

ISOLIERUNG VON GIBBERELLIN- A_8 - $O(3)$ - β -D-GLUCOPYRANOSID AUS FRÜCHTEN VON *PHASEOLUS COCCINEUS**

K. SCHREIBER, J. WEILAND† und G. SEMBDNER

Institut für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Halle (Saale), DDR

(Received 18 April 1969, in revised form 11 June 1969)

Zusammenfassung—Aus frisch geernteten, unreifen Früchten der Prunkbohne, *Phaseolus coccineus* L., wurde ein polares, ursprünglich als “*Phaseolus* ϵ ” bezeichnetes Gibberellin isoliert (Ausbeute $3,8 \times 10^{-5}\%$) und durch Anwendung chemischer und physikalischer Untersuchungsmethoden als Gibberellin- A_8 - $O(3)$ - β -D-glucopyranosid (I) strukturell aufgeklärt.

Abstract—From fresh immature fruits of *Phaseolus coccineus* L. a polar gibberellin (previously named “*Phaseolus* ϵ ”) has been isolated in an overall yield of $3.8 \times 10^{-5}\%$. Its structure has been shown by chemical and physical methods to be gibberellin A_8 - $O(3)$ - β -D-glucopyranoside (I).

BEI FRÜHEREN orientierenden Untersuchungen über die Gibberelline höherer Pflanzen konnten wir in unreifen Früchten der Prunkbohne, *Phaseolus coccineus* L., außer den Gibberellinen A_1 , A_3 , A_5 , A_6 , A_8 und einigen weiteren nicht näher charakterisierten Verbindungen (*Phaseolus* α - δ) eine stark polare, aus saurer wäßriger Lösung mit Essigester nicht extrahierbare Substanz (*Phaseolus* ϵ) nachweisen, die als sogenanntes “gebundenes Gibberellin” angesehen wurde.¹ Die präparative Isolierung dieser Verbindung und die Aufklärung ihrer Struktur als Gibberellin- A_8 - $O(3)$ - β -D-glucopyranosid (I), über die wir bereits kurz berichteten,^{2,3} sind Gegenstand der im folgenden ausführlich dargestellten Arbeiten.⁴

Als Ausgangsmaterial dienten insgesamt 3762 kg frisch geerntete, unreife Früchte von *Phaseolus coccineus* L. var. *coccineus* cv. “Preisgewinner” der Anbaujahre 1962–1965, die entsprechend dem in Abb. 1 dargestellten Schema portionsweise (Tab. 1) aufgearbeitet wurden. Als Ergebnis dieser Präparation erhielten wir Verbindung I ($C_{25}H_{34}O_{12}$) bzw. deren Hexaacetat III ($C_{37}H_{46}O_{18}$). Die Acetylierung von I in Acetanhydrid/Pyridin lieferte neben dem Hauptprodukt III das Pentaacetat IV. Bei Dünnschichtchromatographie (DC) an Kieselgel G^{5,21} blieb I in den geprüften sauren Entwicklungsgemischen am Startpunkt zurück; geeignete Trennungen ergaben sich mit NH_3 -haltigen Gemischen, die sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab verwendet wurden (vgl. Tab. 2). Durch

* Gibberelline—XIV. XIII. Mitteilung: I.c.²

† Teil der Dissertation, Univ. Halle (S.) 1968.

¹ G. SEMBDNER, G. SCHNEIDER, J. WEILAND und K. SCHREIBER, *Experientia* **20**, 89 (1964).

² K. SCHREIBER, J. WEILAND und G. SEMBDNER, *Tetrahedron Letters* 4285 (1967).

³ G. SEMBDNER, J. WEILAND, O. AURICH und K. SCHREIBER, *Plant Growth Regulators, S.C.I. Monograph* No. 31, p. 70, London (1968).

⁴ Die präparative Isolierung der im Essigesterextrakt dünnschichtchromatographisch nachgewiesenen Gibberelline A_1 , A_3 , A_5 , A_6 und A_8 (I.c.¹) wird an anderer Stelle publiziert.

⁵ Vgl. G. SEMBDNER, R. GROSS und K. SCHREIBER, *Experientia* **18**, 584 (1962).

