

HANS GRISEBACH und LENI PATSCHKE

Zur Biogenese der Isoflavone, III¹⁾

Einbau von

4.4'.6'-Trihydroxy-chalkon-4'-glucosid-[β -¹⁴C] in Formononetin

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

(Eingegangen am 30. Juni 1960)

Das synthetisch gewonnene 4.4'.6'-Trihydroxy-chalkon-4'-glucosid-[β -¹⁴C] wird im Rotklee in spezifischer Weise in das 7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavan (Formononetin) eingebaut. Das Chalkon ist daher sehr wahrscheinlich eine Zwischenstufe bei der Biogenese des Isoflavons.

Durch unsere bisherigen Untersuchungen über die Biogenese des 7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavons (Formononetin) (I) im Rotklee konnte bewiesen werden, daß hierbei eine Phenylwanderung eintritt^{1,2)}. Als Zwischenstufe, aus der die Umlagerung erfolgen könnte, wurde dabei Chalkonepoxyd angenommen. Um nun die Möglichkeit der Umwandlung eines Chalkons in das Isoflavon zu prüfen, haben wir das 4.4'.6'-Trihydroxy-chalkon-4'-glucosid-[β -¹⁴C] (II) synthetisiert und dessen Einbau in das Formononetin untersucht. Die Glucosid-Form wurde wegen ihrer guten Wasserlöslichkeit gewählt.

Zur Synthese des ¹⁴C-markierten Chalkonglucosids wurde *p*-Hydroxy-benzaldehyd-[carbonyl-¹⁴C] mit Resacetophenon-4-tetraacetylglucosid³⁾ unter den von G. ZEMPLÉN und R. BOGNÁR⁴⁾ angegebenen Bedingungen umgesetzt. Die Darstellung des *p*-Hydroxy-benzaldehyd-[carbonyl-¹⁴C] erfolgte durch Reduktion von *p*-Benzoyloxy-benzoylchlorid-[carbonyl-¹⁴C]⁵⁾ mit Lithium-tri-tert.-butyloxy-aluminiumhydrid⁶⁾.

Unter den in der Literatur⁵⁾ angegebenen Bedingungen für die Carboxylierung von *p*-Benzoyloxy-phenyllithium mit ¹⁴CO₂ erhielten wir nur sehr schlechte Ausbeuten an *p*-Benzoyloxy-benzoësäure-[carboxyl-¹⁴C] und isolierten als Hauptreaktionsprodukt stets das *p,p'*-Dibenzoyloxy-diphenylketon. Die systematische Untersuchung der Reaktionsbedingungen ergab als günstigste Reaktionsdauer für die Carboxylierung 4 Min. bei -75° (Tab. 1).

Das radioaktive Chalkonglucosid wurde Kleeblättern (*Trifolium pratense*) zugeführt und das Isoflavon, wie früher beschrieben²⁾, isoliert, gereinigt und mit 100 mg inaktivem Isoflavon verdünnt. Das so erhaltene Isoflavon war radioaktiv und wurde zur Lokalisierung der Aktivität zu [2.4-Dihydroxy-phenyl]-[4-methoxy-benzyl]-keton und Ameisensäure gespalten²⁾. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen zeigt Tab. 2.

¹⁾ II. Mitteil.: H. GRISEBACH und N. DOERR, Z. Naturforsch. **15b**, 284 [1960].

²⁾ H. GRISEBACH, Z. Naturforsch. **14b**, 802 [1959].

³⁾ L. REICHEL und J. STEUDEL, Liebigs Ann. Chem. **553**, 93 [1942].

⁴⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 1040, 1043 [1942].

⁵⁾ K. KRATZL und G. BILLEK, Mh. Chem. **85**, 852 [1954].

⁶⁾ H. C. BROWN und B. C. SUBBA RAO, J. Amer. chem. Soc. **80**, 5379 [1958].

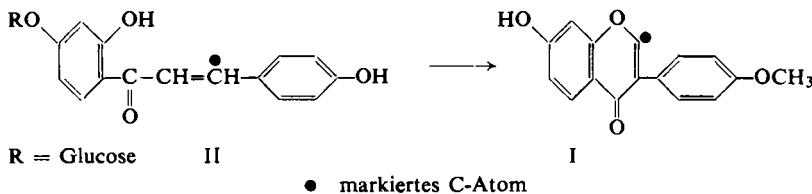
Tab. 1. Abhängigkeit der Ausbeute an *p*-Benzylxybenzoësäure-[carboxyl-¹⁴C] von Reaktionstemperatur und Zeit

Ausb. an <i>p</i> -Benzylxybenzoësäure-[carboxyl- ¹⁴ C], bez. auf ¹⁴ CO ₂ in %	Temp. °C	Reaktionszeit in Min.
9	-70 bis 0	60
4	-70 bis 0	75
13	-70 bis 0	15
12	-70	15
49	-75	8
75	-75	4
74	-75	4
71	-75	4
75	-75	4

