

GIBBERELLINE—XLVI¹

SYNTHESE VON GIBBERELLIN-AMINOSÄURE-KONJUGATEN

G. ADAM,* M. LISCHIEWSKI, F.-J. SYCH und A. ULRICH

Institut für Biochemie der Pflanzen des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Akademie der Wissenschaften der DDR, Halle/Saale, DDR

(Received in Germany 6 February 1976; Received in the UK for publication 10 June 1976)

Abstract—The synthesis of a new type of nitrogen-containing gibberellin conjugates with amide-like linked amino acid at the 7-carboxylic function of a gibberellin via the following two methods has been reported: Aminolysis of a gibberellin anhydride with esters of amino acids followed by demethylation with lithium-*n*-propyl-mercaptide as well as a direct fission of the anhydride with alkali salts of amino acids leads to the desired conjugates whose structures have been established on the basis of IR, ¹H NMR and MS data.

Phytohormone vom Gibberellin-Typ treten in Pflanzen sowohl frei als auch kovalent an andere Moleküle niederen Molekulargewichts gebunden als Konjugate auf, denen wachsendes biologisches Interesse zukommt. Neben O(3)-Acetyl-gibberellin A₃² wurden bisher vor allem zwei Konjugattypen isoliert, in denen β-D-Glucose entweder glycosidisch als O-β-D-Glucopyranosid oder esterartig über die 7-Carboxyl-Gruppe mit dem Phytohormon verknüpft ist.³⁻⁵

Ein schwefelhaltiges Gibberellin-Konjugat stellt die 1974 von einer japanischen Arbeitsgruppe aus Pharbitis nil gewonnene "Pharbitic acid" dar,⁶ deren Struktur formal durch Addition von Mercaptobrenztraubensäure an dehydriertes Gibberellin A₃ abgeleitet werden kann. Weiterhin isolierten Nadeau und Rappaport ein amphoterer Gibberellin-A₁-Konjugat mit Peptid-seitenkette, dessen vollständiger Strukturbeweis noch aussteht.⁷ Nachfolger berichten wir über die Synthese eines neuen stickstoffhaltigen Konjugattyps von physiologischem Interesse,⁴ der durch eine peptidartige Verknüpfung der 7-Carboxyl-Gruppe von Gibberellinen mit einer Aminosäure bzw. dem Dipeptid Glycylglycin gekennzeichnet ist.⁸ Der Aufbau solcher Verbindungen wurde in der GA₃- und GA₁-Reihe nach folgenden zwei Verfahren durchgeführt:

Entsprechend unseren früheren, mit Aminen erhaltenen Befunden⁹ liessen sich sowohl GA₃-anhydrid 1¹⁰ als auch sein GA₁-Analogon 2⁹ mit entsprechenden Aminosäuremethylestern in absolutem Pyridin oder cyclischen Äthern glatt bei Raumtemp. aminolysieren, wobei nach Trennung vom gleichzeitig entstandenen GA₃ bzw. GA₁ und SiO₂-Chromatographie die methylierten Konjugate 3a–14a gewonnen wurden. Alle Verbindungen zeigen im Kationen- und Anionen-Massenspektrum die erwarteten Molpeaks (M⁺ bzw. M⁻). Die vorliegenden Funktionen wurden durch IR-Daten gesichert; entsprechende Banden (Nujol) liegen z.B. im N-Gibberellin-A₃-oyl-L-leucinmethylester (6a) bei 3400 (breit, OH), 3345, 3070 (Amid-NH), 1750 (γ-Lacton), 1725 (Estercarbonyl), 1660 und 1545 cm⁻¹ (sek. Amid). Eine sowohl unter basischen Bedingungen als auch protonenkatalysiert im A-Ring des Gibberellin-A₃-Systems leicht stattfindende Allylumlagerung zum Δ⁽¹⁰⁾-19→2-Lacton¹¹ konnte durch ¹H-NMR-spektroskopische Befunde ausgeschlossen werden, wobei in allen Fällen das für eine unveränderte 3β-Hydroxy-Δ¹⁹-19→10-Lacton-Partialstruktur charakteris-

tische AMX-Kopplungsmuster für die Protonen an C-1, 2 und 3 auftritt. Entsprechende Signale erscheinen z.B. im Spektrum von N-Gibberellin-A₃-oyl-L-glycin-methylester (3a) bei δ 6.40 (d, J = 9 Hz; 1-H), 6.10 (dd, J = 9 Hz; J' = 3.5 Hz; 2-H) und 4.48 ppm (d, J = 3.5 Hz; 3-H). Weitere wichtige NMR-Daten von 3a–13a sind in Tabelle 1 angegeben.

