

ABNORMALE ENZYMATISCHE SPALTUNG VON 4-METHYLTHIOBUTYLGLUCOSINOLAT IN FRISCHPFLANZEN VON *ERUCA SATIVA*

M. SCHLÜTER* und R. GMELIN

Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin

(Eingegangen 11. Mai 1972. Angenommen 26. Juli 1972)

Key Word Index—*Eruca sativa*; Cruciferae; glucosinolates; abnormal hydrolysis; 4-methylthiobutylthiocyanate.

Zusammenfassung—In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Virtanen wird auch in Frischpflanzen von *Eruca sativa* ein Alkylrhodanid—4-Methylthiobutylthiocyanat—aus dem genuinen Glucosinolat-Glucoerucin-gebildet, in den Samen dagegen ausschließlich 4-Methylthiobutylisothiocyanat. Die chemische Charakterisierung von 4-Methylthiobutylthiocyanat erfolgt durch Einwirkung von Methyljodid unter Bildung von *S*-Methylthiolaniumjodid. Ein übereinstimmendes Bild scheint auch bei der Species *Diplotaxis tenuifolia* vorzuliegen.

Abstract—In agreement with the results of Virtanen, fresh plants of *Eruca sativa* yield an alkylthiocyanate, 4-methylthiobutylthiocyanate from the glucosinolate glucoerucin. The seeds give the expected isothiocyanate. The abnormal product was characterized by conversion to *S*-methylthiolanium iodide with methyl iodide. *Diplotaxis tenuifolia* behave similarly.

DIE enzymatische Spaltung von Glucosinolaten verläuft nach Ettliger und Lundeen^{1,2} auf folgende Weise: Enzyme vom Myrosinase Typ (Myrosinase, Glucosinolase—aktivierbar durch L-Ascorbinsäure—und Thioglykosidase aus *Aspergillus sydowi*) lösen zunächst die Thioglucopyranosidbindung unter Abspaltung von D-Glucose (I). Im neutralen Milieu erfolgt eine Art Lossen-Umlagerung des intermediär gebildeten Aglykons unter gleichzeitiger Abstoßung der Sulfatgruppe (II). Hierbei entstehen primär Alkylisothiocyanate, die je nach Bau der Seitenkette weitere Sekundärprodukte ergeben können³⁻⁵ (III-V). Wird die enzymatische Spaltung bei pH 3-4 durchgeführt, wird ohne Lossenumlagerung ein Alkylnitril gebildet. Weitere Spaltprodukte sind Schwefel, Sulfationen und Glukose (VI).^{5,6}

Bei Samen und Frischpflanzen von *Lepidium sativum*, *L. ruderale*, *Thlaspi arvense* und *Alliaria officinale* wurde ein weiterer Typ der enzymatischen Glucosinolat-Spaltung gefunden, bei dem Alkylthiocyanate gebildet werden (VII).^{7,8} Virtanen und Saarivirta⁹ postulieren hierbei die Einwirkung einer hypothetischen Isomerase auf primär gebildete Alkylisothiocyanate. Versuche, diese Isomerase zu isolieren blieben bisher jedoch erfolglos.

* Versuchsergebnisse sind Teil der Dissertation M. SCHLÜTER, Berlin (1971).

¹ M. G. ETTLINGER und A. I. LUNDEEN, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4127 (1956).

² M. G. ETTLINGER und A. I. LUNDEEN, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1764 (1957).

³ A. KJAER, R. GMELIN und R. BOE JENSEN, *Acta Chem. Scand.* **10**, 26 (1956).

⁴ M. A. GREER, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1260 (1956).