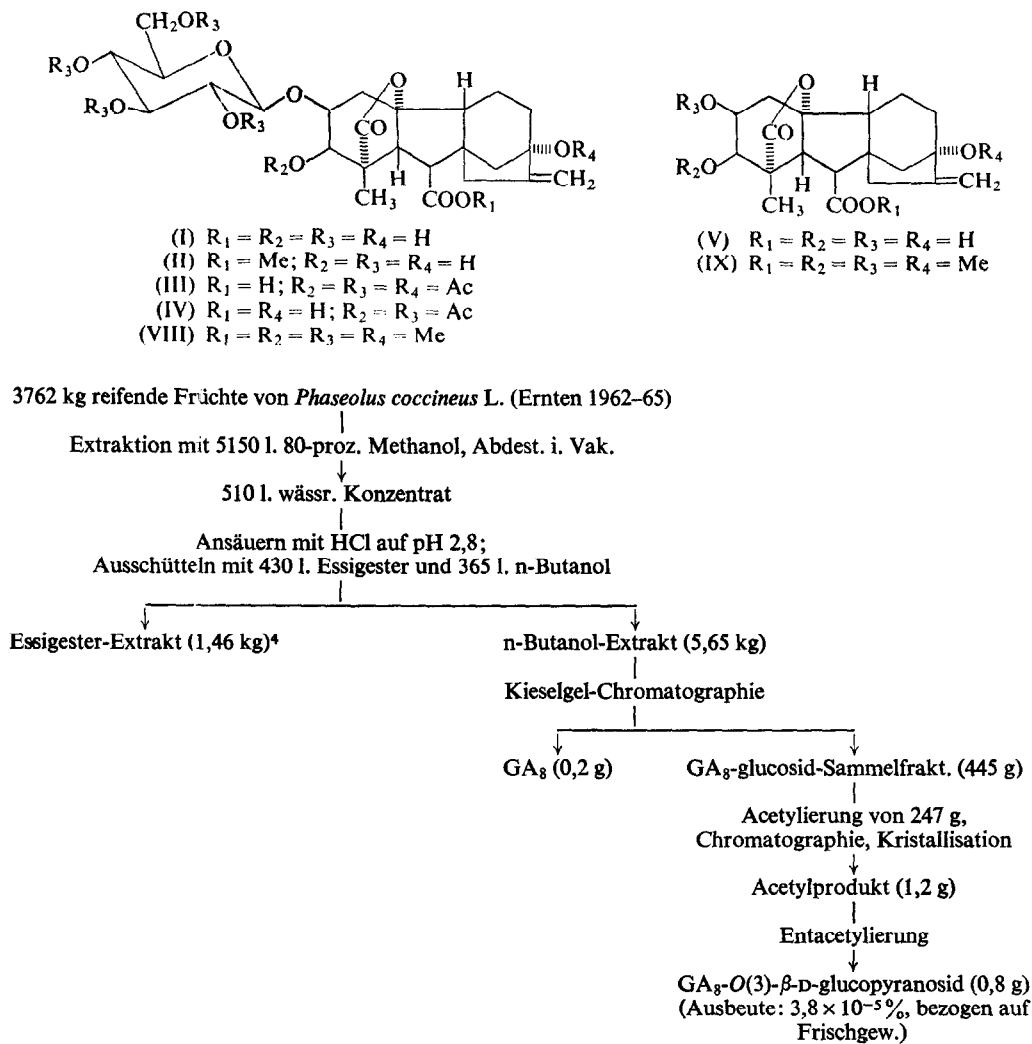


ABB. 1. AUFARBEITUNG DES PFLANZENMATERIALS.

TABELLE 1. AUFARBEITUNG DES PFLANZENMATERIALS (BOHNENSAMEN UND -HÜLSEN) DER ERNTEN 1962–65

Erntejahr	Frischgew. (kg)	Methanol- Extrakt (l.)	wässr. Konzentrat (l.)	Essigester- Extrakt		n-Butanol- Extrakt	
				(l.)	Rückstand (kg)	(l.)	Rückstand (kg)
1962	947	1300	130	110	0,38	90	1,32
1963	713	1200	120	100	0,50	85	1,44
1964	929	1250	120	100	0,27	90	1,30
1965	1173	1400	140	120	0,31	100	1,59
Gesamtmenge	3762	5150	510	430	1,46	365	5,65

Co-Chromatographie der Gibberelline A₁–A₉ und durch Vergleich mit den für die übrigen Gibberelline beschriebenen R_f -Werten⁶ zeigte sich, daß I im dünnschichtchromatographischen Verhalten von den bisher bekannten Gibberellinen abweicht.

Die durch Dünnschichtelektrophorese (DE)⁷ von I an Kieselgel G ermittelte freie elektrophoretische Beweglichkeit $\bar{U}_F=0,42^8$ weist auf das Vorhandensein einer Carboxylgruppe hin, die durch Diazomethan verestert (Methylester II) und auch IR-spektroskopisch (Bande bei 1747 cm⁻¹) nachgewiesen werden konnte. Außerdem ließen sich im IR-Spektrum von I eine γ-Lacton- ($\nu=1784$ cm⁻¹) und eine Methylen-Gruppierung ($\nu=1670$ cm⁻¹) feststellen. Durch mineralisaure Hydrolyse (N H₂SO₄, 100°) wurde I in die Verbindungen VI und VII sowie eine Kohlenhydratkomponente gespalten; diese erwies sich nach DC an Kieselgel G bzw. Kieselgur G als Glucose. VI stimmt in allen Eigenschaften mit einem bereits aus Gibberellin A₈ (V) dargestellten Wagner-Meerwein-Umlagerungsprodukt⁹ überein. Die Struktur von Verbindung VII, die gleichfalls durch saure Hydrolyse von V zugänglich war, ergab sich auf Grund von UV- [$\lambda_{\max}=295$ nm ($>C=O$)], IR- [$\nu_{\max}=1691$ (—COOH), 1730 (5-Ring-Keton), 3598 cm⁻¹ (—OH)] und NMR-Messungen. Das NMR-Spektrum zeigte u. a. neben einem Singulett bei $\delta=1,03$ ppm (CH₃ an C-1) ein weiteres bei $\delta=1,29$ ppm (CH₃ an C-7). Durch Elementaranalyse und Elektronenstoß-Massenspektrum konnten für VI und VII die gleichen Summenformeln, C₁₉H₂₄O₇, abgeleitet werden. VII erwies sich nach dünnschichtelektrophoretischer ($\bar{U}_F=0,73$) und IR-spektroskopischer Untersuchung (keine γ-Lacton-Schwingung) als Dicarbonsäure. Daraus ist auf das Vorhandensein einer C=C-Doppelbindung im Ring A bzw. B zu schließen, deren $\Delta^{4a(4b)}$ -Stellung das NMR-Spektrum bewies (keine Vinylprotonen-Signale).

Bei Hydrolyse von I mit 5-proz. NaOH (6 Stdn., 90°), die keine Glucose-Abspaltung ergab, entstand eine stärker polare Verbindung, die sich dünnschichtelektrophoretisch wie eine Dicarbonsäure verhielt ($\bar{U}_F=0,60$) (Abb. 2). Enzymatische Hydrolyse von I mit β-Glucosidase lieferte quantitativ neben Gibberellin A₈ (V) ein Mol. D-Glucose, wie die mikroanalytische Zuckerbestimmung nach Bancher *et al.*¹⁰ ergab. Die daraus zu folgernde β-D-Pyranosid-Struktur der Glucose in I wurde durch Anwendung der Klyneshen Regel¹¹ (Differenz der molaren Drehungsbeiträge von Glucosid und Aglykon = -12,1°) bestätigt. Beweisend für die β-glucosidische Bindung in I sind ferner die Kopplungskonstanten des Glucose-1-Protons in den NMR-Spektren des Hexaacetats III (Dublett bei $\delta=4,47$ ppm, $J=9$ Hz) und des Hexamethoxy-methylesters VIII (Dublett bei $\delta=4,25$ ppm, $J=7,5$ Hz).

Zur Klärung der Frage, an welche der drei Hydroxygruppen an C-2, 3 und 7 der Glucosylrest gebunden ist, wurde I zum Hexamethoxy-methylester VIII permethyliert,¹² dessen IR-Spektrum Banden bei $\nu_{\max}=1670$ (=CH₂), 1744 (Estercarbonyl), 1775 (γ-Lactoncarbonyl)

⁶ K. C. JONES, Ph.D. Thesis, Los Angeles (1965); R. J. PRYCE und J. MACMILLAN, *Tetrahedron Letters* 4173 (1967); N. TAKAHASHI, N. MUROFUSHI, T. YOKOTA und S. TAMURA, *Tetrahedron Letters* 1065 (1967); S. TAMURA, N. TAKAHASHI, N. MUROFUSHI, T. YOKOTA, J. KATO und Y. SHIOTANI, *Planta* 75, 279 (1967); A. CROZIER und L. J. AUDUS, *Phytochem.* 7, 1923 (1968). Von GA₁₆ sind bisher keine chromatographischen Daten veröffentlicht.

