

## VOM RADIOAKTIVEN CONIFERIN ZUM MARKIERTEN TURGORIN\*

HERMANN SCHILDKNECHT UND REINER MILDE

Organisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg (Bundesrepublik Deutschland)

(Eingegangen am 11. September 1986; angenommen in revidierter Form am 5. März 1987)

### ABSTRACT

The first Periodic Leaf Movement Factor ("PLMF 1"), 4-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl 6-sulfate)gallic acid (**1**), which is chemonastically active on *Mimosa pudica* L., and its  $^{14}\text{C}$ -carboxyl-labelled analog were synthesized by Koenigs-Knorr reaction of a D-glucose derivative with a suitably blocked gallic acid to give 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylgallic acid after deblocking. Regioselective sulfatation with sulfur trioxide-pyridine afforded **1**. The  $^{14}\text{C}$ -labelled analog was prepared *via* regioselective glucosylation of methyl [*carboxyl*- $^{14}\text{C}$ ]galloate with 2,3,4,6-tetra-D-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromide and subsequent sulfatation of the deblocked glucoside.

### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Synthese des ersten, an *Mimosa pudica* L. chemonastisch wirksamen "Periodic Leaf Movement Factors", der 4-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl-6-sulfat) gallussäure (PLMF 1, **1**) und seines  $^{14}\text{C}$ -Carboxyl markierten Analogons beschrieben: Koenigs-Knorr-Reaktion eines Glucosederivats mit einer spezifisch geschützten Gallussäure führt nach Schutzgruppenabspaltung zur 4-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranosylgallussäure, deren regioselektive Sulfatierung mit dem  $\text{SO}_3$ -Pyridin-Komplex **1** liefert. Zum analogen  $^{14}\text{C}$ -markierten PLMF 1 gelangt man durch regioselektive Glucosylierung von [*carboxyl*- $^{14}\text{C}$ ]Gallussäuremethylester mit 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid und nachfolgende Sulfatierung des entschützten Glucosids.

### EINLEITUNG

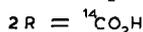
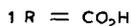
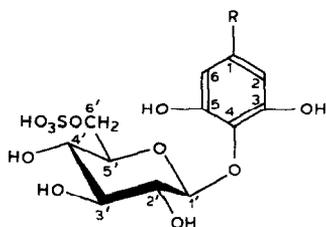
Die intensiven Forschungen von Karl Freudenberg — dem einstigen Vorstand der Chemie der Universität Heidelberg — führten neben vielen Arbeiten zur Chemie der Gerbstoffe, der Kohlenhydrate und der Konfigurationslehre zu einem umfassenden Verständnis der Struktur des Lignins. Dieser bedeutende Teil des Freudenberg'schen Werkes, in dem neben der Analyse der Ligninabbauprodukte die Aufklärung

\* Karl Freudenberg zum 100. Geburtstag.

und Synthese der dabei beteiligten Oligomere den Schlüssel zum Verständnis der Ligninkonstitution lieferten, wäre ohne die Verwendung radioaktiv markierter Aromatenbausteine nicht möglich gewesen<sup>1,2</sup>.

33 Jahre nach diesen Versuchen, bei denen radioaktive Coniferylalkoholderivate *in vivo* und *in vitro* verwendet wurden, die Genese des Lignins zu verstehen, werden nun im gleichen Institut erste Schritte zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Turgorine aus *Mimosa pudica* L. unternommen<sup>3</sup>. Auch hier spielen <sup>14</sup>C-markierte Verbindungen eine wesentliche Rolle.