Eine schonende Überführung in die entsprechenden freien Gibberellinoyl-aminosäuren gelang ausgehend von 3a–10a bzw. 14a nach Bartlett und Johnson¹² durch Umsetzung mit Lithium-*n*-propyl-mercaptid in Hexamethylphosphorsäuretriämid bei Raumtemp. Anschliessende SiO₂-Chromatographie ergab die gewünschten Gibberellinoyl-aminosäuren 3b–10b bzw. 14b in mässigen Ausbeuten. Dagegen liessen sich die freien Konjugate von L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure 12b bzw. 13b nicht nach diesem Verfahren aus ihren Methylestern gewinnen.

Als präparativ vorteilhafter erwies sich eine zweite Darstellungsmethode, nach der das Anhydrid 1 direkt mit dem Natriumsalz von Aminosäuren bzw. Glycylglycin, im Falle von Glycin und L-Prolin auch mit deren Lithiumsalzen bei Raumtemp. umgesetzt wurde. Saure Aufarbeitung und SiO₂-Chromatographie lieferte die freien Konjugate 3b–5b und 8b–10b, die sich in allen Eigenschaften mit den durch Esteraminolyse und anschliessende Entmethylierung erhaltenen Produkten als identisch erwiesen. Analog verlief die entsprechende Umsetzung ausgehend von GA₁-anhydrid 2 zu 14b, 15 und 16.

Weiterhin wurden die GA₃-Konjugate von D-Alanin, L-Tyrosin und L-Asparaginsäure 4c, 11b und 12b nach diesem Verfahren erhalten. Diazomethan-Methylierung der Carbonsäuren 3b–10b, 12b und 14b ergab nahezu quantitativ wieder die entsprechenden Methylester 3a–10a, 12a und 14a. Gibberellin-A₃-oyl-L-tyrosin (11b) liefert hierbei unter gleichzeitiger Verätherung der phenolischen OH-Gruppe Gibberellin-A₃-oyl(*p*-methoxy)-L-phenylalanin-methylester (17).

Die freien Konjugate sind aus Methanol/Essigsäureäthylester feinkristallin anfallende, in Wasser und Methanol leicht lösliche Verbindungen, die sich oberhalb 200° zersetzen und deren Kristallisationsvermögen im Vergleich sowohl zu ihren Estern als auch zu den unkonjugierten Phytohormonen GA₃ und GA₁ deutlich herabgesetzt ist. Die IR-, ¹H-NMR- und massenspektroskopischen Daten stehen im Einklang

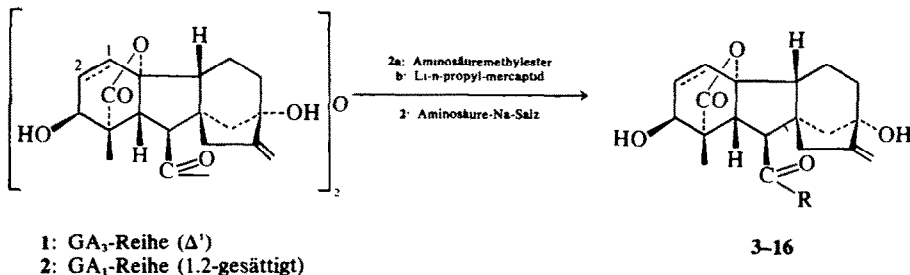
Tabelle I. Physikalische Daten der dargestellten Gibberellin-Aminosäure-Konjugate 1-16

