

EIN BEITRAG ZUR BIOGENESE VON 2,5-DISUBSTITUIERTEN THIOPHENEN AUS DEM DEHYDROMATRICARIAESTER

K. E. SCHULTE, G. RÜCKER, W. MEINDERS* und W. HERRMANN

Institut für pharmazeutische Chemie, Universität Münster, Germany

(Eingegangen 9 Februar 1966)

Zusammenfassung—Zusatz von 2-¹⁴C-Dehydromatricaria-Methylester zu *Chrysanthemum vulgare* Bernh. führte zur Erzeugung von markierter Methyl-Propinylthienylacrylsäure und einer zweiten Substanz mit einem u.v. Maximum von 322 nm. Der Abbau des Thiophen zeigte, dass sich die Markierung in der erwarteten Lage befand. Zusatz von markiertem Dehydromatricaria-Ester zu *Anthemis nobilis* L. ergab den markierten Methylester der Methylthienylpentynen-Karbonsäure.

Abstract—Feeding 2-¹⁴C-dehydromatricaria methyl ester to *Chrysanthemum vulgare* Bernh. led to the production of labelled methyl propinylthienylacrylate and a second substance with an u.v. maximum of 322 nm. Degradation of the thiophene showed that the label was in the expected position. When the labelled dehydromatricaria ester was fed to *Anthemis nobilis* L. it gave the labelled methyl ester of methylthienylpentene carboxylic acid.

IN MEHREREN Pflanzen, vor allem aus der Familie der Compositen, sind Polyacetylene zusammen mit Thiophenen, die vorwiegend 2,5-disubstituiert sind, aufgefunden worden. Diese Substanzen haben oft nicht nur die gleiche C-Zahl gemeinsam, sondern es wiederholen sich auch bestimmte Strukturen der Polyacetylene in den Thiophenen. Diese Befunde legen biogenetische Zusammenhänge nahe,^{1,2} die u.a. auch dadurch an Wahrscheinlichkeit gewinnen, dass sich in vitro Thiophene aus Acetylderivaten gleicher C-Zahl durch Schwefelwasserstoffanlagerung darstellen lassen.³⁻⁵ Diese Reaktion verläuft bei relativ niedrigen Temperaturen in schwach alkalischem Milieu auch dann, wenn nicht H₂S, sondern schwefelhaltige Aminosäuren eingesetzt werden. So konnte z.B. aus dem Dehydromatricariaester in guter Ausbeute der Propinylthienylacrylsäureester dargestellt werden. Um Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, ob auch die Zelle den Dehydromatricariaester als Vorstufe dieser Thiophenverbindung verwendet, wurde der 2-¹⁴C-Dehydromatricariaester an *Chrysanthemum vulgare*, in der beide Substanzen vorkommen, verfüttert. In *Anthemis nobilis* L. kommt der Dehydromatricariaester zusammen mit dem Methylthienylpentinensäuremethylester vor; es war also weiter zu klären, ob diese Pflanze aus dem Dehydromatricariaester das letztgenannte Thiophen mit gleicher C-Zahl bilden kann.

Bei Fütterungsversuchen mit ¹⁴C-Acetat und ³⁵S-Sulfat war die höchste Einbaurate bei den Acetylenverbindungen zur Zeit der Blüte der Pflanzen gemessen worden. Zweijährige, kurz vor der Blüte stehende Rainfarmpflanzen nehmen den Dehydromatricariaester aus

* Teil der Dissertation W. Meinders, Universität Münster, 1965.

¹ F. CHALLENGER und J. H. HOLMES, *J. Chem. Soc.* 1837 (1953).

² J. H. BIRKINSHAW und P. CHAPLEN, *Biochem. J.* 60, 255 (1955).

³ K. E. SCHULTE, J. REISCH und L. HÖRNER, *Angew. Chem.* 72, 920 (1960).

⁴ K. E. SCHULTE, J. REISCH und L. HÖRNER, *Chem. Ber.* 95, 1943 (1962).

