

Arch. Pharm. (Weinheim) 315, 1026–1032 (1982)

Über Inhaltsstoffe von Euphorbiaceae, 7. Mitt.¹⁾

20-Desoxyingenolmonoester und Ingenoldiester aus *Euphorbia biglandulosa* Desf.

Gioacchino Falsone*, Attilio E.G. Crea und Eike A. Noack

Institut für Organische Chemie und Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf,
Universitätsstr. 1, D-4000 Düsseldorf
Eingegangen am 23. November 1981

Aus der lipophilen Phase des Milchsafes von *Euphorbia biglandulosa* Desf. wurden 3-O-(2*E*,4*Z*)-2,4,6-Decatrienoyl-20-desoxyingenol (**1**), 5-O-(2*E*,4*Z*)-2,4,6-Decatrienoyl-20-desoxyingenol (**2**), 20-O-Acetyl-3-O-(*Z*,*E*)-2,4-decadienoylingenol (**3**) und 20-O-Acetyl-3-O-(2*E*,4*Z*)-2,4,6-decatrienoylingenol (**4**) isoliert. Die Strukturen dieser Verbindungen wurden durch IR-, ¹H-NMR- und Massenspektroskopie belegt. Die Substanzen 1–4 wirken als Fischgifte; die Substanzen 3 und 4 sind darüber hinaus hautätzend und hemmen die oxidative Phosphorylierung isolierter Herzmitochondrien.

Constituents of Euphorbiaceae, VII¹⁾: 20-Deoxyingenol Monoesters and Ingenol Diesters from *Euphorbia biglandulosa* Desf.

From the lipophilic phase of the latex sap of *Euphorbia biglandulosa* Desf., 3-O-(2*E*,4*Z*)-2,4,6-decatrienoyl-20-desoxyingenol (**1**), 5-O-(2*E*,4*Z*)-2,4,6-decatrienoyl-20-desoxyingenol (**2**), 20-O-acetyl-3-O-(*Z*,*E*)-2,4-decadienoylingenol (**3**) and 20-O-acetyl-3-O-(2*E*,4*Z*)-2,4,6-decatrienoylingenol (**4**) were isolated. The structures of these compounds were determined by IR, ¹H-NMR and mass spectroscopy. The compounds 1 to 4 are poisonous to fish. In addition, 3 and 4 cause irritation of the human skin and strongly inhibit oxidative phosphorylation of isolated heart mitochondria.

Kürzlich berichteten wir^{1,2)} über drei neue 4-Desoxyphorboltriestere, die wir aus der lipophilen Phase des Milchsafes von *Euphorbia biglandulosa* erhielten. Bei Fortsetzung der Untersuchungen dieser lipophilen Phase gewannen wir weitere vier Verbindungen, die mit Hilfe der ¹H-NMR-, IR- und MS-Spektroskopie als Monoester von 20-Desoxyingenol und Diester von Ingenol identifiziert wurden. 20-Desoxyingenol-Derivate wurden erstmals als nicht biologisch aktive Bestandteile im Milchsafte von *Euphorbia kansui* Liou³⁾ aufgefunden und spektroskopisch identifiziert. Ingenolester sind als Inhaltsstoffe der Gattung *Euphorbia* sehr verbreitet⁴⁻⁶⁾ und sind, neben den 4-Desoxyphorbol-¹⁾ und Phorbol-Estern^{7,8)} für die hautätzende Wirkung und Fischtoxizität, insbesondere von *E. biglandulosa*, verantwortlich.

Nach mehrfacher säulenchromatographischer Trennung an Kieselgel und anschließender Reinigung durch HPLC unter Sauerstoffausschluß gelang es uns, die vier Komponenten rein darzustellen. Die zwei als erste aus der Säule eluierten Substanzen geben auf der Dünnschichtplatte im UV (366 nm) eine rote Fluoreszenz und bei Besprühen mit 50proz. Schwefelsäure bei Raumtemperatur eine gelbe Färbung.

