

Enzymatischer Abbau von [Ring B-U-¹⁴C]-5.7.3'.4'-Tetrahydroxyflavanon-7-O-glucosid zu 5.7-Dihydroxychromon-7-O-glucosid und [Ring-U-¹⁴C]-1.2.4-Trihydroxybenzol mit einem zellfreien Extrakt von *Mentha longifolia*

Enzymatic Degradation of [Ring B-U-¹⁴C]-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone-7-O-glucoside to 5,7-Dihydroxychromone-7-O-glucoside and [Ring-U-¹⁴C]-1,2,4-trihydroxybenzene with a Cell Free System from *Mentha longifolia*

Boris Janistyn und Martha Stocker

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg/Brsg.

(Z. Naturforsch., 31 c, 408–410 [1976] ; eingegangen am 12. April 1976)

Flavanone Degradation, [Ring B-U-¹⁴C]-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanon-7-O-glucoside, Chromone Formation

[Ring B-U-¹⁴C]-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone-7-O-glucoside could be synthesized and a new way of flavanone-degradation is demonstrated. The B-ring is split off under formation of 5,7-dihydroxychromone-7-O-glucoside and [ring-U-¹⁴C]-1,2,4-trihydroxybenzene.

Wie bereits berichtet, wurde aus *Mentha longifolia* Huds. ein Chromon isoliert, welches als 5.7-Dihydroxychromon-7-O-rutinosid identifiziert werden konnte¹. Die Struktur des Aglykons konnte synthetisch bestätigt werden².

Untersuchungen über die Genese dieser Verbindung³ zeigten, daß aus gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial kein Chromon-7-O-rutinosid zu isolieren war. Aus warmluftgetrocknetem Pflanzenmaterial hingegen konnte 5.7-Dihydroxychromon-7-O-rutinosid gewonnen werden. Somit war eine postmortale enzymatische Chrombildung sehr wahrscheinlich. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß in dem Maße, wie der 5.7.3'.4'-Tetrahydroxyflavanon-7-O-rutinosidgehalt abnahm, der 5.7-Dihydroxychromon-7-O-rutinosidgehalt anstieg³.

Dieser Befund fand eine weitere Bestätigung darin, daß in *Mentha spicata* und *Mentha rotundifolia*, welche nur geringste Mengen an 5.7.3'.4'-Tetrahydroxyflavanon-7-O-rutinosid enthielten, auch nach Warmluftbehandlung kein 5.7-Dihydroxychromon-7-O-rutinosid nachzuweisen war⁴.

Auch *in vitro* gelang es, 5.7.3'.4'-Tetrahydroxyflavanon-7-O-rutinosid mittels einer Rohenzympräparation aus *M. longifolia* zu 5.7-Dihydroxychromon-7-O-rutinosid abzubauen³. Danach kann offensichtlich unter C–C-Spaltung der 3'.4'-Dihydroxy-

benzolring (B-ring) vom 5.7.3'.4'-Tetrahydroxyflavanon-7-O-rutinosid unter Bildung von 5.7-Dihydroxychromon-7-O-rutinosid getrennt werden.

Nachdem das Auftreten von 5.7-Dihydroxychromon-7-O-rutinosid gesichert war³, galt unser Interesse dem Verbleib des B-Ringes. Hierzu wurde [Ring B-U-¹⁴C]-5.7.3'.4'-tetrahydroxyflavanon-7-O-glucosid (4) synthetisiert und dem enzymatischen Abbau *in vitro* unterworfen.

Ergebnisse

Synthese von [Ring B-U-¹⁴C]-5.7.3'.4'-tetrahydroxyflavanon-7-O-glucosid: Von [U-¹⁴C]-Phenol (50 µCi) ausgehend, wurde durch Wasserstoffperoxidation [U-¹⁴C]-1.2-Dihydroxybenzol (1) erhalten⁵, welches sich nach Reimer-Thiemann⁶ (andere Formylierungsreaktionen verliefen schlechter) zum [Ring U-¹⁴C]-3.4-dihydroxybenzaldehyd (2) umsetzen ließ. Die Kondensation von 2 mit Tetraacetylphloracetophenon-4-glucosid zu 3.4.2'.4'.6'-Pentahydroxychalcon-4-O-glucosid (3) wurde nach Zemplén *et al.*⁷ durchgeführt. Durch vorsichtige Säurebehandlung ließ sich 3 zu 4 cyclisieren und bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität reinigen (Tab. I).

Abbauversuche mit einer Rohenzympräparation aus *M. longifolia*³ ergaben ein in Äther unlösliches ¹⁴C-aktives Polymerisat und eine aus Äther mit Natronlauge ausschüttelbare ¹⁴C-aktive Substanz.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Boris Janistyn, Institut für Pharmazeutische Biologie, Schänzlestr. 9/11, D-7800 Freiburg/Brsg.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. I. Reinigung des synthetisierten [Ring B- $U^{14}C$]-5.7.3'.4'-tetrahydroxyflavanon-7-O-glucosid (**4**) bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität durch fraktionierte Kristallisation aus Methanol.

