

## EINBAU VON $^{14}\text{C}$ -MEVALONSÄURELACTON IN HOPFENBITTERSTOFFE\*

FRIEDRICH DRAWERT und JOHANNES BEIER

Lehrstuhl für Chemisch-technische Analyse und chemische Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München D-8050 Freising-Weihenstephan, Germany

(Received 27 February 1976)

**Key Word Index**—*Humulus lupulus*; hop bitter compounds; biosynthesis; mevalonate.

**Abstract**—Labeled mevalonate is incorporated into terpenes and hop bitter compounds by *Humulus lupulus*. The role of mevalonate as a precursor for the prenyl (3-methyl-but-2-enyl) side chain of the hop bitter compounds is discussed.

### EINLEITUNG

Durch den spezifischen Einbau von Isobuttersäure bzw. Isovaleriansäure in Desoxycohumulon, Cohumulon und Colupulon bzw. Desoxyhumulon, Humulon und Lupulon gelang es uns zu zeigen, daß die Acylseitenkette der Hopfenbitterstoffe aus der entsprechenden Carbonsäure entsteht [1]. Bezüglich der Biogenese des Sechsrings der Bitterstoffe konnten wir anhand von Incorporations-Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Essigsäure wahrscheinlich machen, daß Acetateinheiten als Bausteine des Ringes fungieren [2]. Ferner ließen die Ergebnisse dieser Untersuchungen eine Aussage über die ersten Schritte der Biosynthese der Hopfenbitterstoffe zu. Wie vorgeschlagen wurde, beginnt die Biosynthese mit der Kondensation der die Acylseitenkette bildenden Carbonsäure mit Essigsäure.

Als dritter und letzter Strukturbaustein der Hopfenbitterstoffe ist die terpenoide 3-Methylbuten-2-yl-Seitenkette anzusehen (Abb. 1).

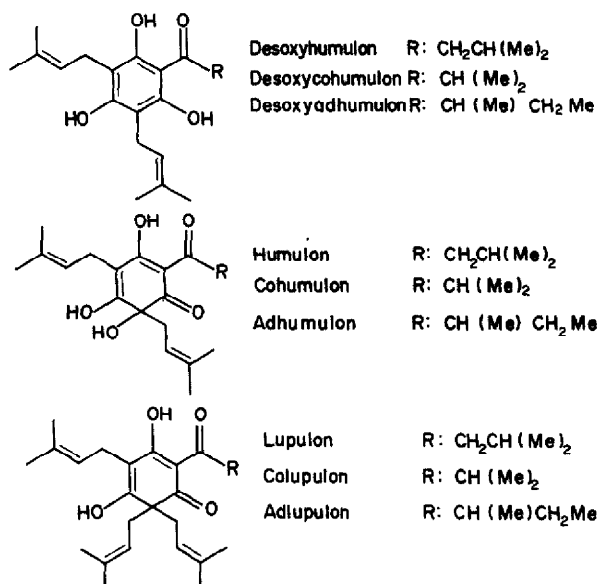


Abb. 1.

\* 5. Mitteilung in der Serie "Über die Biosynthese der Hopfenbitterstoffe. 4. Mitteilung Drawert, F. und Beier, J. (1974) *Phytochemistry* 13, 2749.

Im Folgenden können wir den Nachweis führen, daß Mevalonsäure, die als Precursor für terpenoide Verbindungen fungiert, in Hopfenbitterstoffe incorporiert wird.

### ERGEBNISSE

$^{14}\text{C}$ -markiertes Mevalonsäurelacton wurde nach der üblichen Methode doldentragenden Hopfentrieben appliziert [3]. Die Aufarbeitung, Methanolextraktion, Pentanextraktion, Herstellung der Trimethylsilylderivative und die Reaktions-Radio-Gaschromatographie erfolgte nach von uns bereits beschriebenen Verfahren [3].

Der Einbau von  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -DL-Mevalonsäurelacton erfolgte bei zwei Versuchen unter achttündiger Sonneneinstrahlung (Versuch 1 und 2) (Tab. 1). Im Versuch 3 wurde der Hopfentrieb nach zehnstündiger Sonneneinstrahlung weitere 14 Stunden mit Quecksilberdampflampen bestrahlt (Langzeitversuch). Der vierte Versuch ist ein Dunkelversuch (4), bei dem sich der Hopfentrieb während der gesamten Applikationsdauer von 12 Stunden im Dunkeln befand.