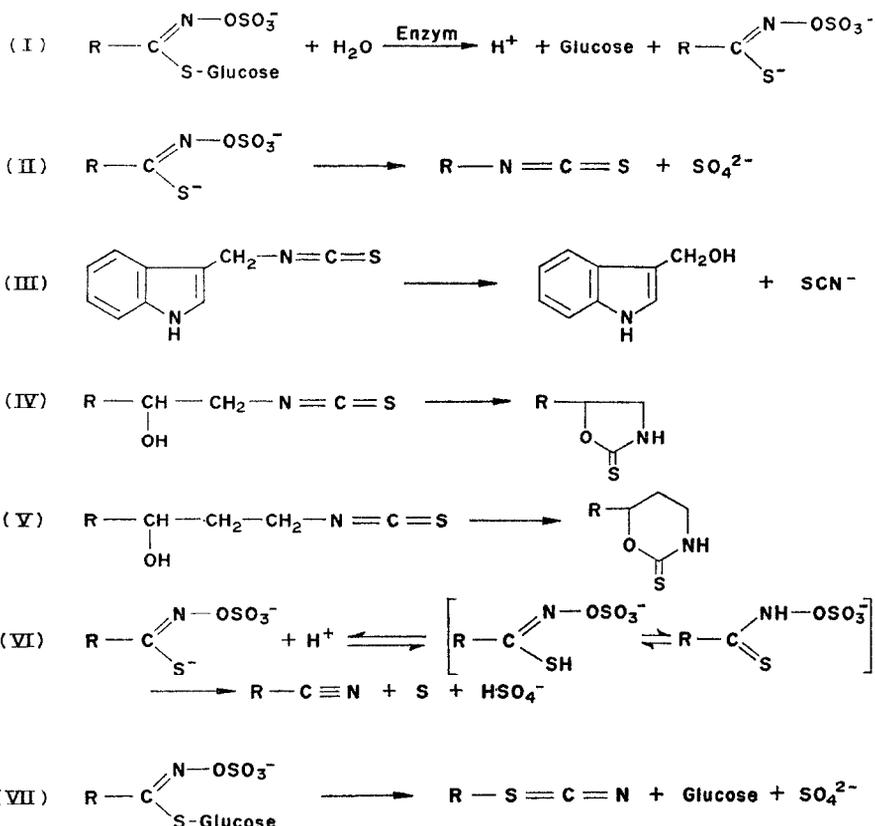
⁵ R. GMELIN und A. I. VIRTANEN, *Ann. Acad. Sci. Fennicae A. II. Chemica* No. 107, 25 (1961).

⁶ S. KAWAKISHI, M. NAMIKI, H. WATANABE und K. MURAMATSU, *Agric. Biol. Chem.* **31**, 823 (1967).

⁷ R. GMELIN und A. I. VIRTANEN, *Acta Chem. Scand.* **16**, 1378 (1962); *Suomen Kemistilehti* **32B**, 236 (1959).

⁸ A. I. VIRTANEN, *Report on Primary Plant Substances and Decomposition Reactions in Crushed Plants*, Biochemical Institute, Helsinki (1964).

⁹ A. I. VIRTANEN und M. SAARIVIRTA, *Suomen Kemistilehti* **35B**, 102 (1962); **35B**, 248 (1963).



ERGEBNISSE

Zerkleinerte Samen von *Eruca sativa* Mill. bilden bei Einwirkung von Wasser nach enzymatischer Spaltung 4-Methylthiobutylisothiocyanat, das über sein Thioharnstoffderivat charakterisiert werden kann.¹⁰ Inzwischen wurde das zugehörige Glucosid, das 4-Methylthiobutylglucosinolat (Glucoerucin) kristallin erhalten.¹¹

Frischpflanzen von *E. sativa* enthalten wie unten beschrieben, ebenfalls 4-Methylthiobutylglucosinolat. Beim Homogenisieren der Frischpflanzen entsteht jedoch anstelle des ausgeprägt rettichartig riechenden 4-Methylthiobutylisothiocyanats ein sehr flüchtiger labiler Geruchsstoff als enzymatisches Spaltprodukt, dessen Geruch in der Literatur mit 'angebranntem Schweinefleisch' verglichen wird.¹² Dieses unangenehm riechende Spaltprodukt ließ sich durch Wasserdampfdestillation reinigen und durch Ausschütteln mit Chloroform anreichern. Das IR-Spektrum dieser Chloroform-Fraktion zeigte eine starke Thiocyanatbande bei ν_{max} 2160 cm^{-1} und erwies sich als deckungsgleich mit dem Spektrum einer chloroformischen Lösung von synth. 4-Methylthiobutylthiocyanat. Da die Flüchtigkeit dieser Substanz keine Isolierung in reiner Form zuließ, wurde versucht, durch Umsetzung mit Methyljodid zu einem Sulfoniumsalz zu gelangen. Aus der Elementaranalyse und

¹⁰ A. KJAER und R. GMELIN, *Acta Chem. Scand.* **9**, 542 (1955).

¹¹ R. GMELIN und M. SCHLÜTER, *Arch. Pharm.* **303**, 330 (1970).

¹² A. THELLUNG, *Cruciferae in Hegi, G. Flora von Mitteleuropa*, Bd. IV/1, 51-482, München (1919).

