

GIBBERELLINE—XV¹

SYNTHESE VON O(2)- β -D-GLUCOPYRANOSYL-GIBBERELLIN-A₃-METHYLESTER

K. SCHREIBER, J. WEILAND² und G. SEMBDNER

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

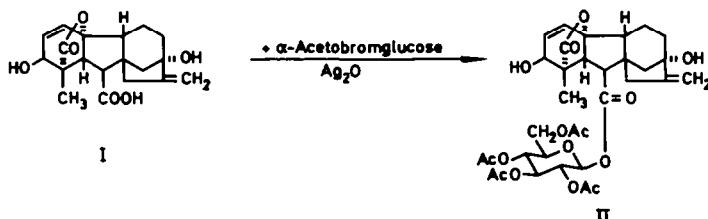
(Received in Germany 7 July 1969; Received in UK for publication 22 July 1969)

Zusammenfassung—Umsetzung von Gibberellin-A₃-methylester (III) mit α -Acetobromoglucose nach Koenigs und Knorr mit nachfolgender Entacetylierung ergibt in 18-proz. Ausbeute O(2)- β -D-Glucopyranosyl-GA₃-methylester (V). Aus GA₃ (I) entsteht unter den Bedingungen der Koenigs-Knorr-Synthese der Tetraacetyl- β -D-glucopyranosylester II.

Abstract—O(2)- β -D-Glucopyranosyl-gibberellin A₃ methylester (V) has been prepared in 18% yield by Koenigs-Knorr-synthesis from gibberellin A₃ methyl ester (III) and α -acetobromoglucose as well as subsequent deacetylation. Reaction of GA₃ (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-A₉-O(3)- β -D-glucopyranosid aus Früchten von *Phaseolus coccineus* L.^{1,4} sowie Gibberellin-A₃-O(2)- β -D-glucopyranosid aus *Pharbitis*-Samen.⁵ Die präparative Gewinnung von Gibberellinglykosiden aus Pflanzenmaterial ist sehr aufwendig (z.B. 4·10⁻⁵ % Ausbeute bei frischen Bohnenfrüchten); daher erschien eine Synthese dieser konjuguierten Gibberelline von besonderem Interesse.

Umsetzung von Gibberellin A₃ (GA₃, I) unter den Bedingungen der Koenigs-Knorr-Synthese⁶ mit α -Acetobromoglucose und überschüssigem Ag₂O in Dioxan/Benzol ergab in 29-proz. Ausbeute eine Verbindung vom Schmp. 216° und $[\alpha]_D^{25} = 52.1^\circ$, die durch Elementaranalyse, Dünnschichtelektrophorese (DE)⁷ ($U_F = O$), Elektronenlagerungs-Massenpektrum (M⁺ bei *m/e* = 676) und IR-Spektrum [ν_{max} = 1262 (Acetyl), 1667 (=CH₂), 1765 (Esterkarbonyl, γ -Lactonkarbonyl) 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 -Acetobromoglucose 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 NaOCH₃ 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 fordernnde Summenformel C₂₆H₃₄O₁₁ stimmt mit dem Elektronenanalagerungs-Massenspektrum überein (M⁺ bei m/e = 522). Acetylierung von IV bzw. V mit Acetanhydrid/Pyridin lieferte das Pentaacetat VI, das sowohl im Elektronenanalagerungs- 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 MnO₂. 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 → π*-Bande bei $\lambda_{max} = 344$ nm die für α,β-ungesättigte Ketone charakteristische π → π*-Bande bei $\lambda_{max} = 228$ nm aufweist. Eine entsprechende UV-Absorption tritt nach Umsetzung von IV mit MnO₂ nicht auf, was als Beweis für die O(2)-Stellung des Glucosylrestes zu werten ist. Das dünnenschichtchromatographische Verhalten von V in vier Entwicklungsgemischen ist in Tabelle 1 dargestellt.

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

Verbindung	Mittlere R _{Standard} -Werte			(R _F 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 A₃ = 0.45);
- B: Chlf.-Essigester-Essigsäure, 70:30:5 (R_F A₃ = 0.17);
- C: Benzol-Essigsäure, 10:3 (R_F A₃ = 0.11);
- D: Isopropanol-5N Ammoniak, 5:1 (R_F A₃ = 0.58);
- O: Substanz am Startpunkt.