⁷ Vgl. G. SCHNEIDER, G. SEMBDNER und K. SCHREIBER, *J. Chromatog.* 19, 358 (1965).

⁸ Die "freie elektrophoretische Beweglichkeit" \bar{U}_F stellt eine korrigierte Größe dar, bei der die Einflüsse von Barrier-Effekt und Pufferfluß eliminiert sind (l.c.⁷). Im Gegensatz dazu ist die früher von uns verwendete "effektive elektrophoretische Beweglichkeit" U_{Substanz} (l.c.¹) stark von den Versuchsbedingungen abhängig und führte zu der nunmehr revidierten Ansicht, daß "Phaseolus e" neutralen Charakter aufweist.

⁹ J. MACMILLAN, J. C. SEATON und P. J. SUTER, *Tetrahedron* 18, 349 (1962).

¹⁰ E. BANCHER, H. SCHERZ und K. KAINDL, *Mikrochim. Acta (Wien)* 652 (1964).

¹¹ W. KLYNE, *Biochem. J.* 47, xli (1950).

¹² Zur Methodik vgl. R. KUHN, H. TRISCHMANN und I. LÖW, *Angew. Chem.* 67, 32 (1955); K. WALLENFELS, G. BECHTLER, R. KUHN, H. TRISCHMANN und H. EGGE, *Angew. Chem.* 75, 1014 (1963).

und 2835 cm^{-1} ($-\text{OCH}_3$), aber keine OH-Absorption erkennen läßt. Das NMR-Spektrum zeigt die erwarteten sieben Signale für die Protonen der CH_3O -Gruppierungen; das Circular-dichroogramm von VIII stimmt mit dem des kristallinen Trimethoxy- GA_8 -methylesters (IX) im wesentlichen überein. Methanolyse von VIII mit 5-proz. methanol. HCl ergab in 70-proz. Ausbeute das Umlagerungsprodukt X. Die im UV-Spektrum von X bei $\lambda_{\text{max}} = 295\text{ nm}$ auftretende Keroabande ist beweisend für die während der Methanolyse erfolgte Wagner-Meerwein-Umlagerung im Ring C/D. Das IR-Spektrum enthält Banden bei $\nu_{\text{max}} = 1745$

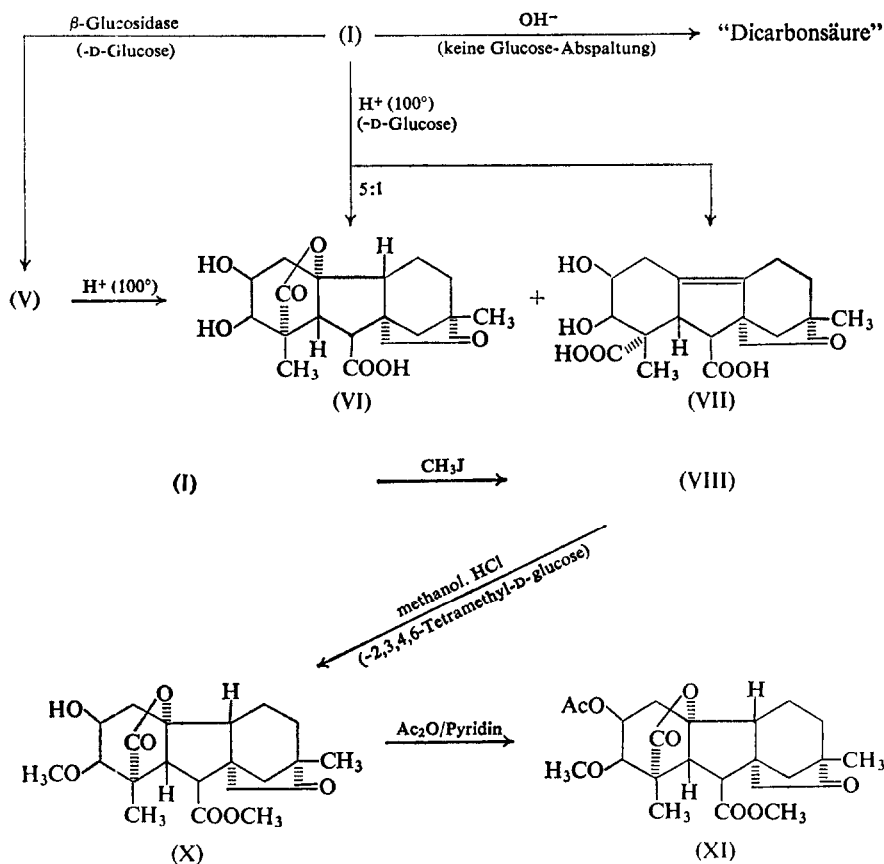


ABB. 2. SCHEMA DER STRUKTURERMITTLUNG VON SUBSTANZ I.

(Estercarbonyl und 5-Ring-Keton), 1783 (γ -Lactoncarbonyl), 2836 ($-\text{OCH}_3$) und 3563 cm^{-1} ($-\text{OH}$). Das Elektronenstoß-Massenspektrum zeigt den der Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_7$ entsprechenden Molekülpeak ($m/e = 392$). Die Zuckerkomponente konnte nach nochmaliger Hydrolyse mit wäbr. HCl durch DC an Kieselgel G als 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose identifiziert werden. Umsetzung von X mit Acetanhydrid/Pyridin lieferte das Acetylderivat XI, dessen NMR-Spektrum ein Septett mit den relativen Bandenintensitäten 1:1:1:2:1:1:1 zentriert bei $\delta = 5,00\text{ ppm}$ für das axiale 3-Proton aufweist (Abb. 3). Damit ist die 3-Stellung der Acetoxygruppe—und zugleich die Position der Glucose an *O*(3) in I—bewiesen. Eine Acetoxygruppe an C-2 würde für das äquatoriale 2-Proton ein Dublett ergeben. Die im

NMR-Spektrum weiterhin vorhandenen Signale sowie die durch UV-, IR- und Elektronenstoß-Massenspektroskopie (M^+ bei $m/e=434$) erhaltenen Daten bestätigen die angegebene Struktur XI.