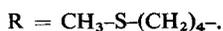
dem massenspektrometrisch bestimmten Mol.-Gew. (230) der kristallin erhaltenen Verbindung errechnet sich die Summenformel $C_5H_{11}JS$. Das Massenspektrum zeigt die Fragmentierung für ein cyclisches Sulfoniumsalz bzw. einen cyclischen Thioäther (m/e 88, 87, 60, 47, 46, 45).¹³ Dieses Ergebnis wird im IR-Spektrum bestätigt. Die Banden bei ν_{\max} 883 und 958 cm^{-1} sind für das Thiolan-Gerüst signifikant.¹⁴ Das NMR-Spektrum zeigt zwei sich überlagernde AA'BB'-Systeme bei δ 2,2–2,5 m , $4H(-C-CH_2-CH_2-C)$. δ 2,8 s , $3H(CH_3-S=)$; δ 3,2–3,8 m , $4H(-CH_2-S=CH_2-)$.

Diese zunächst unerwartete Bildung des cyclischen Sulfonium-Salzes konnte durch die Umsetzung von synth. 4-Methylthiobutylthiocyanat mit Methyljodid bestätigt werden. Die Synthese erfolgte durch Umsetzen von 4-Chlorbutan-1-ol mit Natriummethylthiolat, Chlorierung des gebildeten 4-Methylthiobutan-1-ols mit Thionylchlorid und Reaktion des 4-Methylthiobutyl-1-chlorids mit Kaliumrhodanid. Bei dem öligen Zwischenprodukt 4-Methylthiobutyl-1-chlorid schieden sich nach längerem Stehen Kristalle ab, die durch ihre Hydrophilität leicht abzutrennen sind und als isomeres *S*-Methylthiolaniumchlorid (IR, MS, NMR) identifiziert wurden. Dieser anchimere Effekt des nucleophilen Schwefels scheint bei der schnell verlaufenden Reaktion von 4-Methylthiobutylthiocyanat mit Methyljodid zu *S*-Methylthiolaniumjodid durch die Ablösung der Thiocyanatgruppe als Methylthiocyanat erhöht zu sein.

Auch bei *E. sativa* ist es nicht gelungen, in den Frischpflanzen ein spezifisches Enzym zu finden bzw. abzutrennen, das mit isoliertem Glucoerucin eine Spaltung zu 4-Methylthiobutylthiocyanat herbeiführt. Die Versuchsanordnungen in Tabelle 1 mögen dies demonstrieren:

TABELLE 1. PRODUKTION VON 4-METHYLTHIOBUTYLTHIOCYANAT

	R-N=C-S	R-S-C≡N
Homogenat von Frischpflanzen	—	+
Frischpflanzen-Preßsaft + Glucoerucin	+	+
Frischpflanzen-Preßsaft + eingedampfter Methanolextrakt von <i>E. s.</i>	+	—
Myrosinase + eingedampfter Methanolextrakt von <i>E. s.</i>	+	—
Getrocknete Pfl. <i>E. s.</i> + Phosphatpuffer pH 7	+	—



DISKUSSION

Mit der 'normalen' Spaltung in den Samen und der 'abnormalen' in der Frischpflanze stellt *E. sativa* einen Sonderfall innerhalb der Gruppe der präformierten Rhodanidbildner dar: *Lepidium sativum*, *L. ruderale*, *Thlaspi arvense* und *Alliaria officinalis*; bei diesen vier Species liefern sowohl Samen als auch Frischpflanzen Alkylthiocyanate. Prüft man die Frischpflanze auf die Aktivität einer nach Virtanen und Saarivirta bei der Alkylthiocyanatbildung wirksamen Isomerase, lassen die Ergebnisse und angewandten Methoden keine Entscheidung über das Vorliegen eines weiteren Enzyms zu. Preßsäfte der Frischpflanze sind noch enzym-aktiv, spalten aber kristallines, Glucoerucin zum 4-Methylthiobutylisothiocyant; auch Versuche, das Enzym abzutrennen, führten in jedem Fall zu Enzympräparationen mit Myrosinase-Aktivität.

¹³ H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI und D. H. WILLIAMS, *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, Holden-Day, San Francisco (1967).

¹⁴ H. TSCHAMLER und H. VOETTER, *Monatsh. Chem.* **83**, 302 (1952).