Die Auswertung der Methanol-Extrakte (Tab. 2) von Versuch 1 und 2 ergibt, daß die Summe der in Mevalonsäurelacton plus Mevalonsäure enthaltenen Aktivität ca 25% der angebotenen Aktivität darstellt.  $^{14}\text{C}$ -markiertes DL-Mevalonsäurelacton wird mit jeweils knapp 6% in Squalen incorporiert. In  $\beta$ -Sitosterin sind je ca 1% der angebotenen Aktivität eingebaut worden. Unter 0,5% der Aktivität finden wir in Colupulon.

Tabelle 1. Applikation von  $^{14}\text{C}$ -DL-Mevalonsäurelacton

Versuch	DL-Mevalonsäurelacton	Spezifische Aktivität ( $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$ )	Aufgenommene Aktivität ( $\mu\text{Ci}$ )	Versuchsdauer Versuchsbedingungen
1.	$2\text{-}^{14}\text{C}$	7.1	125	8 Std. Sonnenlicht
2.	$2\text{-}^{14}\text{C}$	7.1	125	8 Std. Sonnenlicht
3.	$5\text{-}^{14}\text{C}$	10	100	10 Std. Sonnenlicht 14 Std. Bestrahlung m. Hg-Lampen
4.	$5\text{-}^{14}\text{C}$	10	53	12 Std. Dunkelheit

Tabelle 2. Einbau von  $^{14}\text{C}$ -DL-Mevalonsäurelacton in Hopfeninhaltsstoffe. Reaktions-Radio-Gaschromatographie des Methanol-Extraktes

Verbindung	Einbau (%)			
	Versuch			
	1	2	3	4
Essigsäure	—	<0,5	—	—
Mevalonsäurelacton <sup>1</sup>	9,5	6,2	<0,5	<0,5
*	—	—	—	<0,5
Mevalonsäure	15,8	18,7	35,1	30,3
*	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
*	—	—	—	<0,5
Co-X	—	—	—	<0,5
Colupulon	<0,5	<0,5	—	—
Squalen	5,7	5,9	1,7	7,0
$\beta$ -Sitosterin	0,8	1,0	6,8	<0,5

1. Mevalonsäurelacton zeigt auf den verwendeten Säulen ein starkes Tailing; —: nicht nachweisbar; \*: nicht identifiziert; Co-X: 1-Isobutyryl-3-(3,3-dimethylallyl)-phloroglucin.

Im Gegensatz dazu zeigt der Langzeit-Versuch ein gänzlich anderes Bild (Versuch 3, Tab. 2). Die 24-stündige Bestrahlung des Hopfentriebes erzeugt eine Erhöhung des Einbaues von Mevalonsäurelacton in  $\beta$ -Sitosterin von ca 1% auf fast 7%. Umgekehrt erfährt der Einbau von Mevalonsäurelacton in Squalen eine Erniedrigung von ca 6% auf 1,7%. Weiterhin finden wir 35% der eingesetzten Aktivität in der Mevalonsäure wieder. Der Nachweis, daß Mevalonsäurelacton in Colupulon eingebaut wurde, gelingt hier nicht.

Das Radiogramm des Dunkelversuches (Versuch 4) weist die größte Anzahl an Radioaktivitäts-Peaks von diesen vier Versuchen auf. Mevalonsäure enthält 30,3% der eingesetzten Aktivität und Squalen 7%. Der Einbau von Mevalonsäure in  $\beta$ -Sitosterin ist auf weniger als 0,5% abgesunken. Drei in den Hellversuchen nicht vorhandene Aktivitäts-Peaks erscheinen auf dem Radiogramm des Dunkelversuches, deren Aktivitäten ebenfalls unter 0,5% liegen. Eine dieser Verbindungen identifizierten wir gaschromatographisch als 1-Isobutyryl-3-(3,3-dimethylallyl)-phloroglucin (Co-X).