Die MS-Spektren von 3-O-(2*E*,4*Z*)-2,4,6-Decatrienoyl-20-desoxyingenol (**1**) und von 5-O-(2*E*,4*Z*)-2,4,6-Decatrienoyl-20-desoxyingenol (**2**) zeigen einen Molpeak bei m/e 480 sowie ein Fragment bei m/e 314 ($M^+ - 166$), das durch die Abspaltung einer Acylgruppe mit einer Molzahl von 166 entsteht. Molzahl und Summenformel ($C_{10}H_{14}O_2$) deuten auf eine Säuregruppe hin, die einer Decatriensäure entspricht. Ferner geht aus den MS-Fragmenten bei m/e 314 und m/e 296 – hervor, daß hier ein Desoxyingenol-Derivat vorliegt³⁾.

Aus der Lage der olefinischen Protonen bei $\delta = 7.90$ des Decatrienrestes im 1H -NMR-Spektrum und durch die Bande bei 1600 und 1640 cm^{-1} im IR-Spektrum ist eindeutig zu ersehen, daß in **1** und **2** ein konjugiertes System vorliegt.

Darüber hinaus sprechen die Kopplungskonstanten und die Lagen dieser Signale im 1H -NMR-Spektrum für eine *E*, *Z*-Konfiguration der Decatriensäure⁹⁻¹¹⁾.

Durch Vergleich der im 1H -NMR-Spektrum beobachteten Daten von **1** mit denen von Ingenol-Derivaten⁴⁾ konnte weiterhin festgestellt werden, daß die ungesättigte Fettsäure an die C-3-Stellung gebunden ist ($\delta = 5.60$), während die Signale von 5-H bei $\delta = 3.93$ ³⁾ und das von OH-4 bei $\delta = 3.40$ als scharfe Singulette auftreten. Die Signale der allylischen Methylgruppen CH_3 -19 und CH_3 -20 treten zusammen als wenig aufgelöstes Signal bei $\delta = 1.82$ auf (s. Abb. 1).

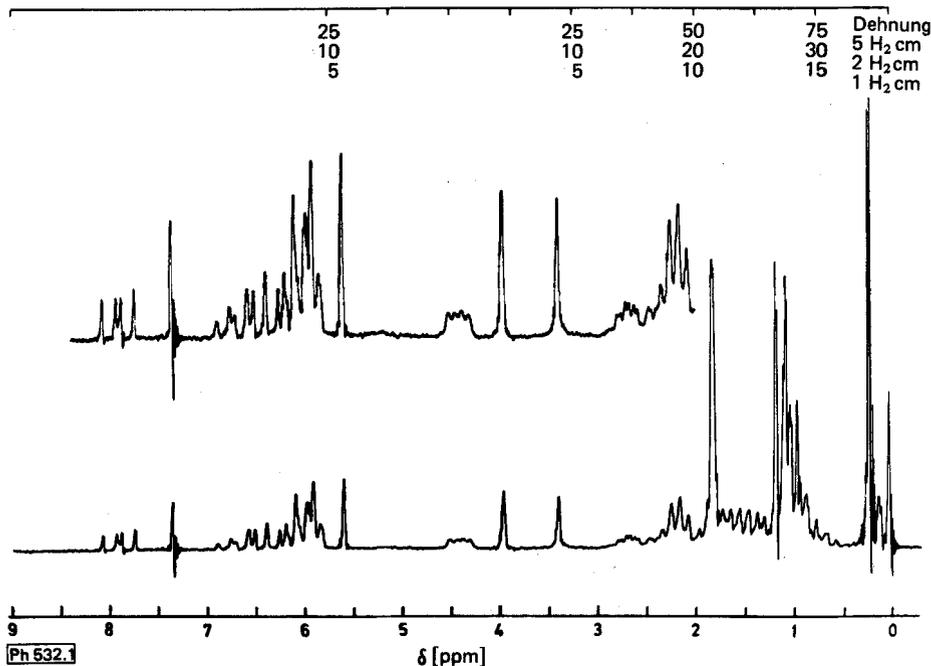


Abb. 1: 1H -NMR-Spektrum von **1** in $CDCl_3$ (Silylderivat)