Da nach Bergmann¹⁵ für jedes Glucosinolat ein spezifisches Enzym (Enzym-Komplex) angenommen werden kann, wären auch bei der Alkylthiocyanatbildung Unterschiede im jeweils stadienabhängigen Wirkungsgrad des einzelnen Enzyms möglich. Ob jedoch verschieden wirksame Enzyme vorliegen, oder die verschiedenen Reaktionsprodukte eine Folge von selektiven Inhibitoren oder Cofaktoren sind, die durch ihre Bindung an ein energie-gebendes System ihre Nichtlösbarkeit aus der Zelle bzw. ihre Inaktivierung durch Trocknung der Pflanze erklären würden, entzieht sich noch unserer Kenntnis. Die vorliegenden Ergebnisse sind vergleichbar mit jenen von Virtanen und Saarivirta.⁹ Samen von *L. sativum*, deren Enzyme durch Hitzeeinwirkung inaktiviert wurden, bilden mit Wasser-Enzym-Präparation aus nicht inaktivierten Samen Benzylisothiocyanat. Bei endogener Enzymeinwirkung in den Samen entsteht dagegen aber Benzylthiocyanat.

Auch eine syn-anti-Isomerie der Glucosinolats mit einer spontanen sterischen Änderung des labilen genuineen Zustandes bei der Extraktion der Pflanze ist denkbar. Diese Umlagerung in die sterisch stabile Form könnte auch bei Trocknung der Pflanze eintreten und damit die unterschiedlichen enzymatischen Reaktionen ermöglichen. Tatsächlich fanden Schraudolf und Bergmann¹⁶ signifikante Unterschiede in der Kinetik der Umsetzung von Myrosinase mit papierchromatographisch und hochspannungselektrophoretisch isoliertem Glucobrassicin und seinem kristallinem Tetramethylammoniumsalz bei andererseits voller Parallelität im papierchromatographisch und hochspannungselektrophoretischen Verhalten der drei Verbindungen. Diese Annahme muß aber erst durch weitere Untersuchungen bestätigt werden, da über den Einfluß von Lösungsmitteln, pH-Wert und UV-Licht auf die Einstellung des Gleichgewichts der beiden Formen eines Glucosinolats oder auch von Aldoximen zu wenig bekannt ist. Bei Aldoximen konnte bereits bei Raumtemperatur eine Umlagerung der beiden geometrischen Isomeren festgestellt werden.¹⁷ Es liegen Anzeichen vor, daß ähnlich Spaltungsreaktionen auch in vielen wichtigen Gemüse- und Futterpflanzen z.B. der Gattung *Brassica oleracea* stattfinden können, deren strumigene Eigenschaften noch nicht restlos geklärt sind.

EXPERIMENTELLES

Pflanzenmaterial. Die Samen von *Eruca sativa* Mill. wurden vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Göttingen, zur Verfügung gestellt. *E. sativa* wurde im Botanischen Garten Berlin-Dahlem, angebaut. Zur Untersuchung gelangten 5–6 Wochen alte Pflanzen 30 Min. nach der Ernte. Für die Analyse der getrockneten Droge wurde *E. sativa* von der Firma Bornträger, Offstein, angebaut und schonend getrocknet. Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Heiztisch-Mikroskop bestimmt. Die Mikroanalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium I. Beetz, Kronach, ausgeführt. Die IR-Spektren nahmen wir mit dem Leitz-Unicam-Spektralphotometer SP 200 G auf. Die NMR-Spektren wurden mit dem Kernresonanzspektrometer Varian A60 oder Varian HA100 aufgenommen. Die Messung der UV-Spectren erfolgte mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQII. Ein Atlas-CH₄-Massenspektrometer lieferte die Massenspektren.

Extraktion der Frischpflanze nach endogener Enzymeinwirkung. 3 kg Frischpflanzen wurden unter Zusatz von 500 ml Wasser homogenisiert. Nach etwa 2 Min. waren im Homogenat Glucose und Sulfationen nachweisbar. Der pH-Wert der Lösung betrug 5,5–5,6. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei 30° wurde das Homogenat einer Wasserdampfdestillation unterworfen. 500 ml Destillat wurden in einer eisgekühlten Vorlage gesammelt und dreimal mit je 20 ml CHCl₃ ausgeschüttelt; die CHCl₃-phasen wurden getrocknet (Na₂SO₄) und zeigte im IR- und NMR-Spektrum folgende Daten: IR. (in CHCl₃). (cm⁻¹): 785w, 885s, 960w, 990w, 1052m, 1245m, 1260s, 1290w, 1440s, 1710a, 2165vs, 2870s, 2910w, 2960m, 2980m. NMR. (in CDCl₃, 60 MHz). 1,5–2,0 Multiplett, 4H(C-CH₂-CH₂-C); 2,1 Singulett, 3H(CH₃-S); 2,3–2,7-Multiplett, 2H(S-CH₂-) und 2,75–3,1 Multiplett, 2H(-CH₂-SCN).