Substanz	Zahl der Kristallisationen	Substanzmenge [mg]	Gesamtaktivität [cpm] $\times 10^4$	Spezifische Radioaktivität [cpm/mg] $\times 10^3$
4	1	32	25	1,8
4	2	20	12	6,1
4	3	15,4	10	6,6
4	4	12,2	8,2	6,7
4	5	10,3	7,4	7,1

Tab. II. Reinigung von [Ring $U^{14}C$]-1.2.4-triacetoxybenzol (**5**) bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität durch Sublimation (S). Dünnschichtchromatographie (DC) an Kieselgel mit den Fließmitteln L_1 und L_2 .

Substanz	Reinigungsschritte	Substanzmenge [mg]	Gesamtaktivität [cpm]	Spezifische Radioaktivität [cpm/mg]
5	S	5,1	3050	600
5	DC/ L_1	4,3	2500	580
5	DC/ L_2	3,7	2100	570
5	S	3,1	1750	570

DC-Chromatogramme lieferten den Hinweis auf 1.2.4-Trihydroxybenzol. Nach Peracetylierung und mehrfachen Reinigungsschritten konnte die Substanz als 1.2.4-Triacetoxybenzol identifiziert und bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität gereinigt werden (Tab. II).

Diskussion

Während sich als besonderes Merkmal bisheriger Untersuchungen ergab, daß beim Katabolismus von Chalconen, Auronen, Flavanonen und Flavonolen die B-Ringe der Flavonoide in entsprechend substituierte Benzoesäuren überführt werden^{8,9}, muß aus den vorliegenden Ergebnissen auf einen neuen Flavanonabbauweg geschlossen werden. Somit wird die Hypothese^{3,10,11} gestützt, daß Flavane auch über chinoide Zwischenstufen unter oxidativer C – C-Spaltung den B-Ring direkt verlieren können.

Die schon öfters beobachteten Polymerisationsreaktionen⁹ wurden auch von uns festgestellt. Die relativ hohe ^{14}C -Aktivität des Polymerisates gegenüber **5** weist auf die bekannt leichte Oxidierbarkeit von 1.2.4-Trihydroxybenzol unter Bildung von „ligninartigen“ Polymerisationsprodukten¹² hin.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte wurden mit dem Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt und sind korrigiert. UV-Spektren

wurden mit dem Beckman DB-Spektralphotometer und IR-Spektrum mit dem Perkin Elmer Spektrophotometer Modell 257 aufgenommen. Die Chemikalien stammten von den Firmen E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Fluka (Neu-Ulm). [$U^{14}C$]-Phenol wurde vom Radiochemical Centre Amersham bezogen.

Synthese von [$U^{14}C$]-1.2-Dihydroxybenzol (**1**)⁵:

Zu 0,94 g (0,01 M) Phenol wurden 50 μ Ci [$U^{14}C$]-Phenol in 2 ml Eisessig gelöst gegeben. Unter Eiskühlung und Rühren wurden 1,2 g H_2O_2 30% zugetropft. Sodann wurde bis zum Klarwerden der Lösung Eisessig zugegeben. Der Reaktionsansatz blieb verschlossen im Dunkeln bei Raumtemperatur über 72 h stehen. Die Reinigung erfolgte mittels präparativer DC an Kieselgel (Benzol-Dioxan-Eisessig = 9 + 2 + 4 V/V). Die Zone von **1** wurde rasch mit MeOH eluiert, die Lösungsmittel im Hochvakuum mittels Kühlfalle/fl. N_2 kondensiert und **1** sublimiert.

Sublp. 80 °C/0,01 Torr.

Ausbeute: 300 mg (27% d. Th.).

cpm $9,5 \times 10^6$.

Synthese von [Ring $U^{14}C$]-3.4-Dihydroxybenzaldehyd (**2**)⁶:

300 mg (2,7 mmol) [$U^{14}C$]-**1** wurden mit 18 g NaOH 16% und 3 g $CHCl_3$ 5 h am Rückfluß erhitzt. Nach Ansäuern, Ausäthern und Filtrieren wurde 2mal mit je 10 ml Bisulfatlösung 40% ausgeschüttelt. Nach Zugabe von 50 ml H_2SO_4 20% wurde solange auf dem Wasserbad gehalten, bis kein SO_2 mehr entwich. Nach Ausäthern wurde sublimiert.

Sublp. 90 °C/0,02 Torr.

Ausbeute: 100 mg (38% d. Th.).

cpm $4,77 \times 10^6$.