⁵ K. E. SCHULTE, J. REISCH, W. HERRMANN und G. BOHN, *Arch. Pharmaz.* 296, 456 (1963).

einer Knoop'schen Nährlösung, in der dieser mit Tween 85 dispergiert ist, über die Wurzeln auf. Die Abnahme der Nährlösung an dem verfütterten Substrat wurde durch laufende Aktivitätsmessungen verfolgt. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Polyine aus den unterirdischen Teilen der Pflanze mit Petroläther-Äther extrahiert und säulenchromatographisch aufgetrennt. Die Trennung wurde spektrophotometrisch verfolgt und die Aktivität der reinen Fraktionen ermittelt.

Es wurden drei aktive Substanzen isoliert: die erste war der Dehydromatricariaester, die zweite der Propinylthienylacrylsäuremethylester und eine dritte Substanz, eine Verbindung mit einem u.v.-Absorptionsmaximum von 322 nm. Diese letzte Verbindung war nicht völlig rein zu erhalten; die geringe Menge gestattete auch nicht, die Struktur eindeutig zu klären. Die Substanz enthält Schwefel; die optischen Eigenschaften (u.v.- und i.r.-Spektrum) deuten darauf hin, dass es sich nicht um eine Acetylenverbindung handelt. Diese Verbindung, die bisher noch nicht in *Chrysanthemum vulgare* aufgefunden wurde, fällt als aktive Substanz auch dann an, wenn ^{35}S -Cystein und ^{35}S -Sulfat verfüttert werden.

TABELLE 1. DIE AKTIVITÄT DER THIOPHEN- UND DER 322-VERBINDUNG NACH VERFÜTTERUNG DES 2- ^{14}C -DEHYDROMATRICARIAESTERS AN *CHRYSANTHEMUM VULGARE* BERNH

Nr.	Dauer der fütterung (Tage)	Aktivität der Thiophenverbdg.		Aktivität der 322- Verbindung in % der Extraktaktivität
		Aktivität in % der Extraktak- tivität	spez. Aktivität (Zerf./min·m-mole · 10 ⁻⁶)	
1	6	2,4	23	2,0
2*	7	15,0	154	19,5
3*	6	28,5	73	14,0
4	5	9,8	39	5,9
5	7	6,7	31	1,9
6	6	5,2	22	2,2
7	6	5,5	16	--

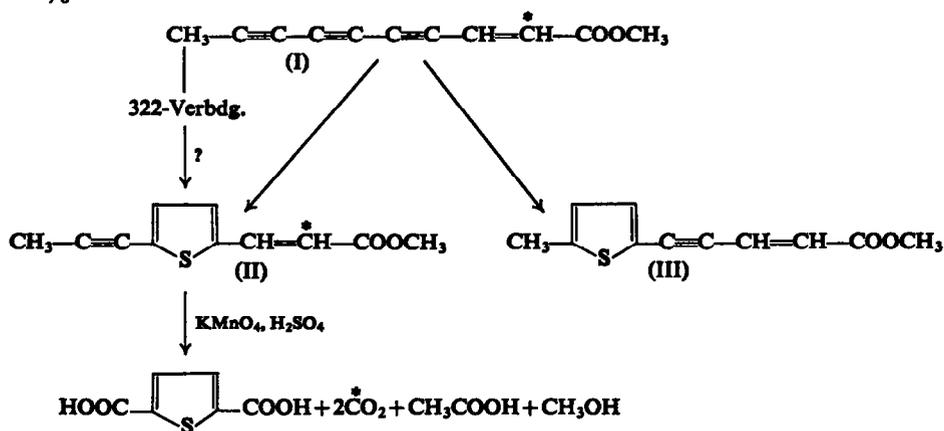
* Versuche mit kurz vor der Blüte stehenden Pflanzen.

Die Fütterungsversuche mit dem 2- ^{14}C -Dehydromatricariaester wurden mehrere Male wiederholt und stets das gleiche Ergebnis erhalten (Tab. 1).