Das aus *Phaseolus*-Früchten isolierte Gibberellin- A_8 - $O(3)$ - β -D-glucopyranosid (I) gehört ebenso wie das in *Fusarium-moniliforme*-Kulturen vorkommende $O(2)$ -Acetyl-gibberellin A_3 ¹³ zu einem neuen Typ nativer Gibberelline, für den die Bezeichnung "konjugierte Gibberelline" vorgeschlagen wird. Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe, GA_3 -

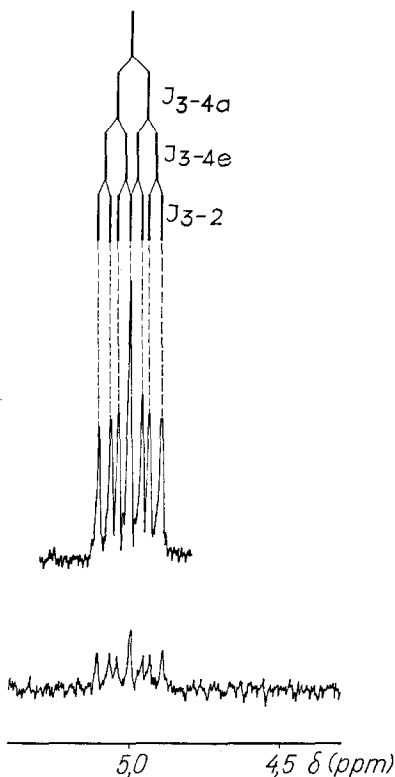


ABB. 3. 3-H-SEPTETT IM 100-MHZ-NMR-SPEKTRUM VON XI (30FACHE VERSTÄRKUNG DURCH CAT-1024; $J_{3-4a} + J_{3-4e} + J_{3-2} = 20$ Hz).

$O(2)$ - β -D-glucopyranosid, wurde kürzlich aus *Pharbitis*-Samen isoliert.¹⁴ Wir beobachteten die rasche Bildung eines radioaktiv markierten GA_3 -hexopyranosids in reifenden Bohnenhülsen nach Applikation von [^{14}C]- GA_3 .³ Die Entstehung eines GA_3 -glucosids *in vitro* nach Inkubation von Blattscheiben verschiedener Pflanzen mit GA_3 und Saccharose wurde von Murakami¹⁵ papierchromatographisch nachgewiesen. Weiterhin treten die in Blutungssäften von Bäumen vorkommenden Gibberelline bevorzugt als Glykoside auf.³

Nach dem postulierten Vorkommen "gebundener Gibberelline"¹⁶ sind polare gibberel-

¹³ K. SCHREIBER, G. SCHNEIDER, G. SEMBDNER und I. FOCKE, *Phytochem.* **5**, 1221 (1966).

¹⁴ S. TAMURA, N. TAKAHASHI, T. YOKOTA und N. MUROFUSHI, *Planta* **78**, 208 (1968).

¹⁵ Y. MURAKAMI, *Botan. Mag. (Tokyo)* **74**, 424 (1961).

¹⁶ M. RADLEY, *Ann. Botany* **22**, 297 (1958); L. LAZER, W. E. BAUMGARTNER und R. V. DAHLSTROM, *J. Agric. Food Chem.* **9**, 24 (1961).

linähnliche Substanzen in Pflanzen mehrfach aufgefunden¹⁷⁻²⁴ bzw. nach Applikation von radioaktiv markierten, nicht-konjugierten Gibberellinen nachgewiesen worden.^{25, 26} Diese strukturell noch unzureichend untersuchten Verbindungen dürften zum größten Teil ebenfalls konjugierte Gibberelline darstellen; bei einigen von ihnen handelt es sich möglicherweise auch um Glykoside. Zur Charakterisierung der Substanzen wurden bisher ihre Löslichkeit in Essigester, n-Butanol bzw. H₂O bei verschiedenen pH-Werten, die Spaltbarkeit durch Glucosidase,^{18, 19} proteolytische Enzyme,^{18-20, 24} Säure^{18, 21, 22, 25} bzw. Alkali²³ sowie das chromatographische Verhalten der biologisch aktiven Komponenten vor und nach Hydrolyse herangezogen. Von diesen offensichtlich meist niedermolekularen Gibberellinformen lassen sich terminologisch die "gebundenen Gibberelline im engeren Sinne" abtrennen. Zu diesen gehören bisher noch weitgehend hypothetische Gibberellin-Symplexe mit Makromolekülen, wie z.B. Eiweißen,²⁴ sowie Assoziationen von Gibberellinen mit Zellstrukturen, über deren Untersuchung mit Hilfe von differenzierter Zentrifugation erste Ergebnisse vorliegen.²⁷

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach Boëtius bestimmt und sind korrigiert. Die Messung der UV-Absorption erfolgte in Methanol. Zur Aufnahme der Elektronenstoß-Massenspektren dienten das Atlas-Massenspektrometer CH 4 und das AEI-Massenspektrometer MS 9. Die Elektronen-anlagerungs-Massenspektren wurden mit einem im Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden-Weißer Hirsch, entwickelten Gerät, die Kernresonanz-Spektren mit dem Varian-Spektrometer HA-100 (in CDCl₃ als Lösungsmittel und mit Tetramethylsilan als innerem Standard) und die Circular dichroismen mit einem Roussel-Jouan-Dichrographen aufgenommen.—Zur Mikroelementaranalyse wurden die Proben bei der angegebenen Temp. i. Hochvak. über P₂O₅ und Paraffin bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.—Der verwendete Petroläther siedete bei 60–70°.

Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Frisch geerntete Früchte (Hülsen und Samen) der Prunkbohne, *Phaseolus coccineus* L. var. *coccineus* cv. "Preisgewinner", wurden grob zerkleinert, in 80-proz. wäbr. Methanol eingelegt und nach ca. 14 d abgepreßt. Die vereinigten Methanolauszüge wurden im Vakuum-Umlaufverdampfer (70° Badtemp.) bis zu einem wäbr. Konzentrat eingedunstet, dieses mit HCl auf pH 2,8 angesäuert und 3 mal mit Essigester sowie anschließend 2 mal mit n-Butanol extrahiert (vgl. Abb. 1 und Tab. 1).

