

GIBBERELLINE—XV¹ SYNTHESE VON O(2)- β -D-GLUCOPYRANOSYL-GIBBERELLIN- A_3 -METHYLESTER

K. SCHREIBER, J. WEILAND² und G. SEMBDNER

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

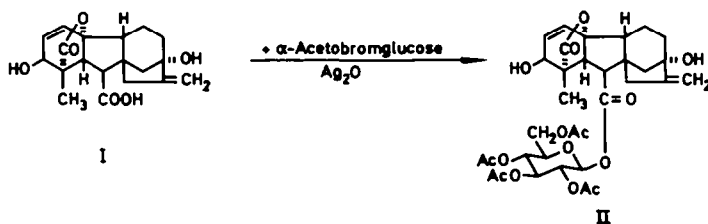
(Received in Germany 7 July 1969; Received in UK for publication 22 July 1969)

Zusammenfassung—Umsetzung von Gibberellin- A_3 -methylester (III) mit α -Acetobromglucose nach Koenigs und Knorr mit nachfolgender Entacetylierung ergibt in 18-proz. Ausbeute O(2)- β -D-Glucopyranosyl- GA_3 -methylester (V). Aus GA_3 (I) entsteht unter den Bedingungen der Koenigs-Knorr-Synthese der Tetraacetyl- β -D-glucopyranosylester II.

Abstract—O(2)- β -D-Glucopyranosyl-gibberellin A_3 methylester (V) has been prepared in 18% yield by Koenigs-Knorr-synthesis from gibberellin A_3 methyl ester (III) and α -acetobromoglucose as well as subsequent deacetylation. Reaction of GA_3 (I) with α -acetobromoglucose led to the tetraacetyl- β -D-glucopyranosyl ester II.

GIBBERELLINGLYKOSIDE sind in höheren Pflanzen offensichtlich weit verbreitet und besitzen im Gibberellinstoffwechsel der Pflanzen Bedeutung als desaktivierte Reserve- und Ferntransportformen.^{1,3} Isoliert und strukturell aufgeklärt wurden bisher Gibberellin- A_8 -O(3)- β -D-glucopyranosid aus Früchten von *Phaseolus coccineus* L.^{1,4} sowie Gibberellin- A_3 -O(2)- β -D-glucopyranosid aus *Pharbitis*-Samen.⁵ Die präparative Gewinnung von Gibberellinglucosiden aus Pflanzenmaterial ist sehr aufwendig (z.B. $4 \cdot 10^{-5}$ % Ausbeute bei frischen Bohnenfrüchten); daher erschien eine Synthese dieser konjugierten Gibberelline von besonderem Interesse.

Umsetzung von Gibberellin A_3 (GA_3 , I) unter den Bedingungen der Koenigs-Knorr-Synthese⁶ mit α -Acetobromglucose und überschüssigem Ag_2O in Dioxan/Benzol ergab in 29-proz. Ausbeute eine Verbindung vom Schmp. 216° und $[\alpha]_D^{19} = 52.1^\circ$, die durch Elementaranalyse, Dünnschichtelektrophorese (DE)⁷ ($\bar{U}_F = O$), Elektronenanlagerungs-Massenspektrum (M^- bei $m/e = 676$) und IR-Spektrum [$\nu_{max} = 1262$ (Acetyl), 1667 ($=CH_2$), 1765 (Estercarbonyl, γ -Lactoncarbonyl) und 3605 cm^{-1} ($-OH$)] als Tetraacetyl- β -D-glucopyranosylester von I (II) identifiziert wurde. Die Darstellung von II aus dem Ag-Salz von I durch Reaktion mit α -Acetobromglucose in Dioxan ist bereits beschrieben.⁸



Um die Bildung des Glucosylesters II auszuschliessen, wurde I mit Diazomethan in den Methylester III übergeführt und dieser in gleicher Weise umgesetzt. Die Entacetylierung des entstandenen Tetraacetats IV mit katalytischen Mengen NaOCH_3 nach Zemplén⁹ ergab in 18-proz. Ausbeute amorphen O(2)- β -D-Glucopyranosyl-GA₃-methylester (V), $[\alpha]_D^{18} + 58.9^\circ$. Struktur V konnte durch folgende Untersuchungen bewiesen werden.

