wasser 90:10:1, h) Cyclohexan/Äthylacetat/Äthanol 45:45:10, i) Cyclohexan/Äthylacetat 1:1, k) Hexan (mit Wasser gesätt.)/Äthylacetat/Äthanol 15:80:5, l) Benzol/Methanol 17:3 und m) Benzol/Methanol 16:4. Die Systeme f, l und m ergaben eine gute Trennung des *p*-Menthendiols von den Steroiden ( $R_F$ -Werte 0,2, 0,4, 0,5).

Präparative Trennung: Durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel H (Merck) mit den Fließmitteln f und m konnten kleinere Mengen des Ätherextraktes rasch getrennt werden. Für größere Mengen (>100 mg) wurden Kieselgelsäulen verwendet. Das Verhältnis Kieselgel/Substanz war hierbei etwa 100:1. Eluiert wurde mit Petroläther, dem allmählich steigende Mengen Benzol zugesetzt wurden und schließlich mit Benzol/Methanol 99:1. Die Kontrolle der Fraktionen erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. 1,3 g Ätherextrakt ergaben in einem Fall 225 mg *p*-Menthendiol.

#### (+)-*p*-Menthen-(1)-diol-(8.9) (Ia)

Die Verbindung wurde nach mehrmaliger Reinigung an Kieselgel als farb- und geruchloses, rechtsdrehendes Öl erhalten, leicht löslich in den gebräuchlichen organ. Lösungsmitteln, mäßig löslich in Methanol, schwer löslich in Wasser. Die Probe mit Tetranitromethan war positiv. Das UV-Spektrum zeigte oberhalb 200  $m\mu$  keine Absorption.

Optische Drehung:  $\lambda[m\mu]$  589 578 546 436 365  
( $c = 1,00$ )  $[\alpha]_D^{20}$  +99° +103° +117° +203° +320°

IR-Spektrum (in Chloroform): OH-Banden bei 3610, 3570 und 3430  $cm^{-1}$ , keine Carbonylbanden.

KMR-Spektrum:	$\tau$	Multiplizität	Protonenzahl	Protonen an
	4,58	Multipllett	1	C-2
	6,10		2	OH
	6,57	Singulett	2	C-9
	8,12		7	
	8,38	Singulett	3	C-7
	8,95	Singulett	3	C-10

Massenspektrum:  $C_{10}H_{18}O_2$  (170,24)  $m/e = 170$  (M<sup>+</sup>), 169, 168, 155, 152, 139, 121, 95/94, 75, 43 (Base-peak)

<sup>6</sup> B. P. Lisboa, J. Chromatogr. [Amsterdam] 16, 136 [1964].

9-Acetoxy-*p*-menthen-(1)-ol-(8) (Ib)

105 mg Ia werden mit 2 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lösung wurde mit 10 ml Wasser versetzt und anschließend 5mal mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden mit 2N HCl und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und an der Wasserstrahlpumpe eingengt. Nach Chromatographie an Kieselgel mit Benzol wurden 73 mg des Monoacetats Ib neben 21 mg des Diacetats Ic (s. u.) erhalten.

Optische Drehung:  $\lambda$ [m $\mu$ ] 589      578      546      436      365  
( $c = 1,00$ )       $[\alpha]_D^{20}$  +66°    +62°    +72°    +123°    —

IR-Spektrum (in CCl<sub>4</sub>): 3600 cm<sup>-1</sup> (OH); 1745 cm<sup>-1</sup> (C=O des Acetats); 1230 cm<sup>-1</sup> (C—O des Acetats).

KMR-Spektrum:	$\tau$	Multiplizität	Protonenzahl	Protonen an
	4,59	Multipllett	1	C-2
	6,00	Singulett	2	C-9
	7,66	Singulett	1	OH
	7,93	Singulett	3	Methyl d. Acetats
	8,09			
	8,37	Singulett	3	C-7
	8,90	Singulett	3	C-10

Massenspektrum: C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub> (212,28) m/e = 197, 194, 152, 139, 134, 117, 109, 95, 79, 75, 43 (Base-peak)

8.9-Diacetoxy-*p*-menthen-(1) (Ic)

Durch Acetylierung bei 90° (20 Stdn.) wurden sowohl aus Ia als auch aus Ib das Diacetat erhalten. Aufarbeitung und Reinigung wie bei Ib.