Säulenchromatographie

Der Rückstand der n-Butanolextrakte (insgesamt 5,65 kg) wurde nach Adsorption an Celite 503 (insgesamt ca. 6 kg) in 16 Portionen an je 2,5 kg Kieselgel (0,1–0,5 mm; VEB Feinchemie Eisenach und VEB Laborchemie Apolda) chromatographiert (Trennsäule: 10×65 cm; Fraktionsgröße: 200 ml). Die Gradientenelution erfolgte nach folgendem Schema:

¹⁷ Y. MURAKAMI, *Botan. Mag. (Tokyo)* **74**, 241 (1961); Y. MURAKAMI, *Botan. Mag. (Tokyo)* **75**, 451 (1962); Y. OGAWA, *Plant Cell Physiol.* **4**, 217 (1963); R. J. WEAVER und R. M. POOL, *Plant Physiol.* **40**, 770 (1965); H. HARADA und J. P. NITSCH, *Symp. Wachstumsregulatoren bei Pflanzen*, Rostock/Kühlungsborn 1966, S. 591, Rostock (1967); T. HASHIMOTO und L. RAPPAPORT, *Plant Physiol.* **41**, 623 (1966); Y. OGAWA, *Botan. Mag. (Tokyo)* **79**, 1 (1966); Y. OGAWA, *Botan. Mag. (Tokyo)* **79**, 69 (1966); J. M. BRISTOW und J. A. SIMMONDS, *6th Int. Conf. Plant Growth Regulators*, Ottawa (1967); E. REINHARD und W. KONOPKA, *Planta* **77**, 58 (1967); Y. MURAKAMI, *Botan. Mag. (Tokyo)* **81**, 278 (1968).

¹⁸ A. J. VLITOS, B. H. MOST, M. B. O'TOOLE, A. HUGHES und T. A. BULL, *Tate and Lyle C.A.R.S. Ann. Report* 467 (1965).

¹⁹ E. REINHARD und R. SACHER, *Experientia* **23**, 415 (1967).

²⁰ A. J. MCCOMB, *Nature* **192**, 575 (1961); D. F. JONES, *Nature* **202**, 1309 (1964).

²¹ G. SEMBDNER und K. SCHREIBER, *Phytochem.* **4**, 49 (1965).

²² L. H. AUNG und A. A. DE HERTOGH, *6th Int. Conf. Plant Growth Regulators*, Ottawa (1967).

²³ A. BHANJA und S. M. SIRCAR, *Sci. and Cult.* **32**, 371 (1966).

²⁴ R. L. JONES, *Planta* **81**, 97 (1968).

²⁵ G. W. M. BARENDSE, H. KENDE und A. LANG, *Plant Physiol.* **43**, 815 (1968).

²⁶ H. KENDE, *Plant Physiol.* **42**, 1612 (1967).

²⁷ T. YAMAKI, *Régulateurs Naturels de la Croissance Végétale*, p. 319, Paris (1964); H. KENDE und C. GINZBURG, *6th Int. Conf. Plant Growth Regulators*, Ottawa (1967).

Chloroform (ml)		Essigester (ml)		Methanol (ml)
1 000				
750	+	250		
500	+	500		
250	+	750		
		1 000		
		950	+	50
		900	+	100
		850	+	150
		800	+	200
		15 000	+	5 000

Nach dünnsschichtchromatographischer Prüfung und Vereinigung der entsprechenden Fraktionen wurden eine GA₈- (684 g) und eine GA₈-glucosid-Rohfraktion (1966 g) erhalten und diese erneut an 2 (GA₈) bzw. 6 (GA₈-glucosid) Kieselgel-Säulen in der oben beschriebenen Weise chromatographiert, wonach sich eine GA₈-Sammelfraktion von 96 g und eine GA₈-glucosid-Sammelfraktion von 445 g ergaben.

Gibberellin A₈ (V)

Die GA₈-Sammelfrakt. (96 g) wurde nach Adsorption an 80 g Celite 503 an 500 g Kieselgel (Trennsäule: 4,6 × 62 cm) rechromatographiert (Elution mit Essigester-Methanol=9:1, 50-ml-Frakt.). Erneute Chromatographie der Frakt. 49–58 (5 g) an 100 g Kieselgel "Woelm zur Verteilungschromatographie" (Trennsäule: 2,6 × 26 cm; Fließmittel: Essigester) ergab 212 mg amorphes V. $[\alpha]_D^{23} + 14,1^\circ$ ($c=0,46$, Methanol) [Lit.⁹: $[\alpha]_D^{23} + 13^\circ$ ($c=2,05$, Methanol)]. Zur Analyse wurde bei 100° getrocknet. Gef.: C, 62,87; H, 6,53. Ber. für C₁₉H₂₄O₇ (364,4): C, 62,62; H, 6,64%. IR (in Acetonitril): 1660 (=CH₂), 1745 (—COOH), 1784 (γ-Lactoncarbonyl), 3483 und 3611 cm⁻¹ (—OH).

Gibberellin-A₈-O(3)-β-D-glucopyranosid (2β,4α,7α-Trihydroxy-3β-(β-D-glucopyranosyloxy)-1β-methyl-8-methylen-4bβ-gibban-1,10β-dicarbonsäure-1→4α-lacton, I)

Von der GA₈-glucosid-Sammelfrakt. (445 g) wurden 247 g über P₂O₅ getrocknet und mit 500 ml Acetanhydrid-Pyridin (2:3) acetyliert (6 d, Raumtemp.). Der nach üblicher Aufarbeitung erhaltene Rückstand des Essigesterauszuges (26 g) wurde nach Adsorption an 25 g Celite 503 an 500 g Kieselgel (Merck; 0,05–0,2 mm) chromatographiert (Trennsäule: 4,6 × 62 cm). Elution mit Essigester und 2malige Kristallisation des Acetylprodukts aus Essigester-Petroläther lieferte 1197 mg Nadeln. Entacetylierung nach Zemplén²⁸ mit katalytischen Mengen NaOCH₃ ergab 812 mg I (amorph; $3,8 \times 10^{-5}$ % des Pflanzenmaterials); $[\alpha]_D^{17} + 6,7^\circ$ ($c=0,60$, Methanol). Zur Analyse wurde bei 60° getrocknet. Gef.: C, 56,72; H, 6,71. C₂₅H₃₄O₁₂ (526,6) erfordert: C, 57,02; H, 6,51%. IR (in Acetonitril): 1670 (=CH₂), 1747 (—COOH), 1784 (γ-Lactoncarbonyl), 3482 cm⁻¹ (—OH). DE: $\bar{\nu}_F=0,42 \mu \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm} \cdot \text{Volt}^{-1}$.