Daß gewisse Pflanzen auf äußere Reize hin teilweise sehr schnelle Bewegungen durchführen können — wie man stark ausgeprägt bei der Sinnpflanze *Mimosa pudica* L. beobachten kann — stimulierte viele Forscher bei der Suche nach der stofflichen Grundlage dieses Phänomens<sup>4-6</sup>. Die von Schildknecht und Schumacher<sup>7</sup> aus *Acacia karroo* isolierten und strukturell aufgeklärten Wirkstoffe der Turgorine, die durch eine Steuerung des hydrostatischen Druckes in den motorischen Pflanzenorganen die Bewegung verursachen, bestehen bei circadian reagierenden Gewächsen aus Schwefelsäureestern von  $\beta$ -D-konfigurierten Phenolcarbonsäureglykosiden. Charakteristisch für diese Verbindungen, die man in Form des "Periodic Leaf Movement Factor 1" (PLMF 1) (1) in mehreren Familien des Pflanzenreichs findet<sup>8</sup>, ist die Stellung des Sulfatrestes in C-6 des Zuckerteils und eine zur glykosidischen Verknüpfungsstelle *para*-ständige Carboxylgruppe.



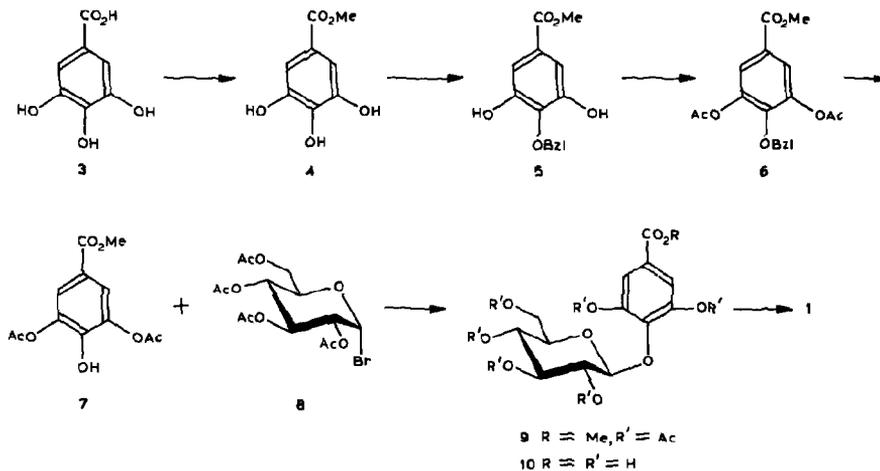
Da das Naturprodukt nur in geringsten Mengen zur Verfügung stand, mußte zur Absicherung der postulierten Struktur und der biologischen Wirksamkeit 1 synthetisiert werden.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

*Synthese von PLMF 1 (1).* — Die klare Struktur von 1 bestimmte den linearen Aufbau des Moleküls. Zur regiospezifischen Verknüpfung des Aromatenteils mit D-Glucose verwendeten wir das mit Schutzgruppen versehene Gallussäurederivat 7, welches mit dem Glycosylhalogenid 8 zum geschützten Glykosid 9 und von da durch Schutzgruppenabspaltung in die 4-O- $\beta$ -D-Glucopyranosylgallussäure (10) über-

führt wurde. Durch selektive Sulfatierung des primären Zuckerhydroxyls erhielten wir den PLMF 1 (1).

Das geschützte Aglykon 7 stellten wir in einer vierstufigen Reaktion, ausgehend von Gallussäure (3) her. Der nach üblicher Vorschrift hergestellte Methyl-ester<sup>9</sup> 4 wurde nach einer von uns überarbeiteten Methode von Jurd<sup>10</sup> mit Benzylbromid-Natriumhydroxyd zum 4-substituierten Benzylether 5 umgesetzt. Acetylierung nach Freudenberg und Plankenhorn<sup>11</sup> und Hydrogenolyse des Benzylethers führte zum kupplungsfähigen Aglykon 7. Das Vorliegen der freien OH-4-Gruppe konnte durch die magnetische Äquivalenz der Arylprotonen H-2,6 <sup>1</sup>H-n.m.r.-Spektrum bewiesen werden.