β -Glucosidase spaltete das synthetisierte Glykosid V quantitativ in je ein Mol. III und D-Glucose, woraus die β -D-Pyranosid-Form der Glucose abzuleiten ist. Die für V zu fordernde Summenformel $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$ stimmt mit dem Elektronenanlagerungs-Massenspektrum überein (M^- bei $m/e = 522$). Acetylierung von IV bzw. V mit Acetanhydrid/Pyridin lieferte das Pentaacetat VI, das sowohl im Elektronenanlagerungs- als auch im Elektronenstoss-Massenspektrum den erwarteten Molekülpeak bei $m/e = 732$ aufweist. Die Stellung des Glucosylrestes ergab sich durch Vergleich des Verhaltens von III und IV bei Dehydrierung mit MnO_2 . Verbindung III liess sich auf diese Weise durch Dehydrierung der allylischen 2-Hydroxy-Gruppe in das Keton VII überführen, dessen UV-Spektrum neben der $n \rightarrow \pi^*$ -Bande bei $\lambda_{\text{max}} = 344 \text{ nm}$ die für α, β -ungesättigte Ketone charakteristische $\pi \rightarrow \pi^*$ -Bande bei $\lambda_{\text{max}} = 228 \text{ nm}$ aufweist. Eine entsprechende UV-Absorption tritt nach Umsetzung von IV mit MnO_2 nicht auf, was als Beweis für die O(2)-Stellung des Glucosylrestes zu werten ist. Das dünnstschichtchromatographische Verhalten von V in vier Entwicklungsgemischen ist in Tabelle 1 dargestellt.

TABELLE 1. DÜNNSTREIFCHROMATOGRAPHISCHES VERHALTEN DER VERBINDUNGEN II, III, V UND VI

Verbindung	Mittlere R_{Standard} -Werte			$(R_F \text{ von } A_3 = 1.00)^*$
	A	B	C	
II	1.40	2.32	1.16	1.49
III	1.45	2.67	2.22	1.45
V	0.09	0	0	1.03
VI	1.94	4.71	5.46	1.51

* DC an Kieselgel G (Merck), Laufstrecke 15 cm, mit den Entwicklungsgemischen:

A: Chlf.-Essigester-Essigsäure, 5:4:1 ($R_F A_3 = 0.45$);

B: Chlf.-Essigester-Essigsäure, 70:30:5 ($R_F A_3 = 0.17$);

C: Benzol-Essigsäure, 10:3 ($R_F A_3 = 0.11$);

D: Isopropanol-5N Ammoniak, 5:1 ($R_F A_3 = 0.58$);

O: Substanz am Startpunkt.

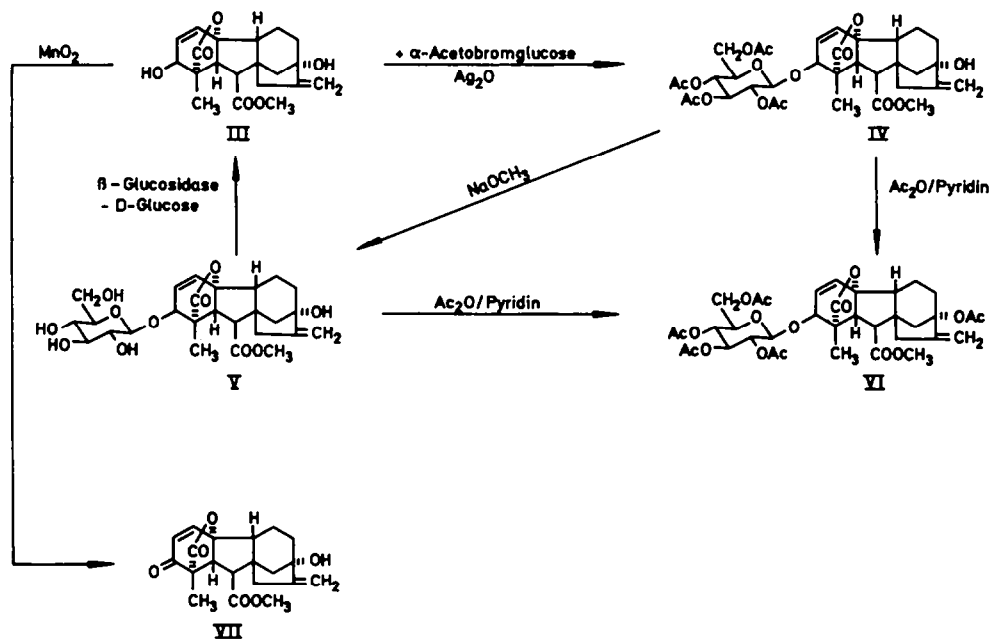
Die biologische Aktivität von V ist ebenso wie jene von GA₃-methylester (III) sehr gering und erreicht im Biotest mit Mais-Zwergmutanten in Dunkelheit einen Wert von 10^{-3} bezogen auf GA₃ = 1; bei im Licht kultivierten Testpflanzen ist die Verbindung praktisch wirkungslos (vgl. Tabelle 2).