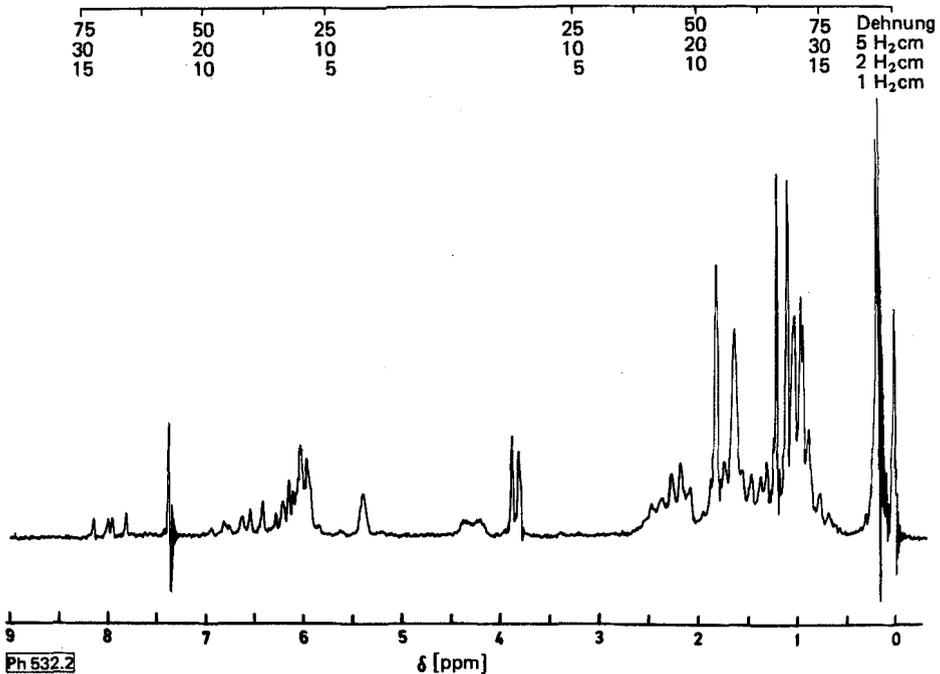


Abb. 2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **2** in CDCl_3 (Silylderivat)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des monosilylierten Isomers **2** unterscheidet sich von dem von **1** nur dadurch, daß das Signal von 5-H als breites Singulett bei $\delta = 5.27$ auftritt. Die allylische Methylgruppe $\text{CH}_3\text{-}20$ wird hier von der Lage der Acylgruppe in der 5-Stellung beeinflußt und erscheint dadurch bei höherem Feld bei $\delta = 1.60$ (s. Abb. 2). Weitere Unterschiede zwischen den beiden Isomeren sind im MS zu beobachten, in dem **2** bei m/e 462 ($M^+ - 18$) eine höhere Intensität aufweist als **1**.

Die Anwesenheit des von Evans et al.¹²⁾ aus dem Milchsaft von *E. biglandulosa* isolierten 5-Desoxyingenol konnten wir hierbei nicht bestätigen, dagegen fanden wir Ingenol, dessen Vorkommen ebenfalls von den o.g. Autoren beschrieben worden war¹²⁾, allerdings ohne Angaben über die Acylgruppen und über die Acylierungsstelle zu machen. Die Naturprodukte wurden von uns als 20-O-Acetyl-3-O-(*Z,E*)-2,4-decadienoylingenol (**3**)³⁾ und als 20-O-Acetyl-3-O-(*2E,4Z*)-2,4,6-decatrienoylingenol (**4**)⁴⁾ isoliert.