Methylester von I (2β,4α,7α-Trihydroxy-3β-(β-D-glucopyranosyloxy)-1β-methyl-8-methylen-1-carboxy-4bβ-gibban-10β-carbonsäuremethylester-1→4α-lacton, II)

10 mg I in 2 ml absol. Methanol wurden bis zur bleibenden Gelbfärbung mit Diazomethan versetzt. Nach Abdestillation des Lösungsmittels i. Vak. und Umfällen aus Methanol-Petroläther konnten 9 mg II erhalten werden. Amorph, $[\alpha]_D^{17} - 4,9^\circ$ ($c=0,51$, Äthanol).

Hydrolyse von I

(a) mit N H₂SO₄. 25 mg I wurden in 10 ml N H₂SO₄ 6 Stdn. auf 100° erhitzt. Das Hydrolysat enthielt zwei Hauptprodukte (DC, Entwicklungsgemisch F, $R_{\text{standard}}=0,84$ (a) bzw. 0,20 (b), vgl. Tab. 2), die durch präparative DC getrennt wurden. Kristallisation von (a) ergab 10 mg VI (59% d. Th.), Prismen (aus Essigester-Petroläther) vom Schmp. 258–260°; identisch mit aus V dargestelltem VI (Massenspektrum, IR-Absorption, DC, DE, Mischschmp.). Substanz (b) lieferte 2 mg VII (12% d. Th.), amorph; identisch mit aus V gewonnenem VII (Massenspektrum, DC, DE).

Die Kohlenhydratkomponente in der wäßr. Phase wurde dünnsschichtchromatographisch als Glucose identifiziert (Kieselgel G, n-Propanol-Essigester-H₂O=7:2:1, $R_f=0,46$; Kieselgur G, imprägniert mit 0,1 M Natriumacetat, Essigester-Isopropanol-H₂O=32:12:6, $R_f=0,30$; Detektion mit Anilinhydrogenphthalat).

²⁸ Vgl. G. ZEMPLÉN, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 59, 1258 (1926); G. ZEMPLÉN und E. PACSU, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 62, 1613 (1929).

(b) mit 5-proz. NaOH. 1 mg I wurde in 3 ml 5-proz. NaOH erhitzt (6 Stdn., 90°), abgekühlt und mit N H₂SO₄ neutralisiert. Die entstandene Verbindung erwies sich dünnschichtelektrophoretisch ($U_F=0,60 \mu \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{cm} \cdot \text{Volt}^{-1}$) als Dicarbonsäure (DC, Gemisch F: $R_F=0$). Das Hydrolysat enthielt keine Glucose.

(c) mit β -Glucosidase. 5 mg I in 0,5 ml 0,5 M Acetatpuffer (pH 5,0) wurden mit 0,05 mg β -Glucosidase (E.L. 33-63; Röhm & Haas GmbH, Darmstadt) inkubiert. Nach 48 Stdn. (30°) war I quantitativ in V und D-Glucose gespalten, wie die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte. Quantitative Glucosebestimmung¹⁰: Ber. 34,2; Gef. 33,6%.

TABELLE 2. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHES VERHALTEN VON I, SEINER DERIVATE UND ABBAUPRODUKTE

Verbindung	Mittlere R_{Standard} -Werte (R_F von GA ₃ =1,00)*						
	A	B	C	D	E	F	G
I	0	0	0	0	0	0,37	0,42
II	0,05	0	0	0	0	0,83	0,91
III	2,1	—	4,4	4,6	1,9	1,36	1,38
IV	1,6	—	2,2	2,4	0,6	1,15	1,21
V	0,57	0,47	—	0,5	0,4	0,72	0,76
VI	0,77	0,68	—	0,7	0,4	0,84	0,91
VII	0,83	0,68	—	1,0	0,9	0,20	0,25
VIII	2,3	—	5,0	5,5	2,5	—	—
IX	—	—	5,2	6,6	5,9	1,38	1,52
X	1,95	—	3,7	3,4	1,6	—	—
XI	2,4	—	5,1	5,8	4,1	—	—

* DC an Kieselgel G (MERCK), Laufstrecke 15 cm, mit den Entwicklungsgemischen: (A) Chlf.-Essigester-Essigsäure, 5:4:1 (R_F A₃=0,39); (B) Chlf.-Essigester-Essigsäure, 60:40:5 (R_F A₃=0,21); (C) Chlf.-Essigester-Essigsäure, 70:30:5 (R_F A₃=0,17); (D) Benzol-Essigsäure, 10:3 (R_F A₃=0,14); (E) Diisopropyläther-Essigsäure, 95:5 (R_F A₃=0,15); (F) Isopropanol-5 N Ammoniak, 5:1 (R_F A₃=0,57); (G) Isopropanol-3 N Ammoniak, 5:1 (R_F A₃=0,61); 0=Substanz am Startpunkt.

Hexaacetat von I (4 α ,7 α -Dihydroxy-2 β ,7 α -diacetoxy-3 β -(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1 β -methyl-8-methylen-4 β -gibban-1,10 β -dicarbonsäure-1 \rightarrow 4 α -lacton, III)

50 mg I wurden mit 5 ml Acetanhydrid-Pyridin (2:3) acetyliert (48 Stdn., Raumtemp.). Nach üblicher Aufarbeitung zeigten sich im DC zwei Reaktionsprodukte, die präparativ-dünnschichtchromatographisch getrennt wurden (Kieselgel G, Gemisch C: $R_F=0,70$ bzw. 0,33). Die Zone mit $R_F=0,70$ lieferte 52 mg III (71 % d. Th.), Nadeln (aus Essigester-Petroläther), Schmp. 247°, $[\alpha]_D^{18} + 14,6^\circ$ ($c=0,48$, Chlf.). Zur Analyse wurde bei 100° getrocknet. Gef.: C, 56,98; H, 6,00. C₃₇H₄₆O₁₈ (778,8) erfordert: C, 57,06; H, 5,95%. IR (in Chlf.): 1260 (O-Acetyl), 1672 (=CH₂), 1720 (Schulter, —COOH), 1764 (O-Acetyl), 1785 cm⁻¹ (Schulter, γ -Lactoncarbonyl). NMR: $\delta=1,07$ (s; 12-H₃), 1,95 (s; 2-OAc), 1,99 (2s; 7-OAc, OAc), 2,02 (s; OAc), 2,05 (s; OAc), 2,09 (s; OAc), 2,62 (d, $J=11$ Hz; 10-H), 3,15 (d, $J=10$ Hz; 10a-H), 4,47 ppm (d, $J=9$ Hz; Glucose-1-H). Elektronenstoß-Massenspektrum: 778 m/e (M⁺). Elektronenanlagerungs-Massenspektrum: 777 (M⁻-1), 735 m/e .