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach Boëtius bestimmt und sind korrigiert. Die IR-Absorption wurde mit dem Zeiss-Zweistrahlspektralphotometer UR 10, die UV-Absorption in Äthanol mit dem Perkin-Elmer-Spektralphotometer 137 UV gemessen. Zur Aufnahme der Elektronenanlagerungs-Massenspektren diente ein im Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden, entwickeltes

TABELLE 2. BIOLOGISCHE AKTIVITÄT DER VERBINDUNGEN I, III UND V

Gibberellin	$\mu\text{g/Pfl.}$	Reaktion der Mais-Zwergmutanten d_1 und d_3 (Länge der 1. + 2. Blattscheide, mm)			
		Licht		Dunkelheit	
		d_1	d_3	d_1	d_3
A_3 (I)	0	27	19	35	22
	0.01	45	42	51	44
	0.1	67	58	69	84
A_3 -Methylester (III)	1	27		49	
	10	37	32	54	44
Gluc.- A_3 - methylester (V)	1.5	22		42	
	15	32	22	55	39



Gerät; das Elektronenstoss-Massenspektrum wurde mit dem AEI-Massenspektrometer MS 9 aufgenommen. Zur Mikroelementaranalyse wurden die Proben bei der angegebenen Temperatur i. Hochvak. über P_2O_5 -Paraffin bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Dünnschichtchromatographie (DC)¹⁰ und Dünnschichtelektrophorese (DE)⁷ erfolgte an Kieselgel G (Merck); die DC-Platten (10 × 20 cm) wurden mit einem Streichgerät (VEB Labortechnik Ilmenau) beschichtet (0.5 mm). Der verwendete Petroläther siedete bei 60–70°. Der Essigester (= Essigsäureäthylester) war stets frisch destilliert.

Gibberellin- A_3 -tetraacetyl- β -D-glucopyranosylester (2 β ,4 α ,7 α -Trihydroxy-1 β -methyl-8-methylen-1-carboxy-4 β -gibb-3-en-10 β -carbonsäure-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosylester)-1 \rightarrow 4 α -lacton, II). 0.5 g I in 10 ml wasserfr. Dioxan wurden mit 0.75 g α -Acetobromoglucose in 20 ml wasserfr. Benzol und 0.25 g

Ag₂O versetzt. Nach Entfernung letzter H₂O-Spuren durch Abdestillieren von 10 ml Lösungsmittel wurde unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit 24 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt (nach 12 Stdn. erfolgte eine Zugabe von weiteren 0.25 g Ag₂O). Anschließend wurde zur Trockne eingengt und der Rückstand 3 mal mit je 50 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte wurden zur Abtrennung von nicht umgesetztem I 5 mal mit je 25 ml 2M KHCO₃-Lösung ausgeschüttelt und nach Trocknung über Na₂SO₄ i. Vak. eingengt. Aus Essigester-Petroläther kristallisierten 283 mg II (29% d. Th.), Kristalle vom Schmp. 216° (Lit.⁸: 212–214°) und $[\alpha]_D^{19} + 52.1^\circ$ (*c* = 0.48, Chlf.). Zur Analyse wurde bei 60° getrocknet. (C₃₃H₄₀O₁₅ (676.7): Ber: C, 58.57; H, 5.96; Gef: C, 58.41; H, 5.95%). Elektronenanlagerungs-Massenspektrum: 676 *m/e* (M⁺); IR (in Chlf.): 1262 (O-Acetyl), 1667 (=CH₂), 1765 (breit; Estercarbonyl, O-Acetyl und γ-Lactoncarbonyl), 3605 cm⁻¹ (—OH). DE: $\bar{U}_F = O$.