Die Umsetzung von 7 mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid (8) in einer Koenigs-Knorr-Reaktion mit Silberoxid und Chinolin führte zum peracetylierten Glucosylgallussäuremethylester 9, dessen  $\beta$ -D-Konfiguration durch die große geminale Kopplung des anomeren Protons mit H-2' von 7,5 Hz gezeigt werden konnte. Die Abspaltung aller Schutzgruppen mit Bariumhydroxid ergab das freie Glucosid 10, dessen Struktur durch u.v.-, i.r.-, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-n.m.r.-Spektroskopie bestätigt wurde.

Zur regioselektiven Einführung der Sulfatgruppe diente uns der Schwefeltrioxyd-Pyridin-Komplex nach Guiseley und Ruoff<sup>12</sup>, dessen Kinetik wir durch l.c.-Untersuchungen optimiert hatten. Die l.c.-Reinigung an der Umkehrphase lieferte einen amorphen, weißen Festkörper, der nach Überführung ins Kaliumsalz analysenrein vorlag.

Die u.v.-, i.r.-, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-n.m.r.-Daten sowie ein hochaufgelöstes Massenspektrum zeigten völlige Übereinstimmung mit den Daten des Naturstoffes, der an anderer Stelle ausführlich diskutiert ist<sup>7</sup>. Das Syntheseprodukt wies die gleichen biologischen Eigenschaften wie der Naturstoff auf.



Schritt in Richtung auf den vermeintlichen Turgorinrezeptor getan worden.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

*Allgemeine Methoden.* — I.r.-Spektren werden von KBr-Presslingen aufgenommen. Die Dünnschichtchromatographie erfolgt auf Kieselgelplatten G25 mit Fluoreszenzindikator UV 254. Eindampfoperationen werden am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlvak. bei max. 40° Badtemperatur vorgenommen.

*Gallussäuremethylester (4).* — Gallussäure-Monohydrat (188 g, 1 mol) wird in Methanol (500 mL) gelöst und unter Rühren ein Strom trockenes HCl-Gas eingeleitet. Der Umsatz zum Methylester wird mittels d.c. verfolgt. Nach vollständiger Reaktion (~1–2 h) wird auf 400 mL Volumen eingengt, der nach Abkühlung in Eiswasser ausgefallene Ester abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert; Ausb. 173 g (94%), Schmp. 198–201°; Lit.<sup>9</sup> 201–202°.

*4-O-Benzylgallussäuremethylester (5).* — Verbindung 4 (92 mg, 0.5 mol) wird in Ethanol (375 mL) unter Erwärmen gelöst und Benzylchlorid (120 mL, 1 mol) zugegeben. Unter N<sub>2</sub> wird zu der am Rückfluß erhitzten Lösung während 1–2 h M NaOH (750 mL) zugetropft. Nach einer weiteren Stunde Erhitzen zum Rückfluß wird nach dem Abkühlen auf Eis gegossen, dreimal mit Ether (250 mL) extrahiert und nach Entsäuerung der organischen Phase mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Den öligen Rückstand versetzt man mit heißem Toluol (400 mL), filtriert in der Hitze evtl. ausgefallenes Edukt ab und läßt über Nacht im Kühlschrank auskristallisieren. Das Produkt wird zweimal aus Chloroform umkristallisiert (91 g, 67%), Schmp. 130°; Lit.<sup>10</sup> 133°.

*Anal.* Ber. für C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> (274.3): C, 65.69; H, 5.15; O, 29.17. Gef.: C, 65.61; H, 5.30; O, 29.09.

*3,5-Di-O-acetyl-4-O-benzylgallussäuremethylester (6).* — Man löst 5 (27,4 g, 0,1 mol) in Pyridin (100 mL), gibt 4-Dimethylaminopyridin (0.9 g) und Acetanhydrid (48 mL, 0.5 mol) zu und rührt 1 h bei 50–60° Badtemperatur. Die Mischung wird auf Eis gegossen, das Rohprodukt im Mörser mit wenig Wasser fein zerrieben, abgesaugt und mit wenig Eiswasser gewaschen. Das getrocknete Produkt wird zweimal ausdest. Ethanol umkristallisiert; Ausb. 26,8 g (75%), Schmp. 107–108°.