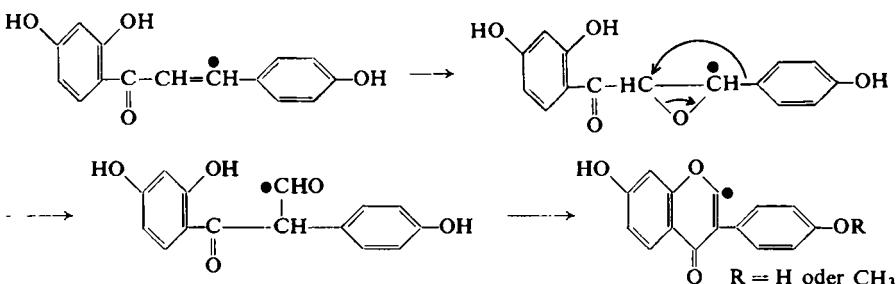
Tab. 2. Aktivität des Isoflavons und der Abbauprodukte.
Alle Messungen als CO₂ im Gaszählrohr⁷⁾. Meßfehler ± 2%

Verbindung	ipm/mMol	Prozent Aktivität vom Isoflavon
Isoflavon	6740	100
Ameisensäure	6927	102.7
Keton	0	0

Wie der Abbau zeigt, ist alle Aktivität im C-2 des Isoflavons lokalisiert (II → I):



Genau dieses Ergebnis sollte man erwarten, wenn nach der von uns früher aufgestellten Hypothese²⁾ das Chalkon zunächst in sein Epoxyd übergeht, sich dieses dann unter Phenylwanderung umlagert und anschließend der Ring zum Isoflavon geschlossen wird:



⁷⁾ H. SIMON, H. DANIEL und J. F. KLEBE, Angew. Chem. 71, 303 [1959].

Das Ergebnis ist damit eine starke Stütze für diesen Reaktionsweg. Ein intakter Einbau des Chalkons ist durch unsere bisherigen Versuche jedoch nicht streng bewiesen. Die einzige andere Möglichkeit, das Ergebnis zu erklären, wäre ein vorheriger Abbau des Chalkons zu *p*-Cumarsäure oder einer anderen Phenylpropancarbonsäure, bei deren Einbau in das Isoflavon die gleiche Aktivitätsverteilung zu erwarten ist. Eine Spaltung des Chalkons zwischen Resorcinring und Carbonylgruppe ist aber sehr unwahrscheinlich. Vielmehr sollte man erwarten, daß der biologische Abbau an der reaktionsfähigen aliphatischen Doppelbindung angreift. Untersuchungen über den Abbau von Chalkonen *in vivo* liegen unseres Wissens noch nicht vor. Als Abbauprodukte von Quercetin im Tierkörper wurden keine Phenylpropancarbonsäuren, sondern Phloroglucincarbonsäure, Protocatechusäure und substituierte Phenylessigsäuren gefunden⁸⁾.

Ein Hinweis dafür, daß kein vorheriger Abbau des Chalkons erfolgt ist, gab das Autoradiogramm vom Dünnenschichtchromatogramm des ätherischen Klee-Extraktes. Während nach Gabe des radioaktiven Chalkons hierbei neben der Zone des Isoflavons nur 3 weitere radioaktive Zonen auftraten, waren es bei Gabe von Zimtsäure-[3-¹⁴C] mindestens deren 7.

Die Umwandlung des Chalkons mit zellfreien Extrakten von Rotklee soll untersucht werden.

Herrn N. DOERR danken wir für geschickte Mithilfe. Die Arbeit wurde in dankenswerter Weise durch die DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT unterstützt. Weiterhin danken wir dem BUNDESMINISTERIUM FÜR ATOMKERNENERGIE UND WASSERWIRTSCHAFT, dem FONDS DER CHEMIE und der BADISCHEN ANILIN- & SODA-FABRIK für Sachbeihilfen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

p-Benzoyloxy-benzoësäure-[carboxyl-¹⁴C]: Die Reaktion wurde mit folgender Änderung nach der Vorschrift von KRATZL und BILLEK⁵⁾ ausgeführt. Nach 4 Min. Carboxylierung bei -75° füllte man die Apparatur schnell mit Stickstoff und ließ unter Röhren und Kühlung 20 ccm verd. Salzsäure (1:1) in den Reaktionskolben laufen.