Aus der Lage und Struktur der olefinischen Protonen der ungesättigten Fettsäuren im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum geht hervor, daß die Decadien- in der *Z,E*-^{1,13)} und die Decatrien-Säure in der *E,Z*-Konfiguration vorkommt.

Fischversuche an Goldorfen (*Leuciscus idus melanotus*) haben ergeben, daß die Naturprodukte **1-4** wohl Fischgifte sind, sie zeigen jedoch unterschiedliche Wirkung und Toxizität (s. Tab. 1). Sie sind, wie die 4-Desoxyphorboltriestere¹⁾, für die Fischtoxizität des Latex von *E. biglandulosa* verantwortlich.

Untersuchungen an isolierten Mitochondrien zeigten¹⁴⁾ ferner, daß **3** und **4** die oxidative Phosphorylierung dosisabhängig hemmen. Offensichtlich sind daran zwei verschiedene

und den Ingenoldiestern **3** und **4** ein bedeutender Unterschied in der biologischen Aktivität existiert. Diese abweichende Wirkungsweise liegt sicherlich darin begründet, daß bei den Produkten **1** und **2** an C-20 eine Methyl- und nicht wie es bei **3** und **4** der Fall ist, eine primäre Hydroxyl-Gruppe vorhanden ist.

Herrn Prof. Dr. E. Hecker und seinen Mitarbeitern, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, sind wir für die Bereitstellung zu spektroskopischen Zwecken verwendeten Materials und für fruchtbare Diskussionen zu Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. L. Birkofer danken wir für das stete Interesse an dieser Arbeit. Den Herren Dr. G. Schmidtberg und Dr. H. Haddad haben wir für die Aufnahme der Massen-, IR- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung zu danken.

Experimenteller Teil

Die *sc* Trennungen wurden unter Verwendung eines Fraktionssammlers (Fa. LKB-Produkte) auf Kieselgel 60, Korngröße 0.040–0.063 mm (Fa. Merck) durchgeführt. HPLC: Gerät der Fa. Waters GmbH und eine Stahlsäule 30 cm/7.9 mm mit μ -Porasil. IR: Perkin-Elmer 521; $^1\text{H-NMR}$: Bruker WP 80 CW, Lösungsmittel CDCl_3 , inn. Stand. TMS; MS: Varian MAT CH5. – DC: Fertigfolien MN-Polygram SILG-Schicht (0.25 mm Kieselgel) der Fa. Macherey-Nagel & Co.

Sammeln und Aufarbeiten des Milchsafte

Mitte September 1977 wurden auf Sizilien Zweige von *Euphorbia biglandulosa* abgeschnitten; der von den Schnittflächen abtropfende Milchsaft wurde aufgefangen und bei 0° unter Argon aufbewahrt. Nach Abtrennung der wäßrigen Phase¹⁵ wurden 50 g der erhaltenen viskosen Masse über eine Säule (100 × 8 cm) mit verschiedenen Laufmitteln chromatographiert¹¹. Die mit Petrolether/Chloroform/Essigester (70 : 30 : 10) erhaltene Fraktion (etwa 4 g) enthielt unter anderem die Naturstoffe **1–4**.

Isolierung der 20-Desoxyingenolmonoester **1** und **2**

Je 1 g des mit dem Laufmittel Petrolether/Chloroform/Essigester 70 : 30 : 10 erhaltenen Gemisches von 20-Desoxyingenol- und Ingenolderivaten, gelöst in 2 ml Chloroform, wurde über eine Säule (150 × 3 cm) mit Kieselgel und Hexan/Essigester 100 : 20 als Laufmittel chromatographiert. Die Fraktionen 30–40 (15 ml) enthielten die Produkte **1** und **2** als Gemisch, die Fraktionen **41–50** enthielten **3** und **4**. Die weitere Trennung der Verbindungen **1** und **2** erfolgte mit der HPLC unter folgenden Bedingungen: Säule: μ -Porasil (30 × 7.9 mm); Fließgeschw.: 4 ml/min; Laufmittel: Hexan/Essigester 10 : 1.3; Die Produkte wurden als farblose amorphe Substanzen erhalten. Produkt **1**: $R_t = 11$ min, Produkt **2**: $R_t = 16$ min.