*Anal.* Ber. für C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub> (358.4): C, 63.68; H, 5.06; O, 31.25. Gef.: C, 63.45; H, 5.18; O, 31.37.

*3,5-Di-O-acetyl-gallussäuremethylester (8).* — Verbindung 6 (35,8 g, 0,1 mol) wird in dest. Ethanol (400 mL) suspendiert und nach Zugabe von Pd-C (10% Pd; 500 mg) mittels einer Gatterman-Apparatur bei Raumtemp. hydriert, wobei der theoretische H<sub>2</sub>-Verbrauch um ~15% überschritten wird. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wird eingedampft; Ausb. 26 g (97%), Schmp. 141°; <sup>1</sup>H-n.m.r. (CDCl<sub>3</sub>, Me<sub>4</sub>Si): δ 7,7 (s, 2 H, Arom.), 3,86 (s, 3 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,31 (s, 6 H, CH<sub>3</sub>CO).

*Anal.* Ber. für C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> (268.2): C, 53.74; H, 4.51; O, 41.75. Gef.: C, 54.01; H, 4.68; O, 41.31.

**3,5-Di-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)gallussäuremethylester (9).** — Verbindung **7** (4,02 g, 15 mmol), 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid (**8**; 6,17 g, 15 mmol) frisch gefälltes trockenes  $\text{Ag}_2\text{O}$  (1,9 g) und Drierite (3 g) werden schnell fein pulverisiert, mit trockenem dest. Chinolin (10 mL) im Mörser homogen vermischt und im Dunkeln über  $\text{P}_2\text{O}_5$  im teilevak. Exsikkator über Nacht stehengelassen. Der dunkle Festkörper wird dreimal mit Chloroform (je 100 mL) ausgezogen und das Lösungsmittel nach Filtration dreimal mit eiskalter 10% HCl, einmal mit Wasser und dreimal mit eiskalter 10% NaOH gewaschen. Die organische Phase dampft man nach Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ein. Nach Zugabe von dest. Methanol (50 mL) und nochmaligem Eindampfen i. Vak. verbleibt ein schaumigsprödes, rötliches Produkt, das aus Methanol umkristallisiert wird; Ausb. 4,65 g (52%), Schmp.  $164^\circ$ ,  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1770, 1745 (C=O, aliph. u. arom. Acetyl),  $1720\text{ cm}^{-1}$  (C=O,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ );  $^1\text{H-n.m.r.}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{Me}_4\text{Si}$ ):  $\delta$  7,7 (s, 2 H, Arom.), 3,89 (s, 3 H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 5,3–5,1 (m, 3 H, H-2',3',4'), 5,04 (d, H-1'), 4,37 (dd, H-6'a), 3,93 (dd, H-6'b), 3,66 (m, H-5'), 2,34 (s, 6 H, arom. Ac), 2,1–2,0 (4s, 12 H, aliph. Acetyl);  $J_{1',2'} 7,5$ ,  $J_{5',6'a} 4,0$ ,  $J_{5',6'b} 2,2$ ,  $J_{6'a,6'b} 12,4\text{ Hz}$ .

*Anal.* Ber. für  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$  (598.5): C, 52.18; H, 5.05; O, 42.77. Gef.: C, 52.19; H, 5.14; O, 42.67.