Synthese von [Ring B- $U^{14}C$]-3.4.2'.4'.6'-Pentahydroxychalcon-4-O-glucosid (**3**)⁷:

100 mg **2** wurden mit 304 mg Tetraacetyl-phloracetophenonglucosid umgesetzt.

m.p. 183 – 184 °C; m.p.⁷ 180 – 181 °C.

UV $\frac{CH_3OH}{max} = 382$ nm.

Ausbeute: 132 mg (40% d. Th.).

cpm $1,54 \times 10^6$

Synthese von [Ring B- $U^{14}C$]-5.7.3'.4'-tetrahydroxyflavanon-O-glucosid (**4**):

130 mg **3** wurden unter leichtem Erwärmen in 5 ml 0,1 N HCl gelöst, 15 h bei Raumtemperatur

und weitere 12 h bei 5 °C belassen. Das Kristallisat wurde abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und über P_2O_5 im Hochvakuum getrocknet.

Rohausbeute: 32 mg (24% d. Th.).

4 wurde durch fraktionierte Kristallisation aus Methanol bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität (Tab. I) gereinigt.

m.p. 179–180 °C; m.p.¹³ 176–177 °C.

UV $\overset{CH_3OH}{max} = 285, 374 \text{ nm.}$

Ausbeute: 10,3 mg (13% d. Th.).

cpm $7,4 \times 10^4$.

Enzymatischer Abbau von **4**³:

1,3 mg **4** wurden in 0,13 ml Äthylenglykolmonomethyläther gelöst, mit 2,5 ml Tris-HCl (0,2 M, pH = 7,5) und 0,15 ml Rohenzymlösung versetzt, bei 30 °C inkubiert, nach 18 h eingefroren, gefriergetrocknet, mit MeOH extrahiert, das MeOH abgezogen und der Rückstand mit Äthyläther digeriert. Der unlösliche Anteil wurde im Hochvakuum über

P_2O_5 getrocknet und der Verbrennung¹⁴ unterzogen.

0,3 mg Polymerisat ergaben 2500 cpm. Die Ätherphase wurde mit $NaHCO_3$ -Lösung und 2 N NaOH ausgeschüttelt. Nennenswerte ¹⁴C-Aktivität wurde nur im 2 N NaOH-Auszug gefunden. Nach Ansäuern, Ausäthern und der Reinigung an Kieselgel mit dem Fließmittel L_1 (Toluol-Ameisensäure-Äthylmethylketon = 50 + 40 + 10 V/V) konnte mittels Vergleich 1.2.4-Trihydroxybenzol wahrscheinlich gemacht werden. Nach Peracetylierung¹⁵, Trägersubstanzzugabe 5 mg, Sublimation (80 °C/0,01 Torr) und weiteren Reinigungsschritten (Fließmittel L_2 : Petroläther 40–60 °C-Äther = 5 + 5 V/V) konnte 1.2.4-Triacetoxybenzol (**5**) bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität gereinigt werden (Tab. II).

Aus der wässrigen Phase wurde 5.7-Dihydroxychromon-7-O-glucosid dünnschichtelektrophoretisch³ nachgewiesen.

Herrn E. Thoma danken wir für die geschickte Mithilfe.

¹ D. Bourwieg, B. Janistyn, M. Stocker u. R. Pohl, Arch. Pharm. **307**, 131 [1974].

² M. Stocker, B. Janistyn u. R. Pohl, Arch. Pharm. **307**, 946 [1974].

³ M. Stocker, Dissertation Freiburg 1975.

⁴ W. Hoffmann, Dissertation in Vorbereitung Freiburg 1976.

⁵ G. Henderson u. R. Boyd, J. Chem. Soc. **97**, 1666 [1910].

⁶ Houben-Weyl, **7 I**, 36 [1954].

⁷ G. Zemplén, R. Boguár u. L. Szegö, Chem. Ber. **76**, 1112 [1943].

⁸ W. Barz u. W. Hösel, The Flavonoids (J. B. Harborne, T. J. Mabry, and M. Mabry, eds.), Chapman and Hall, Ltd. 1975.

⁹ W. Barz, Ber. Deutsch. Bot. Ges. **88**, 71 [1975].

¹⁰ S. Fukushima, T. Noro, Y. Saiki, A. Ueno u. Y. Akahori, J. Pharmac. Soc. Japan **88**, 1135 [1968].

¹¹ M. Stocker u. R. Pohl, Phytochemistry **15**, im Druck.

¹² H. Jackson, Biochem. J. **33**, 1452 [1939].

¹³ L. Hörhammer, H. Wagner u. H. Krämer, Tetrahedron Lett. **42**, 5133 [1966].

¹⁴ W. Schöniger, Z. Analyt. Chem. **181**, 28 [1961].

¹⁵ Houben-Weyl, **8**, 545 [1954].