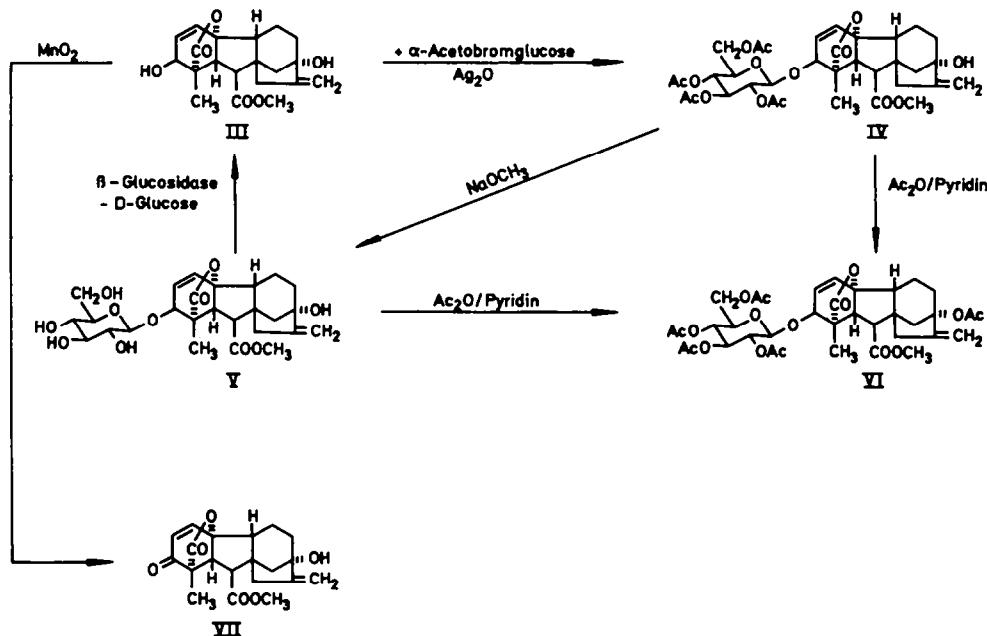
Die biologische Aktivität von V ist ebenso wie jene von GA₃-methylester (III) sehr gering und erreicht im Biotest mit Mais-Zwergmutanten in Dunkelheit einen Wert von 10⁻³ bezogen auf GA₃ = 1; bei im Licht kultivierten Testpflanzen ist die Verbindung praktisch wirkungslos (vgl. Tabelle 2).

EXPERIMENTELLER TEIL

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

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

Gibberellin	μg/Pfl.	Reaktion der Mais-Zwergmutanten d ₁ und d ₅ , (Länge der 1. + 2. Blattscheide, mm)			
		Licht		Dunkelheit	
		d ₁	d ₅	d ₁	d ₅
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 P₂O₅-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-A₃-tetraacetyl-β-D-glucopyranosylester ($2\beta,4\alpha,7\alpha$ -Trihydroxy-1 β -methyl-8-methylen-1-carboxy-4 b - β -gibb-3-en-10 β -carbonsäure-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylester)-1→4a-lacton, II). 0.5 g I in 10 ml wasserfr. Dioxan wurden mit 0.75 g α -Acetobromglucose in 20 ml wasserfr. Benzol und 0.25 g

Ag_2O versetzt. Nach Entfernung letzter H_2O -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 Ag_2O). Anschliessend wurde zur Trockne eingeengt 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 KHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt und nach Trocknung über Na_2SO_4 i. Vak. eingeengt. Aus Essigester-Petroläther kristallisierten 283 mg II (29% d. Th.), Kristalle vom Schmp. 216° (Lit.⁸: 212–214°) und $[\alpha]_D^{19} + 52\cdot1^\circ$ ($c = 0\cdot48$, Chlf.). Zur Analyse wurde bei 60° getrocknet. ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$ (676·7): Ber: C, 58·57; H, 5·96; Gef: C, 58·41; H, 5·95%). Elektronenanalagerungs-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: $R_F = 0$.