**4-O- $\beta$ -D-Glucopyranosylgallussäure (10).** — Verbindung **9** (6 g, 10 mol) wird unter  $\text{N}_2$  mit ges.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung (400 mL) 24 h bei Raumtemp. gerührt. Mit ges. Oxalsäurelösung wird auf ein pH von 9 eingestellt, von den ausgefallenen Salzen abfiltriert und die klare Lösung über eine Säule mit Amberlite IR 120 ( $\text{H}^+$ ) Ionenaustauscher (100 mL) filtriert. Die nun schwach saure Lösung wird eingedampft und das helle, feinkristalline Produkt über  $\text{P}_2\text{O}_5$  i. Vak. getrocknet. Das d.c.-einheitliche Produkt (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1,  $R_f$  0,64; u.v. 254 u. Thymol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  pos.) enthält ein festgebundenes Kristallwasser, das sich auch bei längerem Trocknen bei Raumtemperatur i. Vak. nicht entfernen läßt; Ausb. 2,8 g (80%), Schmp.  $125$ – $126^\circ$ ,  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  3380 (breit, OH), 1680 (C=O),  $1060\text{ cm}^{-1}$  (C-O);  $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$  (lg $\epsilon$ ) 207 (4,54), 247 (3,9), 289 nm (3,28);  $^1\text{H-n.m.r.}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , Sodium-4,4-dimethyl-4-sila-(2,3- $^2\text{H}_4$ )pentanoat):  $\delta$  7,05 (s, 2 H, Arom.), 4,98 (d, H-1'), 3,89 (1.Ordng., dd, H-6'a), 3,8 (1.Ordng., dd, H-6'b), 3,61 (m, 3 H, H-2',3',4'), 3,47 (m, H-5');  $J_{1',2'} 7,1$ ,  $J_{5',6'a} 2,3$ ,  $J_{5',6'b} 4,5$ ,  $J_{6'a,6'b} 12,6\text{ Hz}$ ;  $^{13}\text{C-n.m.r.}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , MeOH):  $\delta$  172 (C-7), 151,9 (C-3,5), 139,2 (C-4), 129,5 (C-1), 112,7 (C-2,6), 106,8 (C-1'), 76,2 (C-2'), 78,4 (c-3'), 71,8 (C-4'), 79,1 (C-5'), 63,1 (C-6').

*Anal.* Ber. für  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$  (350.3): C, 44.58; H, 5.18; O, 50.24. Gef.: C, 44.52; H, 5.25; O, 50.23.

**4-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl-6-sulfat)gallussäure (1).** — Verbindung **10** (830 mg, 2,5 mmol) wird in dest. abs. *N,N*-Dimethylformamid (10 mL) im Kölbchen vorgelegt und unter Rühren auf  $40^\circ$  erwärmt. Eine Lösung von  $\text{SO}_3$ -Pyridin-Komplex (800 mg, 5 mmol) in trockenem dest. *N,N*-Dimethylformamid (10 mL) wird in einer Portion zugegeben und 5 min nachgerührt. Das Lösungsmittel wird bei max.  $40^\circ$  Badtemp. im Ölpumpvak. am Rotationsverdampfer abgezogen und der verbleibende Sirup mit Wasser (50 mL) 10 min bei Raumtemperatur hydrolysiert. Zur sauren

Lösung tropft man unter  $N_2$  ges.  $Ba(OH)_2$ -Lösung zu, bis ein pH von 8–9 erreicht ist und dampft bis kurz vor die Trockne ein. Nach Aufnehmen mit Wasser (20 mL) sollte der pH-Wert schwach alkalisch sein. Bei saurer Reaktion ist die Behandlung mit  $Ba(OH)_2$  zu wiederholen, bis die alkalische Reaktion erreicht ist. Überschüssiges Alkali wird mit wenig Trockeneis ausgefällt, die Salze abzentrifugiert und die helle, schwach grünliche Lösung eingedampft. Das glasartige Rohprodukt wird mittels l.c. gereinigt [Kieselgel C18, 35–70  $\mu m$ , 60A; Säule 370 mm  $\times$  43 mm; Stufengradient: (A) 10% Methanol–0,1% Eisessig; (B) 20% Methanol–0,1% Eisessig; Fluß: 25 mL/min, 0.8 MPa]. Das grob getrennte Produkt wird auf demselben Trennsystem rechromatographiert und ergibt eine d.c.-einheitliche Substanz (Butanol–Eisessig–Wasser 4:1:1,  $R_F$  0,39; u.v. Det. und Thymol– $H_2SO_4$  pos.), die l.c. analytisch einen Gehalt an 6'-Monosulfat von 98% zeigt (Nucleosil C18, 5  $\mu m$ , 250 mm  $\times$  8 mm; 25 % Methanol–0,1% Eisessig; 3 mL/min; 17.5 MPa; u.v. 254 nm); Ausb. 405 mg (39%);  $\lambda_{max}^{H_2O}$  (lg $\epsilon$ ) 206 (4,43), 245 (3,77), 290 nm (3,18);  $\nu_{max}^{KBr}$ ,  $^1H$ - und  $^{13}C$ -n.m.r. sowie high-resol. Mass Spekt. sind identisch mit den Literaturdaten<sup>7</sup>.