¹⁵ F. BERGMANN, *Z. Pflanzenphys.* **62/4**, 362 (1970).

¹⁶ H. SCHRAUDOLF und F. BERGMANN, *Planta* **67**, 75 (1965).

¹⁷ J. H. DAVIES, R. H. DAVIS and P. KIRKBY, *J. Chem. Soc. C*, 431 (1968).

Reaktionen mit Methyljodid. Zu 60 ml der CHCl_3 -Lösung wurden 10 ml MeJ gegeben, die nach 12 Std. aus verschiedenen Kristallnadeln wurden abgesaugt und aus 80% ÄtOH umkristallisiert. Ausbeute 22 mg. Wurde nach Absaugen der Kristalle Ferrinitrat-Reagenz zugegeben, erfolgte keine Reaktion. Bei vorausgehendem Erhitzen des Filtrats mit Na_2S -Lösung trat jedoch mit Ferrinitrat-Reagenz Rotfärbung auf. 198–199° (Zers.) (Ber. für $\text{C}_2\text{H}_4\text{S}$: C, 26,09; H, 4,78; S, 13,92. Gef. $\text{C}_2\text{H}_4\text{S}$: C, 26,06; H, 4,75; S, 14,06%). UV (in H_2O). $\lambda_{\text{max}} = 220,5 \text{ nm}$ ($\log \epsilon = 4185$) IR (KBr). ν (cm^{-1}): 795w, 883m, 900w, 958m, 980m, 1000s, 1040m, 1070s, 1145w, 1210w, 1260m, 1310m, 1330m, 1405m, 1430s, 1460m, 2920w, 2990m, MS (70 eV/-A). m/e: 230 (0,04), 142 (100), 127 (34), 103 (0,13), 91 (0,1), 88 (34), 87 (10), 85 (1,3), 73 (1,6), 63,5 (0,53), 60 (33), 59 (3,8), 58 (3), 55 (3,5), 51 (0,8), 47 (4,4) 46 (4,7), 45 (4,8), 41 (3,5), 39 (3,8), 27 (4). NMR (in D_2O , 100 MHz). δ 2,2–2,55 Multiplett, 4H(C- CH_2 - CH_2 -C); δ 2,8 Singulett, 3H(CH_3 -S); δ 3,2–3,8 Multiplett, 4H(- CH_2 -S- CH_2 -).

Synthese von 4-Methylthiobutyl-1-Rhodanid. 4-Methylthiobutan-1-ol. 43,3 g MeSH wurde in eine Lösung von 21,0 g Na in 600 ml MeOH eingeleitet, 98,2 g 4-Chlorbutanol wurde langsam zutropft und das Reaktionsgemisch 3 Std. am Rückfluß erhitzt. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Salzes wurde die Hauptmenge des MeOH durch Vakuumdestillation entfernt. Zur Abtrennung des restlichen MeOH wurde H_2O zugesetzt und mit Ät₂O ausgeschüttelt. Nach einer weiteren Vakuumdestillation wurde ein farbloses, sehr flüchtiges Öl erhalten, das sofort weiter umgesetzt wurde. Ausbeute 56 g; Sdp. 105°/9 mm. NMR (in CDCl_3 - D_2O , 60 MHz). δ 1,5–2,05 Multiplett, 4H(C- CH_2 - CH_2 -C); δ 2,1 Singulett, 3H(CH_3 -S); δ 2,35–2,7 Multiplett, 2H(S- CH_2 -); δ 3,55–3,85 Multiplett, 2H(- CH_2 -OD).