Optische Drehung:  $\lambda$ [m $\mu$ ] 589      578      546      436      365  
( $c = 1,00$ )       $[\alpha]_D^{20}$  +54°    +50°    +59°    +102°    —

IR-Spektrum (in CCl<sub>4</sub>): keine OH-Banden; 1735 und 1230 cm<sup>-1</sup> starke Acetatbanden

KMR-Spektrum:	$\tau$	Multiplizität	Protonenzahl	Protonen an
	4,61	Multipllett	1	C-2
	5,57	Singulett	2	C-9
	7,95	Singulett	3	Methyl d. Acetats an C-9
	8,07	Singulett	3	Methyl d. Acetats an C-8
	8,37	Singulett	3	C-7
	8,67	Singulett	3	C-10

Massenspektrum: C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> (254,32) m/e = 194, 181, 139, 134, 121, 119, 95/94/93, 43 (Base-peak)

*p*-Menthan-diol-(8.9) (II)

175 mg Ia wurden an 100 mg Platinoxid in 25 ml Äthylacetat hydriert. Nach Aufnahme von 29 ml Wasserstoff (entsprechend einer Doppelbindung) kam die Reaktion zum Stillstand. Nach Chromatographie an Kieselgel mit Benzol/Methanol 99:1 wurden 157 mg II erhalten. Die Probe mit Tetranitromethan war negativ.

Optische Drehung:  $\lambda$ [m $\mu$ ] 589      578      546      436      365  
( $c = 1,00$ )       $[\alpha]_D^{20}$  +9°    +4°    +6°    +10°    +10°

IR-Spektrum (in  $\text{CHCl}_3$ ): OH-Banden bei 3610, 3570 und 3440  $\text{cm}^{-1}$ 

KMR-Spektrum: $\tau$	Multiplizität	Koppelkonstante	Protonenzahl	Protonen an
5,75	Singulett	—	2	OH
6,60	Dublett	3 Hz	2	C-9
8,50	Multipllett			
8,97	Singulett		3	C-10
9,02	Dublett	7 Hz	3	C-7

Massenspektrum:  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$  (172,26)  $m/e = 173 (M+1), 172, 171, 157, 141, 123$  (Base-peak), 97, 75Acetonid des *p*-Menthan-diols-(8.9) (III)

55 mg II wurden mit 10 ml Aceton und 7,5 ml 10proz. Schwefelsäure 1 Stde. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Mischung wurde unter Rühren in 20 ml 20proz. Natriumcarbonat-Lösung gegeben und anschließend mit Chloroform extrahiert. Nach Reinigung über Kieselgel mit Benzol wurden 61 mg III des Acetonids erhalten.

Optische Drehung:  $\lambda$ [ $m\mu$ ] 589 578 546 436 365  
 ( $c = 1,00$ )  $[\alpha]_{\lambda}^{20}$   $-1^{\circ}$   $-3,5^{\circ}$   $-3,5^{\circ}$   $-5,5^{\circ}$  —

IR-Spektrum (in  $\text{CCl}_4$ ): keine OH- und Carbonylbanden, breite C—O—C-Bande bei 1100  $\text{cm}^{-1}$ 

KMR-Spektrum: $\tau$	Multiplizität	Koppelkonstante	Protonenzahl	Protonen an
6,38	Dublett	3,5 Hz	2	C-9
8,55	Multipllett			
8,70	Dublett	3,2 Hz	6	Methylreste d. Acetons
8,86	Singulett	—	3	C-10
9,05	Dublett	7 Hz	3	C-7

Massenspektrum:  $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_2$  (212,32)  $m/e = 197, 137, 115$  (Base-peak), 97, 95, 81, 72

## 1-Methyl-4-acetyl-cyclohexan (IVa)

Zu 95 mg II in 5 ml 90proz. Äthanol wurde die Lösung von 125 mg  $\text{H}_5\text{JO}_6$  in 5 ml Wasser gegeben. Nach 20 Min. wurde überschüssiges Perjodat mit Natriumhydrogensulfid-Lösung zerstört und mit Chloroform extrahiert. Die getrocknete Chloroformphase wurde bei 15° an der Wasserstrahlpumpe eingedampft (IVa ist merklich flüchtig!) und der Rückstand an Kieselgel mit Benzol/Methanol 99:2 gereinigt. Erhalten wurden 37 mg.