Verbindung R GA ₃ -REIHE	Bruttoformel, MS (M ⁺ und M)	F °C	[α] _D ²⁰ (c)	Ausb. %	R _{9a}	1-H	2-H	3-H	NMR, δ ppm (Hz) 17-H ₂ 5-H 6-H 18-H ₃ OCH ₃ NH	
3a Gly-OCH ₃	C ₂₂ H ₂₇ NO ₇ (417)	206-208	+85.0 (0.27)	50 ^a	0.99 ^a	6.40 ^a (d, 9)	6.10(dd, 9u.3.5)	4.48 (d, 3.5)	5.56m (d, 10) 4.00 (d, 10) 3.22 (d, 10) 1.79 (s)	3.56 (t, 6) 9.47 ^a (t, 6) 8.37
3b Gly-OH	C ₂₁ H ₂₅ NO ₇ (341) ^a	ab 235 (Z)	+36.9 (0.35)	41 ^a	0.45 ^a	6.61 ^a (d, 9.5)	6.08(dd, 9.5u.3.5)	4.48 (d, 3.5)	5.04m (d, 10) 3.43 (d, 10) 2.97 (d, 10) 1.40 (s)	8.37 (t, 6) 9.42 (d, 7)
4a L-Ala-OCH ₃	C ₂₃ H ₂₉ NO ₇ (431) ^a	127u. 153-157	+68.4 (0.21)	68 ^a	0.99 ^a	6.41 ^a (d, 9)	6.12(dd, 9u.3.5)	4.52 (d, 3.5)	5.56m (d, 11) 3.99 (d, 11) 1.77 (s)	3.59 (d, 7) 8.21 ^a (d, 8)
4b L-Ala-OH	C ₂₂ H ₂₇ NO ₇ (417) ^a	ab 260 (Z)	+66.0 (0.29)	21 ^a	0.92 ^a	6.62 ^a (d, 9.5)	6.08(dd, 9.5u.3.5)	4.16 (d, 3.5)	5.37m (d, 10) 3.43 (d, 10) 1.40 (s)	— (d, 8) 8.19 ^a (d, 8)
4c D-Ala-OH	C ₂₂ H ₂₇ NO ₇ (417) ^a	ab 260 (Z)	+46.6 (0.27)	—	0.92 ^a	6.60 ^a (d, 9.5)	6.06(dd, 9.5u.3.5)	4.14 (d, 3.5)	5.35m (d, 10) 3.99 (d, 10) 1.38 (s)	— (d, 8) 8.19 ^a (d, 8)
5a L-Val-OCH ₃	C ₂₃ H ₃₁ NO ₇ (459)	193-194	+44.5 (0.38)	63 ^a	0.84 ^a	6.35 ^a (d, 9)	6.06(dd, 9u.3)	4.48 (d, 3.0)	5.46m (d, 10) 3.95 (d, 10) 1.82 (s)	3.61 (d, 8) 8.96 (d, 8)
5b L-Val-OH	C ₂₄ H ₃₁ NO ₇ (473)	134-137	+64.1 (0.23)	40 ^a	0.79 ^a	6.46 ^a (d, 9)	6.16(dd, 9u.3.5)	4.56 (d, 3.5)	5.59m (d, 10) 4.04 (d, 10) 1.84 (s)	3.66 (d, 8) 9.35 (d, 8)
6a L-Leu-OCH ₃	C ₂₅ H ₃₃ NO ₇ (473)	212-216	+58.0 (0.21)	68 ^a	0.97 ^a	6.46 ^a (d, 9)	6.13(dd, 9u.3.5)	4.52 (d, 3.5)	5.04m (d, 10) 4.03 (d, 10) 1.86 (s)	— (d, 8) 9.17 (d, 8)
6b L-Leu-OH	C ₂₄ H ₃₁ NO ₇ (459)	167-171	+68.1 (0.23)	46 ^a	1.04 ^a	6.39 ^a (d, 9)	6.11(dd, 9u.3.5)	4.47 (d, 3.5)	4.91m (d, 10) 3.91 (d, 10) 1.46 (s)	3.63 (d, 8) 9.49 ^a (d, 8)
7a L-Phe-OCH ₃	C ₂₅ H ₃₃ NO ₇ (507)	192-195 u.205-207	+71.9 (0.22)	43 ^a	1.00 ^a	6.41 ^a (d, 9)	6.04(dd, 9u.3.5)	4.47 (d, 3.5)	5.53m (d, 10) 3.17 (d, 10) 1.44 (s)	— (d, 8) 9.16 ^a (d, 8)
7b L-Phe-OH	C ₂₄ H ₃₁ NO ₇ (493) ^b	208-210	+78.0 (0.20)	14 ^a	1.12 ^a	6.31 ^a (d, 9)	6.31 ^a (d, 9)	4.40 (d, 3.5)	5.01m (d, 10) 3.86 (d, 10) 1.79 (s)	3.56 (d, 8) 9.44 (d, 8)
8a L-Ser-OCH ₃	C ₂₃ H ₂₉ NO ₈ (447)	224-226	+67.2 (0.35)	37 ^a	0.55 ^a	6.43 ^a (d, 9)	6.13(dd, 9u.3.5)	4.51 (d, 3.5)	5.56m (d, 10) 4.04 (d, 10) 1.79 (s)	3.56 (d, 8) 9.44 (d, 8)
8b L-Ser-OH	C ₂₂ H ₂₇ NO ₈ (431)	ab 245 (Z)	+39.2 (0.26)	11 ^a	0.28 ^a	6.43 ^a (d, 9)	6.13(dd, 9u.3.5)	4.51 (d, 3.5)	5.03m (d, 10) 3.29 (d, 10) 1.62 (s)	— (d, 8) 9.44 (d, 8)
9a L-Pro-OCH ₃	C ₂₅ H ₃₁ NO ₇ (457)	248-249	+28.8 (0.22)	57 ^a	1.09 ^a	6.50 ^a (d, 9)	6.18(dd, 9u.3.5)	4.57 (d, 3.5)	5.64m (d, 9.5) 3.25 (d, 9.5) 1.35 (s)	3.64 (d, 8) 9.16 ^a (d, 8)
9b L-Pro-OH	C ₂₄ H ₂₉ NO ₇ (443) ^b	ab 238 (Z)	-2.1 (0.23)	26 ^a	0.94 ^a	6.65 ^a (d, 9.5)	6.10(dd, 9.5u.3.5)	4.52 (d, 3.5)	5.39m (d, 10) 3.55 (d, 10) 1.35 (s)	— (d, 8) 9.16 ^a (d, 8)
10a	C ₂₄ H ₂₉ N ₂ O ₈	133-136	+62.1	37 ^a	0.94 ^a	6.46 ^a (d, 9)	6.15(dd, 9u.3.5)	4.52 (d, 3.5)	5.57m (d, 10) 4.14 (d, 10) 1.79 (s)	3.59 (d, 8) 9.39 ^a (d, 8)