3-O-(2E,4Z)-2,4,6-Decatrienoyl-20-desoxyingenol (**1**)

IR (CHCl_3): 3450 (OH), 1710 (COO), 1605, 1630 (C=C konj.), 1150, 1200 cm^{-1} (COC). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 7.90 (dd, $J_{a-b} = 16$ Hz, $J_{b-c} = 15$ Hz; 1H, H^b), 6.90–5.85 (m, 7H, 5. olefinische-H, 1-H, 7-H), 5.60 (s; 1H, 3-H), 4.43 (m; 1H, 8-H), 3.93 (s; 1H, 5-H), 3.40 (s; 1H, 4-OH), 2.77–2.07 (m; 5H, 8-H₂ von Acyl, 12-H₂, 11-H), 1.82 (s, breit; 6H, 19-H₃, 20-H₃), 1.71–1.27 (m; 2H), 1.17 (s; 3H, 17-H₃), 1.07 (s; 1H, 16-H₃), 0.55–1.10 (m; 8H, 13-H, 14-H, 18-H₃, 10-H₃ von Acyl). MS (70 eV): $m/e = 480$ (0.30 %, M⁺), 462 (0.13 %, M⁺-18), 314 (0.22 %, M⁺-166), 296 (0.16 %, M⁺-166 + 18), 286 (0.19 %), 253 (0.13 %), 149 (0.96 %), 122 (100 %).

5-O-(2E,4Z)-2,4,6-Decatrienoyl-20-desoxyingenol (2)

IR (CHCl₃): 3440 (OH), 1705 (COO), 1600, 1635 (C=C konj.), 1160, 1210 cm⁻¹ (COC). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.97 (dd, J_{b-a} = 16 Hz, J_{b-c} = 15 Hz; 1H, H^b), 6.80–5.81 (m; 7H, 5. olefinische-H, 1-H, 7-H), 5.38 (s; 1H, 5-H), 4.28 (m; 1H, 8-H), 2.45–2.07 (m; 5H, 8-H₂ von Acyl 12-H₂, 11-H), 3.87 (s; 1H, 3-H), 3.80 (s; 1H, 4-OH), 1.80 (s; 3H, 19-H₃), 1.61 (s; 3H, 20-H₃), 1.08 (s; 3H, 16-H₃), 1.20 (s; 3H, 17-H₃), 0.65–1.00 (m; 8H, 13-H, 14-H, 18-H₃, 10-H₃ von Acyl). MS (70 eV): m/e = 480 (0.12 %, M⁺), 462 (0.21 %, M⁺-18), 314 (0.05 %, M⁺-166), 296 (0.07 %, M⁺-166 + 18), 286, 268, 253, 149 (100 %), 121.

Ingenoldiester 3 und 4

Die Fraktionen 41–50 wurden vereinigt, i.Vak. eingeengt und über Sephadex LH-20 (Säule 100 × 4 cm) mit Methanol als Laufmittel chromatographiert. Die Fraktionen 43–45 (15 ml) enthielten **3** und die Fraktionen 48–51 **4**. Nach dem Einengen i.Vak. 30°/12 Torr fielen **3** und **4** als farblose amorphe Masse aus.