Pentaacetat von I (4 α ,7 α -Dihydroxy-2 β -acetoxy-3 β -(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1 β -methyl-8-methylen-4 β -gibban-1,10 β -dicarbonsäure-1 \rightarrow 4 α -lacton, IV)

Die Zone mit $R_F=0,33$ der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Acetylierungsproduktes von I (vgl. vorstehendes Präparat) ergab 6 mg (9 % d. Th.) Nadeln, Schmp. 249° (aus Essigester), $[\alpha]_D^{18} - 2,6^\circ$ ($c=0,58$, Äthanol). C₃₅H₄₄O₁₇ (736,7); Elektronenanlagerungs-Massenspektrum: 735 m/e (M⁻-1). IR (in Chlf.): 1262 (O-Acetyl), 1667 (=CH₂), 1718 (Schulter, —COOH), 1764 (O-Acetyl), 1785 (Schulter, γ -Lactoncarbonyl), 3600 cm⁻¹ (—OH). NMR: $\delta=1,08$ (s; 12-H₃), 1,96 (s; 2-OAc), 2,00 (s; OAc), 2,03 (s; OAc), 2,06 (s; OAc), 2,09 (s; OAc), 2,63 (d, $J=11$ Hz; 10-H), 3,17 ppm (d, $J=10$ Hz; 10a-H).

2 β ,3 β ,4 α -Trihydroxy-8-oxo-1 β ,7 β -dimethyl-4 β -gibban-1,10 β -dicarbonsäure-1 \rightarrow 4 α -lacton (VI)

50 mg V wurden in 20 ml 2 N HCl 4 Stdn. unter Rückfluß erhitzt, anschließend mit 20 ml H₂O verdünnt und 3 mal mit je 20 ml Essigester extrahiert. Der eingeengte Extrakt enthielt 2 Hauptkomponenten, die durch präparative DC getrennt wurden (Kieselgel G, Gemisch F: $R_{\text{Standard}}=0,85$ bzw. 0,20; R_F A₃=1,00).

Aus der Zone mit $R_{\text{Standard}}=0,85$ wurden 31 mg VI (62% d. Th.) erhalten; Prismen vom Schmp. 261° (aus Essigester-Petroläther) (Lit.⁹: 259–263°); $[\alpha]_D^{25} + 33,1^\circ$ ($c=0,65$, Methanol). Zur Analyse wurde bei 100° getrocknet. Gef.: C, 62,27; H, 6,67. Ber. für C₁₉H₂₄O₇ (364,4): C, 62,62; H, 6,64%. IR (in Nujol): 1696 (—COOH), 1733 (5-Ring-Keton), 1780 (γ-Lactoncarbonyl), 3270 und 3512 cm⁻¹ (—OH). UV: $\lambda_{\text{max}}=293$ nm ($\log \epsilon=1,59$). Elektronenstoß-Massenspektrum: 364 m/e (M⁺); Elektronenanlagerungs-Massenspektrum: 363 m/e (M⁻—1). DE: $\bar{U}_F=0,57 \mu\text{sec}^{-1}\cdot\text{cm}\cdot\text{Volt}^{-1}$.

2β,3β-Dihydroxy-8-oxo-1β,7β-dimethyl-gibb-4a(4b)-en-1,10β-dicarbonsäure (VII)

Die DC-Zone mit $R_{\text{Standard}}=0,20$ (vgl. vorstehendes Präparat) ergab 7 mg VII (14% d. Th.). Prismen vom Schmp. 258° (aus Essigester-Petroläther), $[\alpha]_D^{18} - 62,8^\circ$ ($c=0,47$, Methanol). Zur Analyse wurde bei 100° getrocknet. Gef.: C, 62,55; H, 6,45. C₁₉H₂₄O₇ (364,4) erfordert: C, 62,62; H, 6,64%. IR (KBr): 1691 (—COOH), 1730 (5-Ring-Keton), 3280 und 3598 cm⁻¹ (—OH). UV: $\lambda_{\text{max}}=295$ nm ($\log \epsilon=1,54$). Elektronenstoß-Massenspektrum: 364 m/e (M⁺); Elektronenanlagerungs-Massenspektrum: 363 m/e (M⁻—1). NMR: $\delta=1,03$ (s; 12-H₃), 1,29 (s; 7-CH₃), 2,53 ppm (d, $J=6$ Hz; 10-H), keine Vinylprotonensignale. DE: $\bar{U}_F=0,73 \mu\text{sec}^{-1}\cdot\text{cm}\cdot\text{Volt}^{-1}$.

Trimethoxy-gibberellin-A₈-methylester (4α-Hydroxy-2β,3β,7α-trimethoxy-1β-methyl-8-methylen-1-carboxy-4bβ-gibban-10β-carbonsäuremethylester-1→4a-lacton, IX)

37 mg V in 0,5 ml Dimethylformamid wurden mit 0,1 ml CH₃J und 0,1 g Ag₂O versetzt und im verschlossenen Reaktionsgefäß 48 Stdn. geschüttelt. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde mit 0,3 ml Chlf. gewaschen, die vereinigten Lösungen mit 3 ml H₂O und 11 mg KCN versetzt und 5 mal mit je 2 ml Chlf. ausgeschüttelt. Die vereinigten Chlf.-Extrakte wurden schließlich 4mal mit je 2 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Kristallisation aus wenig Methanol lieferte 34 mg IX (83% d. Th.). Blättchen vom Schmp. 105–108°, $[\alpha]_D^{18} + 40,4^\circ$ ($c=0,73$, Methanol). C₂₃H₃₂O₇ (420,5); Elektronenstoß-Massenspektrum: 420 m/e (M⁺); Elektronenanlagerungs-Massenspektrum: 420 m/e (M⁻). IR (in Chlf.): 1667 (—CH₂), 1744 (Ester-carbonyl), 1774 (γ-Lactoncarbonyl), 2832 cm⁻¹ (—OCH₃). NMR: $\delta=1,16$ (s; 12-H₃), 3,14 (s; 7-OCH₃), 3,36 (s; 2-OCH₃), 3,60 (s; 3-OCH₃), 3,70 ppm (s; 10-COOCH₃). CD: $\Delta\epsilon_{235}=-0,53$ (negatives Maximum); $c=0,91$ mg/l, 9692 g Dioxan.