Optische Drehung:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 0$  ( $c = 2,00$ )IR-Spektrum (in  $\text{CCl}_4$ ): keine OH-Banden, scharfe Carbonylbande bei 1705  $\text{cm}^{-1}$ 

KMR-Spektrum: $\tau$	Multiplizität	Koppelkonstante	Protonenzahl	Protonen an
7,62	Multipllett	—	1	C-4
7,92	Singulett	—	3	C-9
8,58	Multipllett			
9,06	Dublett	6 Hz	3	C-7

#### 2.4-Dinitro-phenylhydrazon von IVa (IVb)

30 mg IVa in 5 ml Methanol wurden mit 80 mg 2.4-Dinitro-phenylhydrazin mit 5 ml konz. Schwefelsäure versetzt und über Nacht stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung und Chromatographie an Kieselgel mit Petroläther/Benzol 1:1 wurden 46 mg des chromatographisch reinen Hydrazons gewonnen. Feine Nadeln aus Petroläther vom Schmelzpunkt 102—105°.

Das IR-Spektrum stimmte in allen Einzelheiten mit demjenigen des 2.4-Dinitro-phenylhydrazons von 1-Methyl-4-acetyl-cyclohexan überein (s. u.). Desgleichen waren die KMR-Spektren identisch.

#### 2.4-Dinitrophenylhydrazon des 1-Methyl-4-acetyl-cyclohexans

1 g *p*-Methyl-acetophenon wurden an 1 g Platinoxid in 50 ml Äthylacetat zwei Tage hydriert. Nach Aufarbeitung des Hydrierungsproduktes wurde mit Chromsäure in Aceton oxydiert und das rohe Oxydationsgemisch mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin umgesetzt. Nach Aufbereitung zeigte die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit Petroläther/Benzol 1:1 wurden beide Substanzen rein erhalten. Bei der einen handelte es sich um das 2.4-Dinitrophenylhydrazon des *p*-Methyl-acetophenons (Schmp. 258—261°, Vergleich mit dem authent. Hydrazon), während die andere in ihrem dünn-schichtchromatographischen Verhalten, IR-Spektrum und KMR-Spektrum mit IVb völlig übereinstimmte. Schmp. 97—100°, keine Depression in der Mischprobe mit IVb.

### Zusammenfassung

Der Harn eines an Vitamin-D-resistenter Rachitis leidenden Mädchens lieferte nach Hydrolyse und Ätherextraktion ein Lipoidgemisch, in dem bis zu 20% des cyclischen Monoterpens (+)-*p*-Menthen-(1)-diol-(8.9) enthalten waren. Die Substanz ließ sich in 16 von 17 Fällen bei Kindern beiderlei Geschlechts im Alter von 3—7 Jahren chromatographisch in geringerer Menge nachweisen. Von 6 Säuglingen war die Ausscheidung bei einem positiv. Ein natürliches Vorkommen dieses Stoffes war bisher nicht bekannt.

### Summary

The urine of a girl suffering from vitamin D resistant rickets gave, after hydrolysis and extraction with ether, a mixture of lipoids which contained up to 20% of the cyclic monoterpene (+)-*p*-menthen-(1)-diol-(8.9). This substance could be detected chromatographically in small amounts in 16 out of 17 cases in the urine of children aged 3 to 7 years of both sexes. The excretion was positive in one case when 6 infants were studied. The natural occurrence of this compound was hitherto unknown.

Prof. Dr. R. Tschesche, Organisch-Chemisches Institut der Universität, 53 Bonn, Meckenheimer Allee 168.