Gly-Gly-OCH ₃	474 ^a	(0.39)	0.60 ^a	(d, 9)	9u.3	(d, 3)	5.04m	(d, 10.5)	(d, 10.5)	(s)	(t, 6)
10b	C ₂₃ H ₃₅ N ₂ O ₈	ab 255 (Z.)	18 ^a	6.59 ^a	6.05(dd, 9.5u.3.5)	†	5.33m	3.41	2.93	1.37	8.62 ^a
Gly-Gly-OH	C ₂₀ H ₂₇ NO ₆	164-166	35 ^a	(d, 9.5)	9.5u.3.5)		5.06m	(d, 10)	(d, 10)	(s)	u.7.63
11a	C ₂₀ H ₂₇ NO ₆	523 ^b	53 ^a	6.34 ^a	6.06(dd, 9u.3)	4.43	5.49m	3.92	3.26	1.61	9.32
L-Tyr-OCH ₃	C ₂₈ H ₃₁ NO ₈	ab 225 (Z.)	—	(d, 9)	9u.3)	(d, 3)	4.97m	(d, 10)	(d, 10)	(s)	(d, 8)
11b	C ₂₃ H ₃₁ NO ₆	196-197	37 ^a	6.39 ^a	6.10(dd, 6.39 ^a)	4.49	5.53m	3.95	3.24	1.79	3.48
L-Tyr-OH	(489)	ab 260 (Z.)	—	(d, 9)	9u.3.5)	(d, 3.5)	5.01m	(d, 10)	(d, 10)	(s)	3.58
12a	C ₂₃ H ₂₇ NO ₆	211-213	28 ^a	6.66 ^a	6.11(dd, 9.5u.3.5)	4.51	5.40m	3.47	3.05	1.42	8.30
OCH ₃	C ₂₈ H ₃₃ NO ₈	ab 240	56 ^a	6.41 ^a	6.13(dd, 9u.3.5)	4.51	5.12m	(d, 10)	(d, 10)	(s)	(d, 8)
L-Glu-OCH ₃	(503)	ab 240	—	(d, 9)	9u.3.5)	(d, 3.5)	5.54m	4.00	3.27	1.82	3.53
GA ₁ -Reihe	C ₂₇ H ₂₉ NO ₇	192-196	29 ^a	1.03 ^a	(d, 9)	(d, 3.5)	5.01m	(d, 10)	(d, 10)	(s)	3.60
14a	C ₂₁ H ₂₇ NO ₇	ab 240	48 ^a	0.99 ^a	—	†	5.32m	3.32	2.82	1.29	8.21 ^a
Gly-OCH ₃	C ₂₁ H ₂₇ NO ₇	ab 280	83 ^a	0.45 ^a	—	†	5.05m	(d, 10)	(d, 10)	(s)	(t, 6)
14b	C ₂₄ H ₃₁ NO ₇	ab 280	72 ^a	0.94 ^a	—	†	5.28m	3.29	2.93	1.20	—
Gly-OH	C ₂₃ H ₂₉ N ₂ O ₈	ab 240	6 ^a	0.21 ^a	—	†	4.99m	(d, 9)	(d, 9)	(s)	—
15											
L-Pro-OH											
16											
Gly-Gly-OH											