Bei diesen Versuchen konnten andere aktive Polyacetylenverbindungen nicht isoliert werden. Durch oxydativen Abbau mit KMnO_4 in schwefelsaurer Lösung wurde die Aktivität des Propinylthienylacrylsäuremethylesters zu 85,4% im CO_2 nachgewiesen. Das ^{14}C -Isotop steht in der Thiophenverbindung (II) an der gleichen Stelle zur Carboxylgruppe wie in dem Polyin (I). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass in der pflanzlichen Zelle der Dehydromatricariaester die Vorstufe für die Synthese des Propinylthienylacrylsäuremethylesters ist. Offenbar ist auch die 322-Verbindung an dieser Biosynthese beteiligt, da sie, wie schon erwähnt, bei der Verfütterung von ^{35}S -Cystein und ^{35}S -Sulfat sowie 2- ^{14}C -Dehydromatricariaester entsteht und in jedem Falle radioaktiv ist. Der Einbau des Schwefels in den Dehydromatricariaester wird offenbar durch ein sehr spezifisches Enzym gesteuert. Dafür spricht das Ergebnis, das bei Verfütterung des 2- ^{14}C -Dehydromatricariaesters an *Anthemis nobilis* L. erhalten wurde. In dieser Pflanze entsteht aus dem Polyacetylen der Methylthienylpentin-en-säuremethylester (III). Während bei *Chrysanthemum vulgare* der Schwefel einbau zwischen dem C_4 und C_7 erfolgt, wird hier die Schwefelbrücke zwischen dem C_6 und

C₉ gebildet. Eine weitere radioaktive Verbindung wurde bei diesen Fütterungsversuchen nicht gefunden.

Der 2-¹⁴C-Dehydromatricariaester wurde auf folgendem Wege synthetisiert. Aus dem Butindiol-(1,4) liess sich mit SOCl₂ das 1,4-Dichlorbutin darstellen und dieses mit Natriumamid und Methyljodid zum Pentadiin-(1,3) umsetzen. 3-Brompropin-(2)-ol-(1) ist aus Kaliumhypopromit und Propargylalkohol zugänglich. Aus Pentadiin-(1,3) und 3-Brompropin-(2)-ol-(1) entsteht durch Kupplung nach Chodkiewicz.⁶ Octatriin-(2,4,6)-ol-(1), aus dem durch Oxydation mit Mangandioxid der zugehörige Aldehyd zugänglich ist. Dieser Aldehyd gibt bei der Umsetzung mit 2-¹⁴C-Triphenylphosphincarbomethoxymethylen den 2-¹⁴C-Dehydromatricariaester. Das Triphenylphosphincarbomethoxymethylen wurde aus 2-¹⁴C-Bromessigsäuremethylester und Triphenylphosphin und anschliessender HBr-Abspaltung aus dem entstandenen Phosphoniumsalz erhalten. Die radiochemische Gesamtausbeute betrug etwa 55%.



EXPERIMENTELLER TEIL

Die u.v.-Spektren wurden mit einem u.v.-Spektrometer der Firma Carl Zeiss GmbH, Modell RPQ 20A, das i.r.-Spektrum mit einem i.r.-Spektrographen der Firma Perkin Elmer, Modell 021, aufgenommen. Für die Messung der Aktivität stand das Flüssigkeitsszintillator der Firma Packard Instrument Company, Inc., Modell 314 EX zur Verfügung.

Zusammensetzung der Knoop'schen Nährlösung: 0,572 g Ca(NO₃)₂ wasserfrei; 0,143 g KNO₃; 0,143 g KH₂PO₄; 0,143 g MgSO₄ wasserfrei; 1 Tropfen einer 5% igen FeCl₃·6 H₂O-Lösung; in 1 l. destilliertem Wasser gelöst. In 1 l. dieser Lösung wurden 20–40 mg 2-¹⁴C-Dehydromatricariaester unter Zusatz von 2–3 Tropfen Tween 85 dispergiert.

Zusammensetzung der Szintillationsflüssigkeit: (1) für in Toluol lösliche Proben: 5,0 g PPO (2,5-Diphenyloxazol), 0,1 g Dimethyl-POPOP (1,4-Bis-2(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl)-benzol), 80,0 g Naphthalin, gelöst in 1000 ml Toluol. (2) für in Wasser lösliche Proben: 5,0 g PPO, 0,1 g Dimethyl-POPOP, 80,0 g Naphthalin, gelöst in 1000 ml Toluol-Dioxan-Wasser (5:5:3)+4% Cab-O-Sil.