(2)- β -D-Glucopyranosyl-gibberellin-A₄-methylester (4ac,7 α -Dihydroxy-2 β -(β -D-glucopyranosyloxy)-1 β -methyl-8-methylen-1-carboxy-4b β -gibb-3-en-10 β -carbonsäuremethylester-1→4a-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 Ag_2O versetzt. Nach Abdestillation von 15 ml Lösungsmittel wurde 72 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt (nach 48 Stdn. erneute Zugabe von 0·5 g Ag_2O), eingeengt 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 Fraktt. 12–16 (DC: $R_F = 0\cdot77$, Laufmittel A) ergaben 864 mg rohes IV, das nach Trocknen über P_2O_5 i. Vak. in 10 ml absol. Methanol gelöst und nach kurzem Erwärmen mit 3 ml 0·2M NaOCH_3 -Lösung verseift wurde. Der Rückstand (578 mg) wurde in 30 ml H_2O aufgenommen, zunächst mit Essigester (2 × 10 ml) und anschliessend mit n-Butanol (5 × 10 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten n-Butanol-Extrakte lieferten nach mehrfachem Umsäubern aus Essigester-Petroläther 264 mg amorphes V (18% d. Th.); $[\alpha]_D^{18} + 58\cdot9^\circ$ ($c = 0\cdot64$; Methanol). Zur Analyse wurde bei 60° getrocknet. ($\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$ (522·6): Ber: C, 59·76; H, 6·56; Gef: C, 59·94; H, 6·50%). Elektronenanalagerungs-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 dünnenschichtchromatographische Untersuchung des Hydrolysats zeigte (III: Laufmittel A bzw. D, vgl. Tabelle 1; D-Glucose: n-Propanol-Essigester– $\text{H}_2\text{O} = 7\cdot2:1$, $R_F = 0\cdot45$). Quantitative Glucosebestimmung:¹¹ (Ber: 34·4%; Gef: 33·0%).

Pentaacetat von V (4ac α -Hydroxy-7 α -acetoxy-2 β -(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1 β -methyl-8-methylen-1-carboxy-4b β -gibb-3-en-10 β -carbonsäuremethylester-1→4a-lacton, VI). 50 mg V wurden mit 5 ml Acetanhydrid/Pyridin (2:3) acetyliert (6 d, Raumtemp.). Verdünnen des Reaktionsgemisches mit 7 ml H_2O , Ansäuern (pH 2·8) und Extraktion mit Essigester lieferte ein Rohprodukt (67 mg), das nach dünnenschichtchromatographischer Reinigung an Kieselgel G (Laufmittel B, $R = 0\cdot70$, Elution mit Essigester) 53 mg VI (76% d. Th.) ergab; $[\alpha]_D^{19} + 107\cdot3^\circ$ ($c = 0\cdot41$; Chlf.). Zur Analyse wurde bei 80° getrocknet. ($\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_{16}$ (732·8): Ber: C, 59·00; H, 6·05; Gef: 59·30; H, 6·01%). Elektronenanalagerungs-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.

4ac,7 α -Dihydroxy-2-oxo-1 β -methyl-8-methylen-1-carboxy-gibb-3-en-10 β -carbonsäuremethylester-1→4a-lacton (VII). 200 mg III in 16 ml Chlf. wurden nach Cross¹² mit 2 g aktivem MnO_2 ¹³ 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 MnO_2 . 10 mg IV in 0·8 ml Chlf. wurden nach dem für VII angegebenen Verfahren mit 100 mg MnO_2 geschüttelt. Im UV-Spektrum des Reaktionsprodukts fehlen die für VII ermittelten C=O-Banden.

Bestimmung der biologischen Aktivität. Sie erfolgte mit den Zergmutanten d₁ und d₅ 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. Tümler, Dresden, danken wir für die Aufnahme der Elektronenanalagerungs-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. Sondeheimer, *Ibid.* 2189 (1953).
- ¹⁴ G. Sembdner und K. Schreiber, *Flora, Abt. A*, **156**, 359 (1965).