^aM⁺-CO₂-H₂O. ^bNur M⁺. ^cEin auswertbares Massenspektrum wurde erst nach CH₂N₂-Veresterung erhalten. ^dAminolyse des Anhydrids mit dem Aminosäuremethylester. ^eSpaltung der Methylester nach Lit. 12. ^fAminolyse des Anhydrids mit dem Natriumsalz der Aminosäure. ^g60 MHz ZEISS-Gerät ZKR60 in Pyridin-D₂ gegen TMS als interner Standard. ^h100 MHz VARIAN-Gerät HA 100 in DMSO gegen HMDS als interner Standard. ⁱ100 MHz VARIAN-Gerät HA 100 in Pyridin-D₂ gegen TMS als interner Standard. ^jDurch Hochauflösung gesichert. ^kVerdekt. ^lLediglich NMR-Spektrum des Methylesters vermessene. ^mDurch Mikroelementaranalyse gesichert. ⁿDC: Kieselgel G (Merck) bez. auf GA₁-Methylester = 1: CHCl₃/CH₃OH 9:1. ^o1.43(d, 7 Hz, CH₃-CH₂-). ^p4.30(d, 6 Hz, -NH-CH₂-). ^q7.20 (Aromat). ^rDoppelte Triplets (γ = 6 Hz). ^s4.35 (nicht aufgespalten)(NH-CH₂-). ^t1.52(d, 7 Hz, CH₃-CH₂-). ^u1.51(d, 7 Hz, CH₃-CH₂-). ^v4.48 und 4.26(d, 6 Hz, -NH-CH₂-). ^wDC: Kieselgel G (Merck) bez. auf GA₁ = 1; Laufmittel: Benzol/Eisessig 6:4.

mit den angegebenen Strukturen. Als typisches Beispiel für das IR-Absorptionsverhalten sei Gibberellin - A₃ - oyl - L - phenylalanin (**7b**) mit charakteristischen Banden (Nujol) bei 3555, 3480 (OH), 3365 (Amid-NH), 1760 (γ -Lacton), 1730 (COOH), 1650, 1550 (sek. Amid), 1615 und 1502 cm⁻¹ (aromat.) angeführt. Die ¹H-NMR-Spektren weisen nach Lage, Anzahl und Intensität die erwarteten Signale auf (vgl. Tabelle 1).



Die Massenspektren von **3-16** zeigen das für Gibberelline typische Fragmentierungsmuster,¹³ überlagert von einem Abbau der peptidartigen 7-Seitenkette. Im Gegensatz zu den entsprechenden Methylestern **3a-14a** liefern die freien Konjugate **3b-14b** sowie **15** wegen ihrer schwereren Verdampfbarkeit bei positiver und teilweise auch bei negativer Ionisierung¹⁴ keine Molpeaks. Stattdessen tritt als Spitze höchster Massenzahl ein M⁺-62-Peak auf, der auch bei den Estern als Base-peak erscheint und auf eine bevorzugte Eliminierung von CO₂ und H₂O unter Ring-A-Aromatisierung (GA₃-Reihe) zurückzuführen ist. Die hochpolaren Konjugate von L-Asparaginsäure, L-Serin und L-Tyrosin **12b**, **8b**, und **11b** gaben ebenso wie Verbindung **5b** und **16** erst nach Rückmethylierung zu ihren Estern brauchbare Massenspektren. Abb. 1 zeigt als Beispiel das Kationenspektrum und Fragmentierungsschema des Glycyl-glycin-Konjugats **10b**, wobei die Bruttozusammensetzung der Schlüsselfragmente durch Hochauflösung gesichert wurde. Der ausgehend vom Fragmentation *m/e* 398 (M⁺-62) erfolgende stufenweise Abbau der Peptidseitenkette gemäss 398 → 380 → 352 → 323 → 295 → 266 → 238 entspricht dem massenspektrometrischen Verhalten von Peptiden.¹⁵ Ein paralleler Spaltungsmechanismus führt ausgehend von einem zweiten Ion der Massenzahl 380, das aus *m/e* 398 durch Wassereliminierung im C-Ring entsteht, entsprechend 380 → 362 → 334 → 305 → 277 → 248 zum Fragmentation *m/e* 220, das auch aus *m/e* 238 durch nachträglichen H₂O-Verlust im Ring C gebildet werden kann. Weiterhin ist eine direkte Herausspaltung von Formaldimin und CO aus dem Fragmentation *m/e* 398 unter Bildung von *m/e* 341 zu beobachten, die über einen 5-Ring-Mechanismus (vgl. unten) verlaufen dürfte. Anschliessende Wassereliminierung zu *m/e* 323 führt wieder zum Hauptfragmentierungsweg.

Über die wachstumsregulatorischen Eigenschaften der Gibberellin-Aminosäure-Konjugate wird an anderer Stelle berichtet.¹⁶

EXPERIMENTELLER TEIL

Die korrigierten Schmelzpunkte wurden auf einem Mikroheiztisch nach BOETIUS bestimmt. Die spezif. Drehungen sind in Äthanol gemessen. Die IR-Spektren wurden mit dem Zeiss-