In den Pentan-Extrakten der Versuche 1 und 2 (Tab. 3) finden wir für Squalen den höchsten Einbau (5,2% bzw. 5,4%);  $\beta$ -Sitosterin besitzt mit 0,8 bzw. 0,9% den nächst niedrigeren. Folgende Verbindungen bauen Mevalonsäurelacton unter 0,5% ein: Propionsäure, Co-X, 1-Isovaleryl-3-(3,3-dimethyl-allyl)-phloroglucin (X), Desoxycohumulon, Desoxyhumulon, Humulon, Colupulon und Lupulon. Mevalonsäure und Mevalonsäurelacton besitzen zwischen 0,5 und 0,9% der angebotenen Aktivität.

Von den Versuchen 3 und 4 stehen keine Ergebnisse von Pentan-Extrakten zur Verfügung, da 1971 noch keine Pentan-Fraktionierung vorgenommen wurde.

#### DISKUSSION

Aus unseren Einbauversuchen ergab sich, daß Mevalonsäure in folgende Verbindungen eingebaut wird: Desoxycohumulon, Desoxyhumulon, Humulon, Colupulon und Lupulon. Da in jedem Bitterstoffe mindestens

Tabelle 3. Einbau von  $^{14}\text{C}$ -DL-Mevalonsäurelacton in Hopfeninhaltsstoffe. Reaktions-Radio-Gaschromatographie des Pentan-Extraktes

Verbindung	Einbau (%)	
	1	2
Propionsäure	0,5	<0,5
*	0,8	—
Mevalonsäurelacton	0,5	0,9
Mevalonsäure	0,5	0,7
*	<0,5	<0,5
Co-X	<0,5	<0,5
X	<0,5	<0,5
Desoxycohumulon	<0,5	<0,5
Desoxyhumulon	<0,5	<0,5
Humulon	<0,5	<0,5
Colupulon	<0,5	<0,5
Lupulon	<0,5	<0,5
Squalen	5,2	5,4
*	<0,5	<0,5
$\beta$ -Sitosterin	0,8	0,9
*	<0,5	<0,5
*	<0,5	<0,5

Co-X: 1-Isobutyryl-3-(3,3-dimethylallyl)-phloroglucin; X: 1-Isovaleryl-3-(3,3-dimethylallyl)-phloroglucin; —: nicht nachweisbar; \*: nicht identifiziert.

zwei Prenyl-Seitenketten enthalten sind, läßt sich das Ergebnis als Hinweis für den Einbau des Mevalonsäurelactons in die terpenoide Seitenkette werten. Radioaktives Cohumulon konnten wir nicht nachweisen, da sich ein Teil des Cohumulons dem Nachweis durch Verharzung entzieht, wogegen Humulon als radioaktiv markierter Peak nachweisbar ist, da die verwendete Hopfensorte mehr Humulon als Cohumulon enthält [2,4]. Da keine Abbauprodukte von Mevalonsäure in höherer Konzentration zu beobachten waren (Tab. 2 und 3) scheidet die Möglichkeit aus, daß ein Abbauprodukt dieser Verbindung in ein anderes Strukturelement der Bitterstoffe incorporiert wird. Ferner läßt sich feststellen, daß Mevalonsäure bei unseren Untersuchungen fast ausschließlich in terpenoide Verbindungen eingebaut wird (Tab. 2 und 3). Aus diesen Gründen und auch aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit, daß Mevalonsäure als Baustein des Kernes oder der Acylgruppe der Hopfenbitterstoffe in Frage kommt, schlagen wir vor, daß sie als Precursor der 3,3-Dimethylallyl-Seitenkette der Bitterstoffe auftritt.

#### EXPERIMENTELLES

Die Methoden der Applikation, Exposition, Extraktion, Vorfractionierung und Derivatisierung sowie die Reaktions-Radio-Gaschromatographie in einem Allglassystem sind von uns bereits in einer gesonderten Veröffentlichung [3] beschrieben worden.

#### LITERATUR

1. Drawert, F. und Beier J. (1974) *Phytochemistry* 13, 2149.
2. Drawert F. und Beier J. (1974) *Phytochemistry* 13, 2749.
3. Drawert, F. und Beier, J. (1974) *Chromatographia* 7, 273.
4. Howard, G. A. und Tatchell, A. R. (1957) *J. Inst. Brew.* 63, 138.