2-¹⁴C-Dehydromatricariaester

Pentadiin-(1,3). In flüssigem Ammoniak wurde aus 41,4 g (1,8 moles Natrium unter Zusatz von 0,25 g Fe(NO₃)) eine Suspension von Natriumamid hergestellt, in diese Mischung

⁶ W. CHODKIEWICZ, *Ann. Chim.* 2, 819 (1957).

74 g (0,6 mole) 1,4-Dichlorbutin sowie anschliessend 85,2 g (0,6 mole) Methyljodid getropft und 3 Stunden gerührt. Nach dem Verdampfen des Ammoniaks und Zugabe von Wasser wurde ausgeäthert, von den vereinigten Auszügen das Lösungsmittel abgedampft und das Pentadiin-(1,3)fraktioniert. Kp 76-78. Ausbeute: 6 g (16%, d.Th.).

3-Brom-propin-(2)-ol-(1). 11,2 g (0,2 mole) Propargylalkohol wurden innerhalb von 3 Stunden unter Rühren bei 0 langsam zu einer gekühlten Natrium-Hypobromit-Lösung (40 g NaOH, 10 ml Brom und 200 ml Wasser) getropft, das Reaktionsgemisch ausgeäthert, der Äther abgedampft und der Rückstand im Vakuum fraktioniert. Kp 76-78/18 mm. Ausbeute: 20 g (74%, d.Th.) *3-Brom-propin-(2)-ol-(1)*.

Octatriin-(2,4,6)-ol-(1). 3,2 g (0,05 mole) Pentadiin-(1,3) wurden in 100 ml Methanol gelöst und diese Lösung mit 0,5 g Cu(I)Cl, 0,5 g (1,8 mole) Hydroxylamin-Hydrochlorid und 9,1 g 50% iger wässriger Äthylaminlösung versetzt. Zu dieser Suspension wurden bei 30 langsam 6,8 g *3-Brom-propin-(2)-ol-(1)* in 50 ml Methanol zugetropft und solange gerührt, bis die Farbe nach blaugrün umschlug. Es wurde mit Wasser versetzt, ausgeäthert, der Äther abgedampft und der Rückstand aus Petroläther umkristallisiert. Die Verbindung ist sehr licht- und temperaturempfindlich. Fp 92-93. Ausbeute: 4,8 g (8%, d.Th.) *Octatriin-(2,4,6)-ol-(1)*.

Octatriin-(2,4,6)-al-(1). 590 mg (5 m-moles) *Octatriin-(2,4,6)-ol-(1)* wurden in 1 l Petroläther (Kp 35-40) gelöst und mit 5,9 g aktivem Braunstein 1,5 Stunden lang geschüttelt. Dann wurde filtriert und die Lösung auf 500 ml eingengt. Der Gehalt der Lösung an *Octatriin-(2,4,6)-al-(1)* wurde durch Messung der Extinktion des langwelligsten Absorptionsmaximums bei 336,5 nm bestimmt. $\epsilon = 11000-12000$ [l cm¹/mole]. Ausbeute: 0,206 g (35% d.Th.) *Octatriin-(2,4,6)-al-(1)*.

2-¹⁴C-Carbomethoxymethyl-triphenylphosphoniumbromid. 1,1 g (4,2 m-moles) Triphenylphosphin wurden in 4 ml trockenem Benzol gelöst und bei 20 die Lösung von 61 mg (0,4 m-mole) *2-¹⁴C-Bromessigester* (Spezif. Aktivität: $1,00 \cdot 10^{10}$ Zerf./min/m-mole) sowie 550 mg (3,6 m-mole) inaktiven Bromessigsäuremethylester im gleichen Lösungsmittel zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Min erhitzt, der Niederschlag abgesaugt und mit Petroläther gewaschen. Fp 160-161. Ausbeute: 1,39 g (84%, d.Th.); *2-¹⁴C-Carbomethoxymethyl-triphenylphosphoniumbromid*.