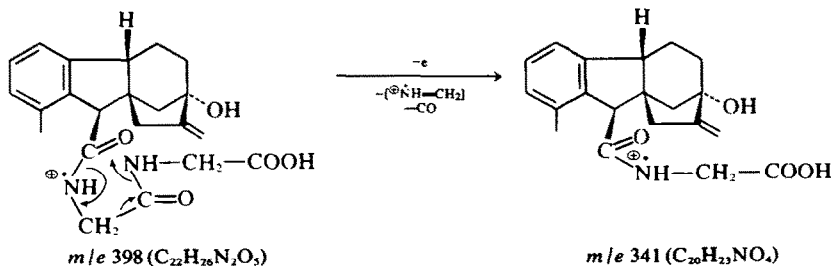
Zweistrahlspektrophotometer UR 10 in Nujol, die Kationen- und Anionen-Massenspektren mit einem Elektronenanlagerungs-Massenspektrographen des Forschungsinstituts M. v. Ardenne, Dresden, aufgenommen. Die Verdampfungstemperaturen (T_v) lagen im Falle der methylierten Konjugate zwischen 80-120°, bei den freien Konjugaten zwischen 100-120°. Die hochaufgelösten Massenspektren wurden mit einem AEI-Gerät MS 902 S bei T_v 260° erhalten.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der methylierten Gibberellin-Aminosäure-Konjugate

(a) Durch Umsetzung der Anhydride **1** bzw. **2** mit Aminosäuremethylestern zu **3a-14a**. Zu 1 mMol Gibberellinanhydrid **1** bzw. **2** (675 bzw. 679 mg) in 10 ml abs. THF gibt man bei Raumtemp. eine Mischung aus 2.8 mMol Aminosäure-methylester-hydrochlorid¹⁷ und 2.5 mMol Triäthylamin in 2 ml abs. THF. Nach 30 Min. wird *i. Vak.* eingeeengt und der verbleibende Rückstand mit Essigsäureäthylester versetzt. Extraktion mit verd. HCl und ges. NaHCO₃-Lösung ergibt nach dem Trocknen und Einengen der organischen Phase rohen Gibberellin - oyl - aminosäure-methylester, der an der doppelten Gewichtsmenge Celite gebunden am 100 fachen Überschuss Kieselgel Woelm (zur Verteilungs-chromatographie) gereinigt wird (Fraktionen zu 30 ml). Bei Elution mit Chloroform und steigenden Volumenanteilen Essigsäureäthylester werden die methylierten Konjugate **3a-14a** mit Chloroform/Essigsäureäthylester 7:3 bzw. 6:4 v/v gewonnen und aus Essigsäureäthylester/n-Hexan umkristallisiert (vgl. Tabelle 1). Durch Ansäuern der NaHCO₃-Lösung und Extraktion mit Essigsäureäthylester wird GA₃ in 70-80-proz. Ausb. isoliert.

(b) Durch Veresterung der freien Gibberellin - Aminosäure - Konjugate **3b-10b**, **12b** und **14b** mit Diazomethan. Zu 0.1 mMol des Gibberellin - Aminosäure - Konjugats in 50 ml Methanol gibt man überschüssige ätherische Diazomethan-Lösung und lässt 3 h bei Raumtemp. stehen. Einengen *i. Vak.* liefert nach Kristallisation aus Essigsäureäthylester/n-Hexan nahezu quantitativ die Ester **3a-10a**, **12a** und **14a**, die in allen Eigenschaften (Misch-F., spezif. Drehung, R_s, IR, NMR) identisch mit den nach Methode a) dargestellten Verbindungen sind.