Die Überführung ins Kaliumsalz mittels Amberlite CG 50-X1 ( $K^+$ ) Ionenaustauscher ergibt nach Gefriertrocknung ein voluminöses, weißes Produkt, das ein festgebundenes Kristallwasser enthält.

*Anal.* Ber. für  $C_{13}H_{16}K_2O_{14}S$  (506.5): C, 30.83; H, 3.18; S, 6.33. Gef.: C, 31.08; H, 3.34; S, 6.22.

*Gallus*[ $^{14}C$ ]säuretrimethylether (12). — Eine im Ölpumpenvak. ausgeflamte Carboxylierungsapparatur<sup>16</sup> mit einem  $CO_2$ -Generator, der Barium[ $^{14}C$ ]carbonat (197 mg; Spez. Akt. 925 MBq/mmol) und im darüberliegenden Tropftrichter mit Druckausgleich konz.  $H_2SO_4$  (2 mL) enthält, wird mit dem Reaktionskolben versehen. Dieser enthält eine Mischung von 3,4,5-Trimethoxybrombenzol (11) (247 mg, 1 mmol) in abs. Ether (10 mL), die unter trockenem  $N_2$  bei  $-60^\circ$  unter Rühren mit Butyllithium–Hexan (1,54 mol/L; 0,8 mL, 1,24 mmol) versetzt und anschließend 5 min bei Umgebungstemperatur gerührt worden waren. Der Reaktionskolben wird mit flüssigem  $N_2$  eingefroren und danach an der Carboxylierungsapparatur evakuiert. Nach Erreichen des Endvakuums wird die Apparatur von der Ölpumpe abgekoppelt und das  $^{14}CO_2$  generiert und dabei in den weiterhin gekühlten Reaktionskolben einkondensiert. Nach schwachem Erwärmen des  $CO_2$ -Generatorkölbchens wird das  $N_2$ -Dewargefäß vom Reaktionskolben zum Generatorkolben gewechselt. Man läßt den Reaktionskolben unter magnetischen Rühren 10 min bei Umgebungstemperatur aufwärmen, wobei sich die Mischung verflüssigt und reagiert. Überschüssiges  $^{14}CO_2$  wird dabei im Generatorkolben ausgefroren und nach Wechseln des Dewargefäßes wieder zur Reaktionsmischung zurückkondensiert. Dieser Einkondensations–Reaktionszyklus wird insgesamt viermal durchgeführt. Der Druck in der Apparatur sollte während dieser Zeit nicht mehr als 0.3–0.4 kPa absinken. Das dann noch nicht reagierte  $CO_2$  wird nach Belüften der Apparatur mit einem schwachen  $N_2$ -Strom in gesättigter  $Ba(OH)_2$ -Lösung abgefangen. Die Reaktionsmischung wird mit Ether (10 mL) und 10% NaOH (20 mL) versetzt. Nach dem Abtrennen der wässrigen Phase wird diese mit 10%  $H_2SO_4$  auf pH  $\sim$  3 eingestellt

und viermal mit Ether (je 25 mL) ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit wenig  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird filtriert, das Trockenmittel gut mit Ether ausgewaschen und bei Normaldruck eingedampft. Man erhält ein kristallines, leicht rötlich-braun gefärbtes Produkt, das d.c.-einheitlich ist und identisches Laufverhalten wie nichtmarkierter Gallussäuretrimethylether aufweist (Toluol–Aceton–Eisessig 500:200:7,  $R_F$  0,43, Det. u.v. 254 nm,  $\text{FeCl}_3$  neg.); Massenausbeute: 154 mg (73% bezogen auf  $^{14}\text{CO}_2$ ); Aktivitätsausbeute: 423 MBq (46%, Spez. Akt. 583 MBq/mmol).