O(2)-β-D-Glucopyranosyl-gibberellin-A₃-methylester (4α,7α-Dihydroxy-2β-(β-D-glucopyranosyloxy)-1β-methyl-8-methylen-1-carboxy-4β-gibb-3-en-10β-carbonsäuremethylester-1→4α-lacton, V). 1.0 g III in 6 ml wasserfr. Dioxan wurden mit 1.5 g α-Acetobromglucose in 30 ml wasserfr. Benzol und 1.0 g Ag₂O versetzt. Nach Abdestillation von 15 ml Lösungsmittel wurde 72 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt (nach 48 Stdn. erneute Zugabe von 0.5 g Ag₂O), eingengt und der Rückstand mit Essigester (3 × 50 ml) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden an 100 g Kieselgel (Merck, 0.05–0.2 mm) chromatographiert (Trennsäule: 3.2 × 26 cm; Gradientenelution: Chlf → Essigester = 100:0, 95:5, 90:10 usw.; Fraktionsgrösse: 50 ml). Die Frakt. 12–16 (DC: R_F = 0.77, Laufmittel A) ergaben 864 mg rohes IV, das nach Trocknen über P₂O₅ i. Vak. in 10 ml absol. Methanol gelöst und nach kurzem Erwärmen mit 3 ml 0.2M NaOCH₃-Lösung verseift wurde. Der Rückstand (578 mg) wurde in 30 ml H₂O aufgenommen, zunächst mit Essigester (2 × 10 ml) und anschließend mit n-Butanol (5 × 10 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten n-Butanol-Extrakte lieferten nach mehrfachem Umfällen aus Essigester-Petroläther 264 mg amorphes V (18% d. Th.); $[\alpha]_D^{18} + 58.9^\circ$ (*c* = 0.64; Methanol). Zur Analyse wurde bei 60° getrocknet. (C₂₆H₃₄O₁₁ (522.6): Ber: C, 59.76; H, 6.56; Gef: C, 59.94; H, 6.50%). Elektronenanlagerungs-Massenspektrum: 522 *m/e* (M⁺); IR (in Acetonitril): 1668 (=CH₂), 1743 (Estercarbonyl), 1782 (γ-Lactoncarbonyl), 3482 cm⁻¹ (—OH).

Hydrolyse von V mit β-Glucosidase. 1.0 mg V in 0.5 ml 0.5M Acetatpuffer (pH 5.0) wurde mit 0.05 mg β-Glucosidase (E.L. 33–63; Röhm & Haas GmbH, Darmstadt) inkubiert. Nach 24 Stdn. (30°) war V quantitativ in III und D-Glucose gespalten, wie die dünnschichtchromatographische Untersuchung des Hydrolysats zeigte (III: Laufmittel A bzw. D, vgl. Tabelle 1; D-Glucose: n-Propanol-Essigester-H₂O = 7:2:1, R_F = 0.45). Quantitative Glucosebestimmung:¹¹ (Ber: 34.4; Gef: 33.0%).

Pentaacetat von V (4α-Hydroxy-7α-acetoxy-2β-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)-1β-methyl-8-methylen-1-carboxy-4β-gibb-3-en-10β-carbonsäuremethylester-1→4α-lacton, VI). 50 mg V wurden mit 5 ml Acetanhydrid/Pyridin (2:3) acetyliert (6 d, Raumtemp). Verdünnen des Reaktionsgemisches mit 7 ml H₂O, Ansäuern (pH 2.8) und Extraktion mit Essigester lieferte ein Rohprodukt (67 mg), das nach dünnschichtchromatographischer Reinigung an Kieselgel G (Laufmittel B, R = 0.70, Elution mit Essigester) 53 mg VI (76% d. Th.) ergab; $[\alpha]_D^{19} + 107.3^\circ$ (*c* = 0.41; Chlf.). Zur Analyse wurde bei 80° getrocknet. (C₃₆H₄₄O₁₆ (732.8): Ber: C, 59.00; H, 6.05; Gef: 59.30; H, 6.01%). Elektronenalagerungs-Massenspektrum: 732 *m/e* (M⁺); Elektronenstoss-Massenspektrum: 732 *m/e* (M⁺); IR (in Chlf.): 1258 (O-Acetyl), 1669 (=CH₂), 1759 (O-Acetyl, Estercarbonyl), 1783 cm⁻¹ (Schulter, γ-Lactoncarbonyl).