4-Methylthiobutyl-1-chlorid: Eine Lösung von 55 g 4-Methylthiobutan-1-ol in 40 ml CHCl_3 wurde in einem Dreihalskolben mit Rührwerk, Rückflußkühler und Tropftrichter gebracht. Unter Rühren wurde die Zutropfgeschwindigkeit von 30 g frisch gereinigtem SOCl_2 so reguliert, daß über 2 Std. ein ständiger Rückfluß aufrecht erhalten wurde. Gegen Ende der Umsetzung gelierte das Reaktionsgemisch; nach Abdestillation des CHCl_3 destillierte der Chlorthioäther bei 60–61°/5 mm. Zweimalige Redestillation ergab ein farbloses Öl zur Analyse. Ausbeute 12 g. Sdp. 89–90°/10 mm; $n_{\text{D}}^{20} 1,4723$. (Ber. für $\text{C}_4\text{H}_9\text{ClS}$: C, 43,31; H, 8,00; Cl, 25,56; S, 23,12. Gef.: $\text{C}_4\text{H}_9\text{ClS}$: C, 43,11; H, 8,10; Cl, 25,56; S, 23,05%. NMR (in CDCl_3 , 100 MHz). δ 1,55–2,05 Multiplett, 4H(C- CH_2 - CH_2 -C); δ 2,1 Singulett, 3H(CH_3 -S); δ 2,4–1,65 Multiplett, 2H(S- CH_2 -); δ 3,45–3,65 Multiplett, 2H(- CH_2 -Cl). Nach 14-tägigem Stehen schied sich auf dem Öl große farblose Kristallnadeln ab. 169–170° (Zers.). MS. (70 eV/-A). m/e: 138 (1,9), 103 (2,4), 90 (5), 89 (7), 88 (31), 87 (100), 85 (6), 73 (8), 62 (8), 61 (18), 60 (44), 59 (26), 58 (12), 55 (24), 54 (26), 52 (27), 50 (39), 47 (34,5), 46 (32), 45 (34), 41 (19), 39 (22), 27 (27). NMR (in D_2O , 60 MHz). δ 2,3–3,7 Multiplett, 4H(C- CH_2 - CH_2 -C); δ 3,0 Singulett, 3H(CH_3 -S); δ 3,35–3,95 Multiplett, 4H(- CH_2 -S- CH_2 -).

4-Methylthiobutyl-1-thiocyanat. 4,2 g 4-Methylthiobutyl-1-chlorid wurden mit 3,6 g Kaliumrhodanid in 36 g 85% ÄtOH 12 Std. bei 30° am Rückfluß erwärmt. Nach Zugabe von 100 ml H_2O wurde dreimal mit je 10 ml CHCl_3 ausgeschüttelt. Die vereinigten, über Chloroformphasen (Na_2SO_4) zeigten im IR-Spektrum die gleiche Lage der Thiocyanatbande bei 2165 cm^{-1} wie die natürliche Verbindung. Im NMR-Spektrum (CDCl_3 - D_2O) waren Lage und Aufspaltung der Signale der synthetischen und natürlichen Verbindung identisch. Da bei der CHCl_3 -ausschüttelung ein geringer Äthanolgehalt der synthetischen Verbindung nicht vermeidbar war, traten im NMR-Spektrum zusätzlich bei δ 1,1–1,35 ein Triplett (- CH_3) und bei δ 3,58–3,82 ein Quadruplett (- CH_2 -OD) auf.

Reaktion von 4-Methylthiobutyl-1-thiocyanat mit MeJ: 20 ml der CHCl_3 Lösung von 4-Methylthiobutyl-1-thiocyanat wurden mit 5 ml MeJ versetzt. Nach 3 Std. wurden die Kristallnadeln abgesaugt, mit CHCl_3 gewaschen und aus 80% ÄtOH umkristallisiert. Die nach Absaugen der Kristalle verbliebene Restlösung wurde mit Na_2S erwärmt; Zusatz von Ferrinitratreagenz ergab eine intensive Rotfärbung. Die IR-Spektren des synthetisierten S-Methylthiolaniumjodids und des kristallinen Umsetzungsproduktes von 4-Methylthiobutyl-1-cyanats mit Methyljodid waren identisch.

Extraktion der getrockneten Pflanze nach endogener Enzymwirkung. 80 g getrocknete Pflanzen (Stengel, Blätter, Infloreszenzen) wurden fein gemahlen, mit H_2O inkubiert und 3 Std. auf 30° erwärmt. Nach dieser Zeit wurde abgepreßt und der retlichähnlich riechende Preßsaft dreimal mit je 20 ml Ät₂O ausgeschüttelt; die getrockneten Aetherphasen (Na_2SO_4) wurden mit NH_3 gesättigtem MeOH versetzt, wobei ein kristallines Derivat erhalten wurde, das in allen geprüften Daten mit synthetischem 4-Methylthiobutylthioharnstoff übereinstimmte.