2-¹⁴C-Triphenylphosphin-carbomethoxymethylen. 1,39 g (4,6 m-moles) des Phosphoniumsalzes wurden in 40 ml Wasser gelöst und die Lösung mit 1 n NaOH bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und über P₂O₅ getrocknet. Fp 158-160. Ausbeute: 1,07 g (95%, d.Th.); *2-¹⁴C-Triphenylphosphin-carbomethoxymethylen*.

trans-2-¹⁴C-Dehydromatricariasäuremethylester. 500 ml einer Lösung von 116 mg (1 m-mole) *Octatriin-(2,4,6)-al-(1)* in Petroläther wurden bei Raumtemperatur mit 10 ml einer Lösung von *2-¹⁴C-Triphenylphosphin-carbomethoxymethylen* und 67 mg (0,2 m-mole) inaktivem Triphenylphosphin-carbomethoxymethylen in Methylenchlorid versetzt. Nach 20-stündigem Stehen wurde eine Probe u.v.-spektrophotometrisch auf die Vollständigkeit der Umsetzung untersucht. Danach wurde mit verdünnter Salzsäure und mit Wasser gewaschen, die Lösung über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Zur Reinigung wurde der *Dehydromatricariaester* in 40 ml Äthanol gelöst und in der Wärme mit 40 ml Wasser versetzt. Der Ester kristallisiert in hellgelben Nadeln. Fp 107. Ausbeute: 120 mg (70% d.Th.) *trans-2-¹⁴C-Dehydromatricariasäuremethylester*. Spezif. Aktivität: $9,55 \cdot 10^8$ Zerf./min/m-mole.

Fütterungsversuche und Aufarbeitung der Wurzeln

Zweijährige Rainfarnpflanzen wurden sorgfältig aus dem Boden gegraben, von der anhaftenden Erde befreit und in ein mit 1 l. Knoop'scher Nährlösung gefülltes Becherglas gehängt, in dem mit 2–3 Tropfen Tween 85 der 2-¹⁴C-Dehydromatricariaester dispergiert worden war.

Der Aktivitätsabfall wurde in Abständen von 12 Stunden gemessen. Nach Beendigung der Verfütterung wurden die unterirdischen Teile der Pflanze abgetrennt und mit Wasser solange gewaschen, bis keine Aktivität mehr im Waschwasser nachweisbar war. Nach der Zerkleinerung der Wurzeln mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator wurde mit einem Gemisch aus Äther und Petroläther 50:50 (Vol. %) extrahiert, die Auszüge eingeeengt, über Natriumsulfat getrocknet und einer säulenchromatographischen Auftrennung unterworfen. Der Verlauf der chromatographischen Trennung wurde u.v.-spektrophotometrisch verfolgt. Säule: Länge 1,5 m, Durchmesser 1 cm; Adsorptionsmittel: 20 g Kieselgel für die Chromatographie "Merck" (0,05–0,2 mm); Elutionsflüssigkeit: Petroläther (50–75°)/Benzol 99:1; 98:2; 95:5 (Vol. %); Fraktionsvolumen: 7 ml.

Der oxydative Abbau des Propinylthienylacrylsäuremethylesters

Eine Lösung von 0,125 mg Propinylthienylacrylsäuremethylester in Petroläther (Aktivität: 56150 Zerf./min) wurde im Vakuum unter N₂ eingeeengt und der ölige Rückstand in 10 ml Azeton (p.A.) aufgenommen. Bei Raumtemperatur wurden 1 ml konz. Schwefelsäure und 0,5 g KMnO₄ zugegeben und das entstehende CO₂ mit CO₂-freiem Stickstoff in eine Vorlage getrieben, die 10 ml einer 1 m Hyamin-10-X-Lösung* enthielt. Nach 2 Stunden wurde ohne Unterbrechung des Stickstoffstroms das Reaktionsgefäß auf 60–70° erwärmt und 1 Stunde bei dieser Temperatur gehalten. Die Impulsrate der Hyamin-10-X-Lösung betrug 47970 Zerf./min.

* Bezogen von der Firma Packard Instrument Company, Inc., La Grange, Illinois, U.S.A.