In analoger Weise entstand aus IV eine Verbindung, die in allen Eigenschaften mit obigem VI übereinstimmte.

4α,7α-Dihydroxy-2-oxo-1β-methyl-8-methylen-1-carboxy-gibb-3-en-10β-carbonsäuremethylester-1→4α-lacton (VII). 200 mg III in 16 ml Chlf. wurden nach Cross¹² mit 2 g aktivem MnO₂¹³ 72 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt. Aus Essigester-Petroläther kristallisierten 34 mg VII, Blättchen vom Schmp. 185–187° (Lit.:¹² 186–187°). UV: λ_{max} (log ε) = 228 (3.84), 344 nm (1.78).

Umsetzung von IV mit MnO₂. 10 mg IV in 0.8 ml Chlf. wurden nach dem für VII angegebenen Verfahren mit 100 mg MnO₂ geschüttelt. Im UV-Spektrum des Reaktionsprodukts fehlen die für VII ermittelten C=O-Banden.

Bestimmung der biologischen Aktivität. Sie erfolgte mit den Zwergmutanten d₁ und d₃ von *Zea mays* L. unter kontrollierten Licht- (täglich 16 Stdn. 10,000 Lux bzw. Dunkelheit) und Temperaturbedingungen (25°).¹⁴ Den in Tabelle 2 wiedergegebenen Mittelwerten liegen wiederholte Versuche mit jeweils 5 bzw. 10 Einzelpflanzen (bei GA₃) zugrunde.

Danksagung—Herrn Dr. R. Tümmeler, Dresden, danken wir für die Aufnahme der Elektronenanlagerungs-Massenspektren, Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Budzikiewicz, Braunschweig, für das Elektronenstoss-Massen-

spektrum sowie Herrn Prof. Dr. K. Meyer, Basel, für die Überlassung des β -Glucosidase-Präparates. Die Mikroelementaranalysen wurden von Herrn R. Martin, Leipzig, angefertigt.

LITERATUR

- ¹ XIV. Mitteilung: K. Schreiber, J. Weiland und G. Sembdner, *Phytochem.* 8, im Druck (1969).
- ² Teil der Dissertation, Univ. Halle-Wittenberg (1968).
- ³ G. Sembdner, J. Weiland, O. Aurich und K. Schreiber, *Plant Growth Regulators* p. 70. S.C.I. Monograph 31, London (1968); III. *Symp. Plant Growth Regulators* Torún (1968).
- ⁴ K. Schreiber, J. Weiland und G. Sembdner, *Tetrahedron Letters* 4285 (1967).
- ⁵ S. Tamura, N. Takahashi, T. Yokota und N. Murofushi, *Planta* 78, 208 (1968); kürzlich wurden vom gleichen Arbeitskreis, T. Yokota, N. Takahashi, N. Murofushi und S. Tamura, *Tetrahedron Letters* 2081 (1969), aus *Pharbitis*-Samen ebenfalls O(3)- β -Glucosyl-GA₈ sowie 4 neue Gibberellinglucoside isoliert.
- ⁶ W. Koenigs und E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 34, 957 (1901).
- ⁷ Zur Methodik vgl. G. Schneider, G. Sembdner und K. Schreiber, *J. Chromatog.* 19, 358 (1965).
- ⁸ P. J. Keay, J. S. Moffatt und T. P. C. Mulholland, *J. Chem. Soc.* 1605 (1965).
- ⁹ G. Zemplén, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 59, 1258 (1926); G. Zemplén und E. Pacsu, *Ibid.* 62, 1613 (1929).
- ¹⁰ Zur Methodik vgl. G. Sembdner, R. Gross und K. Schreiber, *Experientia* 18, 584 (1962); G. Sembdner und K. Schreiber, *Phytochem.* 4, 49 (1965).
- ¹¹ E. Bancher, H. Scherz und K. Kaindl, *Mikrochim. Acta* Wien 652 (1964).
- ¹² B. E. Cross, *J. Chem. Soc.* 3022 (1960).
- ¹³ O. Mancera, G. Rosenkranz und F. Sondheimer, *Ibid.* 2189 (1953).
- ¹⁴ G. Sembdner und K. Schreiber, *Flora*, Abt. A, 156, 359 (1965).