Hexamethoxy-methylester von I (4α-Hydroxy-2β,7α-dimethoxy-3β-(2,3,4,6-tetra-O-methyl-β-D-glucopyranosyloxy)-1β-methyl-8-methylen-1-carboxy-4bβ-gibban-10β-carbonsäuremethylester-1→4a-lacton, VIII)

250 mg I in 5 ml Dimethylformamid wurden in der beschriebenen Weise (vgl. IX) permethyliert und ergaben 265 mg VIII (90% d. Th.). Amorph, $[\alpha]_D^{18} + 10,0^\circ$ ($c=1,05$, Methanol). IR (in Chlf.): 1670 (—CH₂), 1744 (Ester-carbonyl), 1775 (γ-Lactoncarbonyl), 2835 cm⁻¹ (—OCH₃). NMR: $\delta=1,16$ (s; 12-H₃), 3,18 (s; 7-OCH₃), 3,37 (s; 2-OCH₃), 3,51 (s; OCH₃), 3,56 (s; OCH₃), 3,61 (s; OCH₃), 3,63 (s; OCH₃), 3,70 (s; 10-COOCH₃), 4,25 ppm (d, $J=7,5$ Hz; Glucose-1-H). CD: $\Delta\epsilon_{240,5}=-0,26$ (negatives Maximum); $c=3,02$ mg/2,25 g Dioxan.

3β,4α-Dihydroxy-2β-methoxy-8-oxo-1β,7β-dimethyl-1-carboxy-4bβ-gibban-10β-carbonsäuremethylester-1→4a-lacton (X)

250 mg VIII wurden in 10 ml 5-proz. methanol. HCl 2 Stdn. zum Sieden erhitzt, anschließend mit 5 ml H₂O versetzt und i. Vak. auf 3 ml eingeeengt. Nach Zugabe von 7 ml H₂O wurde 3 mal mit je 5 ml Essigester extrahiert, die Essigester-Auszüge über Na₂SO₄ getrocknet, eingeeengt und chromatographiert (20 g Kieselgel "Woelm für die Verteilungschromatographie"; Trennsäule: 1,1 × 26 cm; Elution mit Petroläther-Chlf. = 6:4, Fraktionsgröße: 5 ml). Die Frakt. 103–203 ergaben 114 mg X (70% d. Th.), Blättchen (aus Essigester-Petroläther), Schmp. 185–186°, $[\alpha]_D^{17} + 47,1^\circ$ ($c=0,35$, Methanol). C₂₁H₂₈O₇ (392,4); Elektronenstoß-Massenspektrum: 392 m/e (M⁺); Elektronenanlagerungs-Massenspektrum: 391 m/e (M⁻—1). IR (in Chlf.): 1745 (5-Ring-Keton, Ester-carbonyl), 1783 (γ-Lactoncarbonyl), 2836 (—OCH₃), 3563 cm⁻¹ (—OH). UV: $\lambda_{\text{max}}=295$ nm ($\log \epsilon=1,69$).

Zum Nachweis der Kohlenhydratkomponente von VIII wurde die wäbr. Phase (pH 1) nach Essigester Extraktion 3 Stdn. zum Sieden erhitzt. Die Entfernung der HCl erfolgte durch Eindampfen über KOH (i. Vak., Raumtemp.). Die mit Anilinhydrogenphthalat detektierte Substanz stimmte dünnschichtchromatographisch mit authentischer 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucose überein (Kieselgel G; Äther-Benzol=2:1, $R_f=0,19$; n-Propanol-Essigester-H₂O=7:2:1, $R_f=0,87$).

4α-Hydroxy-2β-methoxy-3β-acetoxy-8-oxo-1β,7β-dimethyl-1-carboxy-4bβ-gibban-10β-carbonsäuremethylester-1→4a-lacton (XI)

38 mg X in 2 ml Pyridin wurden mit 1,2 ml Acetanhydrid acetyliert (18 Stdn., Raumtemp.). Übliche Aufarbeitung und Kristallisation aus Essigester-Petroläther ergaben 23 mg XI (58% d. Th.), feine Nadeln, die sich in der Mutterlauge in Prismen umwandelten. Schmp. 192–193°, $[\alpha]_D^{18} + 35,9^\circ$ ($c=0,64$, Methanol). C₂₃H₃₀O₈ (434,5); Elektronenstoß-Massenspektrum: 434 m/e (M⁺); Elektronenanlagerungs-Massenspektrum: 433 m/e (M⁻—1). IR (in Chlf.): 1260 (O-Acetyl), 1749 (5-Ring-Keton, 2 Ester-carbonyl), 1787 (γ-Lacton-

carbonyl), 2837 cm^{-1} ($-\text{OCH}_3$). UV: $\lambda_{\text{max}}=295\text{ nm}$ ($\log \epsilon=1,72$). NMR: $\delta=1,04$ (s; 12-H_3), $1,22$ (s; 7-CH_3), $1,56$ (s; 11-H_2), $2,07$ (s; 3-OAc), $2,57$ (d, $J=7\text{ Hz}$; 10-H), $2,86$ bzw. $3,05$ (dd, $J=3,5\text{ Hz}$; 4b-H), $3,27$ (d, $J=7\text{ Hz}$; 10a-H), $3,52$ (d, $J=4\text{ Hz}$; 2-H), $3,54$ (s; 2-OCH_3), $3,73$ (s; 10-COOCH_3), $5,00\text{ ppm}$ (Septett, $J_{3-4\text{a}}+J_{3-4\text{b}}+J_{3-2}=20\text{ Hz}$; 3-H).

Anerkennung—Die NMR-Spektren wurden in dankenswerter Weise von den Herren Prof. Dr. F. Bohlmann, Berlin, und Priv.-Doz. Dr. H. Budzikiewicz, Braunschweig, angefertigt. Herrn Dr. Budzikiewicz danken wir außerdem für die Aufnahme der Elektronenstoß-Massenspektren, Herrn Dr. R. Tümmeler, Dresden, für die Elektronenanlagerungs-Massenspektren und Herrn Dozent Dr. G. Snatzke, Bonn, für die Circular dichro-gramme. Herrn Prof. Dr. K. Meyer, Basel, sind wir für die Überlassung des β -Glucosidase-Präparates sowie Frau G. Pufahl und Frau J. Kilian für technische Mitarbeit zu Dank verpflichtet. Die Elementaranalysen wurden von Herrn R. Martin, Leipzig, und in den Forschungslaboratorien der CIBA AG, Basel, ausgeführt.