Gibberellin - A₃ - oyl - (p - methoxy) - phenylalanin -



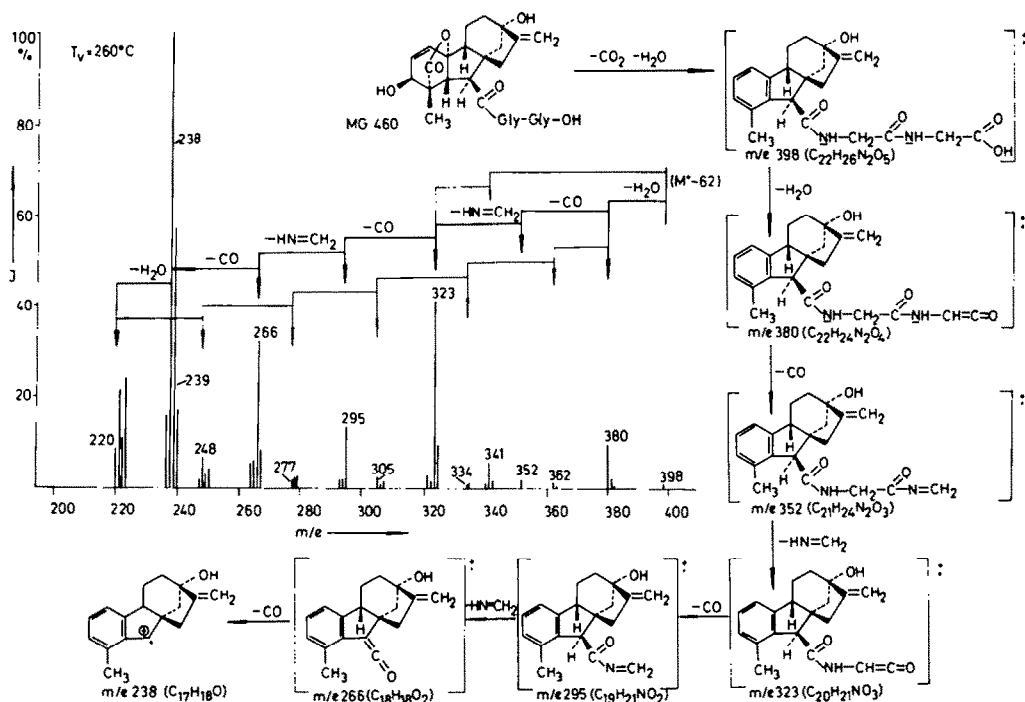


Abb. 1. Kationen-Massenspektrum und Fragmentierungsschema von Gibberellin- A_3 -oyl-glycyl-glycin (10b).

methylester (17). 48 stdg. Umsetzung von 0.1 mMol Gibberellin - A_3 - oyl - L - tyrosin (11b) mit überschüssiger ätherischer Diazomethan-Lösung bei Raumtemp. liefert nach Einengen *i. Vak.* und Kristallisation aus Essigsäureäthylester/n-Hexan nahezu quantitativ 17 vom F. 173–176° und $[\alpha]_D^{25} + 34.5^\circ$ ($c = 0.32$); MS (negative Ionisierung): m/e 537 (M⁻); IR: 3360 (breit, OH), 1755 (γ -Lacton), 1745 (Estercarbonyl), 1660 und 1555 (sek. Amid), 1250 cm^{-1} (CH_3-O).

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der freien Gibberellin-Aminosäure-Konjugate

(a) *Durch Entmethylierung von 3a–10a sowie 14a.* Zu 1 mMol Gibberellin - oyl - aminosäure - methylester in 3 ml HMPT, gibt man bei Raumtemp. unter Argon 6 ml einer filtrierten Lösung von Lithium - n - propyl - mercaptan, dargestellt aus 2 ml n-Propylmercaptan, 600 mg LiH und 20 ml trockenem, sauerstofffreien HMPT. Nach 2 h wird die Mischung in Eiswasser gegossen, mit verd. HCl angesäuert und mehrfach mit Essigsäureäthylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und ges. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Ansäuern der wässrigen Phase mit 2n HCl, mehrfache Extraktion mit Essigsäureäthylester, Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 und Einengen *i. Vak.* liefert rohe Gibberellin - oyl - aminosäure, die an der doppelten Gewichtsmenge Celite gebunden am 100 fachen Überschuss Kieselgel Woelm (zur Verteilungschromatographie) chromatographiert wird (Fraktionen zu 30 ml). Bei Elution mit Chloroform, Chloroform + steigendem Essigsäureäthylesteranteil, Essigsäureäthylester und Essigsäureäthylester + steigendem Methanolanteil wird mit Essigsäureäthylester/Methanol 8:2 v/v das Gibberellin - Aminosäure - Konjugat gewonnen und aus Methanol/Essigsäureäthylester umkristallisiert (vgl. Tabelle 1).

(b) *Durch Aminolyse der Anhydride 1 bzw. 2 mit Natriumsalzen von Aminosäuren zu 3b–5b, 4c, 8b–12b, 14b, 15 und 16.* Zu 1 mMol 1 bzw. 2 (675 bzw. 679 mg) in 10 ml abs. THF gibt man 2.8 mMol einer Aminosäure in 6 ml ges. $NaHCO_3$. Nach 1 stdg. Rühren bei Raumtemp. wird *i. Vak.* eingengt, der Rückstand mit verd. HCl angesäuert und mit Essigsäureäthylester erschöpfend extrahiert. Das nach Trocknung und Einengen der organischen Phase zurückbleibende Gemisch aus Gibberellin - oyl - aminosäure-Konjugat und Gibberellin A_3 wird an der doppelten Gewichtsmenge Celite gebunden am 100fachen Überschuss

Kieselgel Woelm (zur Verteilungschromatographie) chromatographiert (Fraktionen zu 60 ml). Bei Elution wie unter (a) angegeben wird mit Chloroform/Essigsäureäthylester 4:6 und 2:8 v/v zuerst GA_3 bzw. GA_4 erhalten. Elution mit Essigsäureäthylester/Methanol 8:2 v/v liefert das Gibberellin - Aminosäure - Konjugat, welches sich nach Kristallisation aus Methanol/Essigsäureäthylester in allen physikalischen Eigenschaften mit dem entsprechenden nach Methode (a) gewonnen Produkt als identisch erweist.