*Gallus*[ $^{14}\text{C}$ ]säure (13). — Verbindung 12 (154 mg, 0,73 mmol) wird mit Eisessig (2,64 mL) und HI (57%; 264 mL) bei 120° Badtemperatur unter Rühren für 4 h zum Rückfluß erhitzt und anschließend i. Vak. zur Trockne eingedampft. Den dunklen kristallinen Rückstand versetzt man viermal mit Wasser (20 mL) und dampft jeweils zur Trockene ein. In der Welle des Rotationsverdampfers kondensierte Flüssigkeit wird mit dem Föhn übergetrieben. Das verbleibende bräunliche Produkt zeigt in 2 d.c.-Systemen neben einem dunklen Startfleck (keine Radioaktivität) nur einen Fleck mit gleichem Laufverhalten wie nichtmarkierte Gallussäure (Toluol–Aceton–Eisessig 500:200:7,  $R_F$  0,18; Toluol–Ethylformiat–Ameisensäure 5:4:1,  $R_F$  0,39; Det. u.v. 254 nm,  $\text{FeCl}_3$  blau); Massenausbeute: 130 mg (95%); Aktivitätsausbeute: 402 MBq (95%, Spez. Akt. 581 MBq/mmol). Für die weitere Umsetzung wurde an dieser Stelle mit 130 mg Gallussäure geträgert (Spez. Akt. 290 MBq/mmol).

*Gallus*[ $^{14}\text{C}$ ]säuremethylester (14). — Verbindung 13 (240 mg, 1,28 mmol) wird in dest. Methanol (24 mL) gelöst und unter Rühren ein Strom trockenes HCl-Gas durchgeleitet. Nach vollständigem Umsatz (d.c.-Kontrolle, 1 h) wird i. Vak. eingedampft und im Exsikkator getrocknet. Das Rohprodukt (294 mg) wird in 2 Portionen chromatographisch gereinigt (Kieselgel C-18, 35–70  $\mu\text{m}$ , 60A; Säule 260 mm  $\times$  24 mm; 25% Methanol–0,1% Eisessig; Fluß 20 mL/min; 1,2 MPa). Das helle, schwach bräunliche Produkt ist d.c.-einheitlich und zeigt gleiche  $R_F$ -Werte wie 4; Massenausbeute: 199 mg (78%); Aktivitätsausbeute: 368 MBq (99%, Spez. Akt. 370 MBq/mmol).

4-O- $\beta$ -D-Glucopyranosylgallus[ $^{14}\text{C}$ ]säuremethylester (15). — Verbindung 14 (199 mg, 0,99 mmol) wird mit nichtmarkiertem Gallussäuremethylester (4) (205 mg, 1,01 mmol) geträgert, 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid (8) (822 mg, 2 mmol) zugegeben und mit dest. Aceton (4 mL) aufgelöst. Die klare bräunliche Lösung versetzt man mit M NaOH (2 mL, 2 mmol) und rührt 2 h bei 30°. Die jetzt dunkle Lösung wird im Ölpumpenvak. bis fast zur Trockene eingengt und der ölige Rückstand dreimal mit Wasser (5 mL) gewaschen. Das Waschwasser enthält Edukt und wird gesammelt. Der ölige Rückstand wird 1 h i. Vak. über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet, in dest. Methanol (20 mL) unter gelindem Erwärmen gelöst, unter Rühren mit Na (120 mg) versetzt und 5 min zum Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen wird über eine Säule mit Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ) Ionenaustauscher in Methanol (40 mL) filtriert, mit Methanol gewaschen (insgesamt 200 mL) und eingedampft. Das Rohprodukt (680 mg) enthält neben viel Edukt 14 und Produkt 15 noch eine Nebenkomponente und wird über l.c. getrennt (Trennsystem wie bei 14; Laufmittel 20% Methanol–0,2%