20-O-Acetyl-3-O-(Z,E)-2,4-decadienoylingenol (3)

RF = 0.45 (Hexan/Essigester 100 : 85); RF = 0.10 (Hexan/Chloroform/Essigester 70 : 30 : 10). IR (CHCl₃): 3530 (OH), 1710 (COO), 1590, 1625 (C=C konj.), 1160, 1200 cm⁻¹ (COC). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.40 (dd, J_{c-b} = 12 Hz; J_{c-d} = 16 Hz; 1H, H^c), 6.65 (dd, J = 12 Hz; 1H, H^b), 6.07–6.32 (m; 3H, 1-H, 7-H, H^a), 5.92–5.56 (m; 2H, 3-H, H^a), 4.80–4.40 (q, J = 14 Hz, A/B; 2H, 20-H₂), 4.25–3.85 (m; 2H, 8-H, 5-H), 3.53–3.42 (m; 2H, 4-OH, 5-OH), 2.75–2.12 (m; 5H), 2.06 (s; 3H, AcOH), 1.82 (m; 3H, 19-H₃), 1.43–1.27 (m; 6H, 7-,8-,9-H₂-Acyl), 1.15–0.65 (m; 14H, 13-H, 14-H, 16-H₃, 17-H₃, 18-H₃, 10-H₃-Acyl). MS (70 eV): m/e = 540 (0.01 %, M⁺), 522 (0.02 %, M⁺-18), 372 (0.13 %, M⁺-168), 312 (0.38 %, M⁺-168+60), 294 (0.23 %, M⁺-168 + 60 + 18), 151 (100 %).

20-O-Acetyl-3-O-(2E,4Z)-2,4,6-decatrienoylingenol (4)

RF = 0.42 (Hexan/Essigester 100 : 85); RF = 0.08 (Hexan/Chloroform/Essigester 70 : 30 : 10). IR (CHCl₃): 3540 (OH), 1700 (COO), 1600, 1640 (C=C konj.) 1160, 1200 cm⁻¹ (COC). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.97 (dd, J_{b-c} = 15 Hz; J_{b-a} = 16 Hz; 1H, H^b), 6.78–5.93 (m; 7H, 5H-olefinische, 1-H, 7-H), 5.59 (s; 1H, 3-H), 4.78–4.38 (q; J = A/B 12 Hz, 2H, 20-H₂), 4.15–3.75 (m; 2H, 8-H, 5-H), 3.45–3.40 (s, breit; 2H, 4-OH, 5-OH), 2.73–2.12 (m; 5H, 8-H₂ von Acyl., 12-H₂, 11-H), 2.05 (s; 3H, AcOH), 1.80 (m; 3H, 19-H₃), 1.45–1.28 (m; 2H, CH₂-Acyl), 1.14–0.64 (m; 14H, 13-H, 14-H, 16-H₃, 17-H₃, 18-H₃, 10-H₃-Säure). MS (70 eV): m/e = 538 (0.02 %, M⁺), 521 (0.02 %, M⁺-18), 373 (0.15 %, M⁺-165), 372 (0.12 %, M⁺-166), 313 (0.29 %, M⁺-165 + 60), 312 (0.22 %, M⁺-166 + 60), 295 (0.22 %, M⁺-165 + 60 + 18), 149 (100 %).

3-O-(Z,E)-2,4-Decadienoylingenol (3a)

100 mg **3** in 10 ml Methanol wurden mit 5 Tropfen Wasser versetzt und durch 24 h Rühren mit 2 g Ionenaustauscher Dowex-50 WX4 (Fa. Serva) bei 30–35° unter Argon hydrolysiert¹⁾.