(c) *Durch Aminolyse des Anhydrids 1 mit Lithiumsalzen von Glycin und L-Prolin.* Zu 2.8 mMol Glycin bzw. L-Prolin in 20 ml abs. Methanol gibt man 2.2 mMol LiOCH₃ in abs. CH_3OH . Nach 0.5 stdg. Rühren bei Raumtemp. wird 1 mMol (675 mg) feingepulvertes GA_3 -anhydrid 1 zugesetzt und weitere 0.5 h gerührt. Einengen *i. Vak.*, Aufarbeitung und SiO_2 -Chromatographie wie unter (b) beschrieben liefert die Konjugate 3b und 9b in 45 bzw. 50% Ausb.

Danksagung—Herrn Dr. D. Voigt danken wir für die Aufnahme der Massenspektren und Frau G. Schmidt für experimentelle Mitarbeit; Herrn Dr. P. Franke und Frau U. Roenspiess, FZ für Molekularbiologie und Medizin der AdW der DDR Berlin-Buch, sind wir für die hochaufgelösten Massenspektren und die Mikroelementaranalysen sehr verbunden. Für die 100 MHz-NMR-Spektren danken wir den Herren Dr. A. Zschunke und Dipl.-Phys. H. Meyer, Martin-Luther-Universität Halle.

LITERATUR

- ¹XVL: Mittell. vgl. R. Radeaglia, G. Adam und Ph. D. Hung, *Tetrahedron Letters* 605 (1976).
- ²Zur hier verwendeten Bezifferung des ent-Gibberellin-Grundgerüsts vgl. I. W. Rowe, *The Common and Systematic Nomenclature of Cyclic Diterpenes*, 3rd Revision. Forest Product Laboratory, US Department of Agriculture, Madison, Wisconsin.
- ³Vgl.: J. MacMillan, *Rec. Advanc. Phytochem.* 7, 1 (1974).
- ⁴G. Sembdner, *Proceedings of the International Symposium "Biochemistry and Chemistry of Plant Growth Substances"* in Cottbus (Herausg. K. Schreiber, H. R. Schütte und G. Sembdner) Halle 1974, S. 283.
- ⁵Vgl.: H. N. Krishnamoorthy, *Gibberellins and Plant Growth*, S. 76. Wiley Eastern, New Delhi (1975).

- ⁶T. Yokota, S. Yamazaki, N. Takahashi und Y. Iitaka, *Tetrahedron Letters* 2957 (1974).
- ⁷R. Nadeau und L. Rappaport, *Plant Physiol.* **54**, 809 (1974).
- ⁸Bei Auxinen ist ein natives Konjugat bekannt, in dem Indolylessigsäure amidartig an Asparaginsäure gebunden vorliegt; vgl. W. A. Andreae und N. E. Good, *Plant Physiology* **30**, 380 (1955); R. C. Mollan, D. M. X. Donnelly und M. A. Harvey, *Phytochemistry* **11**, 1485 (1972).
- ⁹G. Adam, M. Lischewski, F.-J. Sych und A. Ulrich, *J. Prakt. Chem.* **318**, 105 (1976).
- ¹⁰J. MacMillan und J. S. Moffat, *J. Chem. Soc.* 4727 (1962).
- ¹¹Vgl.: B. E. Cross, J. F. Grove und A. Morrison, *Ibid.* 2498 (1961).
- ¹²P. A. Bartlett und W. S. Johnson, *Tetrahedron Letters* 4459 (1970).
- ¹³Zur Kationen-Massenspektroskopie von Gibberellinen vgl. N. S. Wolfson, V. I. Zaretskii, I. B. Papernaja, E. P. Serebryakov und V. F. Kucherov, *Ibid.* 4209 (1965); N. Takahashi, N. Murofushi, S. Tamura, N. Wasada, H. Hoshino, T. Tsuchiya, S.-I. Sasaki, T. Aoyama und E. Watanabe, *Org. Mass. Spectrometry* **2**, 711 (1969); D. Voigt, G. Adam, J. Schmidt und K. Schreiber, *Org. Massspektrom.* im Druck.
- ¹⁴Zur Methodik vgl. M. von Ardenne, K. Steinfeld und R. Tümmeler, *Elektronenanlagerungs - Massenspektrographie organischer Substanzen*. Springer-Verlag, Berlin (1971).
- ¹⁵Vgl.: G. Spiteller, *Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen*, S. 225. Verlag Chemie, Weinheim (Bergstr.) (1966).
- ¹⁶Vgl.: G. Sembdner, G. Adam, M. Lischewski, F.-J. Sych, C. Schulze, D. Knöfel, P. Müller, G. Schneider, H. W. Liebisch und K. Schreiber, *Plant Growth Substances*, S. 349. Hirokawa Publ. Comp., Tokyo (1974).
- ¹⁷Vgl.: Houben-Weyl, *Methoden der organischen Chemie*, Bd. 11/2, S. 355. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1958).