Eisessig). Das dabei zurückgewonnene Edukt wird mit dem oben erwähnten Waschwasser vereinigt und nochmals in die Glucosidierungsreaktion eingesetzt. Die vereinigten Produkte **15** sind d.c.-einheitlich und identisch mit nicht-radioaktivem Vergleichsmaterial **15** (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1,  $R_F$  0,63; Det. u.v. 254 nm, Thymol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Schwefelsäure pos.); Massenausbeute: 277 mg (40%); Aktivitätsausbeute: 139 MBq (38%, Spez. Akt. 174 MBq/mmol).

4-O-β-D-Glucopyranosylgallus[<sup>14</sup>C]säure (**16**). – Verbindung **15** (260 mg, 0,75 mmol) wird mit ges. Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung (30 mL) 24 h unter N<sub>2</sub> bei Raumtemperatur gerührt. Die weitere Bearbeitung erfolgt wie bei **10**. Der d.c.-Vergleich mit **10** ergibt gleiche  $R_F$ -Werte und gleiches Verhalten gegen Thymol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Eine l.c.-Untersuchung zeigt ein einheitliches Produkt (Trennsystem wie bei **1**); Massenausbeute: 243 mg (92%); Aktivitätsausbeute: 105 MBq (80%, Spez. Akt. 151 MBq/mmol).

4-O-(β-D-Glucopyranosyl-6-sulfat)gallus[<sup>14</sup>C]säure (**2**). — Verbindung **16** (243 mg, 0,7 mmol) in dest. abs. *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) wird mit SO<sub>3</sub>-Pyridin-Komplex (222 mg, 1,4 mmol) in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) wie bei **1** beschrieben umgesetzt. Das feingetrennte Produkt wird in der H<sup>+</sup>-Form belassen. D.c.- und l.c.-Analytik (Bedingungen siehe **1**) zeigen die Einheitlichkeit und Identität mit **1**; Massenausbeute: 115 mg (38,5%); Aktivitätsausbeute: 40,4 MBq (38,5%, Spez. Akt. 151 MBq/mmol;  $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$  (lg $\epsilon$ ) 207 (4,46), 247 (3,80), 289 nm (3,15).

#### DANK

Die Autoren danken dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

#### LITERATUR

- 1 K. FREUDENBERG, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 84–92.
- 2 K. FREUDENBERG, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 20 (1962) 41–72.
- 3 H. SCHILDKNECHT, *Angew. Chem.* 95, 689–705 (1983); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 22 (1983) 695–710.
- 4 H. FITTING, *Jahrb. Wiss. Bot.*, 72 (1930) 700–775.
- 5 A. SOLTYS, K. UMRATH UND C. UMRATH, *Protoplasma*, 31 (1938) 454–480.
- 6 G. HESSE, B. BANJERJEE UND H. SCHILDKNECHT, *Experientia*, 13 (1957) 13–19.
- 7 H. SCHILDKNECHT UND K. SCHUMACHER, *Chem. Zig.*, 105 (1981) 287–290.
- 8 H. SCHILDKNECHT, *Endeavour*, 8 (1984) 113–117.
- 9 C. SCHÖPF UND R. WINTERHALDER, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 544 (1940) 62–77.
- 10 L. JURD, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 4606–4610.
- 11 K. FREUDENBERG UND E. PLANKENHORN, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 536 (1938) 257–266.
- 12 K. B. GUISELEY UND P. M. RUOFF, *J. Org. Chem.*, 26 (1968) 1248–1254.
- 13 I. KOZAK, L. KRONRAD UND M. PROCHAZKA, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 15 (1978) 401–405.
- 14 P. NUMEROF, M. GORDON UND J. M. KELLY, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 115 (1955) 427–431.
- 15 E. FISCHER UND H. STRAUß, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 45 (1912) 3773–3779.
- 16 R. MILDE, Dissertation Universität Heidelberg, 1986.