¹H-NMR (CDCl₃) Silylderivat: δ (ppm) = 7.63 (dd, J_{c-b} = 15 Hz, J_{c-d} = 16 Hz; 1H, H^c), 6.85 (dd, J = 12 Hz; 1H, H^b), 6.50–6.25 (m; 1H, H^d), 6.03 (s. breit; 2H, 1-H, 7-H), 5.85 (d, J_{a-b} = 12 Hz; 1H, H^a), 5.68 (s; 1H, 3-H), 4.80–4.45 (m; 1H, 8-H), 4.25 (s. breit; 2H, 20-H₂), 3.80 (s; 1H, 5-H), 3.45 (s; 1H, 4-OH austauschbar mit D₂O), 2.75–2.12 (m; 5H, 6-H₂ von Acyl., 11-H, 12-H₂), 1.89 (m; 3H, 19-H₃), 1.47–1.35 (m; 6H, CH₂-Acyl), 1.15–0.97 (14H, 13-H, 14-H, 16-H₃, 17-H₃, 18-H₃, 10-H₃-Acyl). MS (70 eV): m/e = 498 (0.03 %, M⁺), 480 (0.07 %, M⁺-18), 330 (0.10 %, M⁺-168), 312 (0.25 %, M⁺-168 + 18), 294 (0.22 %, M⁺-168 + 36), 151 (100 %).

Literatur

- 1 6. Mitt.: G. Falsone und A.E.G. Crea, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1979, 1116.
- 2 E.A. Noack, A.E.G. Crea und G. Falsone, *Toxicon* 18, 165 (1980).
- 3 D. Uemura, H. Ohwaki und Y. Hirata, *Tetrahedron Lett.* 1974, 2527.
- 4 H.J. Opferkuch und E. Hecker, *Tetrahedron Lett.* 1974, 261.
- 5 E. Hecker, *Cancer Res.* 28, 2338 (1968).
- 6 G. Fürstenberger und E. Hecker, *Planta Med.* 22, 241 (1972).
- 7 E. Hecker, *Pure Appl. Chem.* 49, 1423 (1977).
- 8 T. Okuda, T. Yoshida, S. Koike und N. Toh, *Phytochemistry* 14, 509 (1975).
- 9 G. Ohloff und M. Pawlak, *Helv. Chim. Acta* 56, 1176 (1973).
- 10 F. Näf und R. Decorzant, *Helv. Chim. Acta*, 57, 1309 (1974).
- 11 G. Rickards und L. Weiler, *J. Org. Chem.* 43, 3607 (1978).
- 12 F.J. Evans und A.D. Kinghorn, *Phytochemistry* 13, 2324 (1974).
- 13 J.A. Elvidge und P.D. Ralph, *J. Chem. Soc. B* 1966, 243.
- 14 E.A. Noack, A.E.G. Crea und G. Falsone, *Biochem. Pharmacol.*, in Vorbereitung.
- 15 G. Falsone und E.A. Noack, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1976, 1009.

[Ph 532]

Arch. Pharm. (Weinheim) 315, 1032–1042 (1982)

Oxidation von N-(Hydroximino-alkyl)-aminen

Hans Möhrle* und Barbara Schmidt

Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf, Universitätsstraße 1,
4000 Düsseldorf 1

Eingegangen am 24. November 1981

Die Quecksilber(II)-EDTA-Dehydrierung von *E*- ω -Aminoacetophenon-oximen liefert über die Nitrone auch Oxonitronen, bei deren Bildung keine Nachbargruppenbeteiligung möglich ist.

Bei der Dehydrierung der isomeren ω -Piperidinopropiophenon-oxime entsteht – neben den isomeren Oxim-Lactamen – aus dem *Z*-Isomer hauptsächlich ein Tetrahydroanabasin-Derivat, während beim *E*-Isomer die Reaktion über das bicyclische Nitron verläuft.

Oxidation of N-(Hydroximinoalkyl)amines

The dehydrogenation of *E*- ω -aminoacetophenone oximes with mercury EDTA leads to oxonitrones via the nitrones. Neighbouring group participation cannot take place in this process. Dehydrogenation of the isomeric ω -piperidinopropiophenone oximes yields the isomeric oxime lactams and from the *Z*-isomer mainly a tetrahydroanabasine derivative, while the reaction of the *E*-isomer proceeds via the bicyclic nitron.