Aus 502.9 mg (2.55 mMol) Bariumcarbonat-[¹⁴C] (spezif. Aktivität 862.7 µC/mMol) wurden 445 mg (74% d. Th.) *p-Benzoyloxy-benzoësäure* erhalten.

p-Hydroxy-benzaldehyd-[carbonyl-¹⁴C]: 307 mg *p-Benzoyloxy-benzoylchlorid-[carbonyl-¹⁴C]*⁵⁾ wurden in 15 ccm absol. Diäthylenglykol-dimethyläther gelöst und bei -75° mit 3.29 ccm (2.5 mMol) einer Lösung von Lithium-tri-tert.-butyloxy-aluminiumhydrid⁶⁾ versetzt. Innerhalb von 1 Stde. ließ man die Lösung sich auf -10° erwärmen und versetzte unter Röhren mit 20 ccm 3.5-proz. Salzsäure. Anschließend wurde mit Äther ausgeschüttelt und die äther. Lösung mit 1 n KOH extrahiert. Der Äther wurde abgedampft und der Rückstand mit 100 ccm halbkonz. HCl 1.5 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde von ausgefallenen harzigen Bestandteilen abfiltriert und mit 40-proz. NaOH auf $p_{\text{H}} 5$ eingestellt. Zu dieser Lösung gab man unter Röhren eine Lösung von 380 mg *m-Nitrobenzhydrazid* in 15 ccm heißem Wasser. Das *m-Nitrobenzhydron* kristallisierte sogleich aus. Nach Abkühlen auf 0° wurde es abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausb. 147 mg (41% d. Th.).

⁸⁾ A. G. KALLIANOS, P. L. PETRAKIS, M. R. SHETLAR und S. H. WENDER, Arch. Biochem. Biophysics **81**, 430 [1959]; A. N. BOOTH, C. W. MURRAY, F. T. JONES und F. DE EDs, J. biol. Chemistry **223**, 251 [1956]; C. D. DOUGLAS und R. HOGAN, ebenda **230**, 625 [1958].

Das Hydrazon wurde nach KRATZL und BILLEK⁵⁾ zum freien Aldehyd gespalten (Rohausbeute 96% d. Th.), welcher ohne weitere Reinigung zur anschließenden Kondensation verwendet wurde.

4,4',6'-Trihydroxy-chalkon-4'-glucosid: 360 mg *Resacetophenon-4-tetraacetylglucosid*³⁾ wurden nach ZEMPLÉN und BOGNÁR⁴⁾ mit 110 mg *p-Hydroxy-benzaldehyd* kondensiert. Ausb. 180 mg (58% d. Th.), Schmp. 217–218°*) (aus Wasser).

$C_{21}H_{22}O_9$ (418.4) Ber. C 60.28 H 5.30 Gef. C 59.82 H 5.63

R_f-Werte: 0.46 (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1), 0.84 (Essigester/Ameisensäure/Wasser 10:2:3), 0.61 (Propanol-(2)/Wasser 3:7). Absteigend auf Papier Schleicher & Schüll 2043 b.

In gleicher Weise wurde aus 19 mg *p-Hydroxy-benzaldehyd-[carbonyl-¹⁴C]* das ¹⁴C-markierte Chalkonglucosid dargestellt. Ausb. 27 mg (40% d. Th.). Zur weiteren Reinigung wurde das Chalkon auf Papierbögen (Schleicher & Schüll 2043 b) 2 mal absteigend mit Propanol-(2)/Wasser (3:7) chromatographiert. Das Chromatogramm der so gereinigten Substanz zeigte im Radiopapierchromatographen **) keine radioaktiven Verbindungen außer dem Chalkon.

Gewinnung von Isoflavon-[¹⁴C]: 25 Kleeblätter erhielten die wäßrige Lösung von 2 mg Chalkon (spezif. Aktivität 2 μ C/mg). Im übrigen wurde wie früher²⁾ verfahren.

*) Schmelzpunkt nicht korrigiert.

**) Friesike & Hoepsner FH 452.

REINHARD NAST und HELMUT RÜCKEMANN

Benzoylacetonate zweiwertiger Übergangsmetalle

Aus der II. Abteilung des Anorganisch-Chemischen Instituts der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 30. Juni 1960)

Durch Umsetzung wäßriger Salzlösungen von Chrom(II), Eisen(II), Nickel(II) und Zink(II) mit einer Lösung von Benzoylaceton in Aceton bei Gegenwart von wäßrigem Ammoniak bzw. Pyridin werden die Benzoylacetonate $Cr(C_{10}H_9O_2)_2 \cdot 2 C_5H_5N$, $Fe(C_{10}H_9O_2)_2 \cdot 2 H_2O$, $Ni(C_{10}H_9O_2)_2 \cdot 2 H_2O$, $Ni(C_{10}H_9O_2)_2 \cdot 2 C_5H_5N$ und $Zn(C_{10}H_9O_2)_2 \cdot 2 C_5H_5N$ rein dargestellt. Die Verbindungen sind Nicht-elektrolyte und in organischen Solventien monomer löslich. Sie besitzen die magnetischen Momente der freien Metallionen, nur die Chrom(II)-Verbindung zeigt den reduzierten Paramagnetismus eines inneren Durchdringungskomplexes. Die IR-Spektren dieser Komplexe sind praktisch identisch, unabhängig von der Art des Zentralatoms.

In der älteren Literatur sind eine große Zahl von Benzoylacetonaten der Übergangsmetalle beschrieben worden. Im Rahmen von Untersuchungen über Chelatkomplexe wurden einige noch unbekannte Dihydrate und Bispyridin-Addukte von Benzoylacetonaten erhalten, deren Darstellung und Eigenschaften im folgenden kurz beschrieben werden.