

Pflanzenabwehrstoffe XXXIV [1]

Synthese der 2-(E)-O-(4-Hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactarsäure, eines vermeintlich photosensitiven Faktors aus *Glycine max*

Synthesis of 2-(E)-O-(4-Hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactaric Acid, a Presumptive Photosensitive Factor from *Glycine max*

Hermann Schildknecht*, Horst Sauer [2] und Peter Kunzelmann

Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg 1, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **43c**, 519–528 (1988); received April 11, 1988

Photonasty, Turgorines, *p*-Hydroxy-cinnamic Acid Ester, Galactaric Acid, Optical Resolution (BSA)

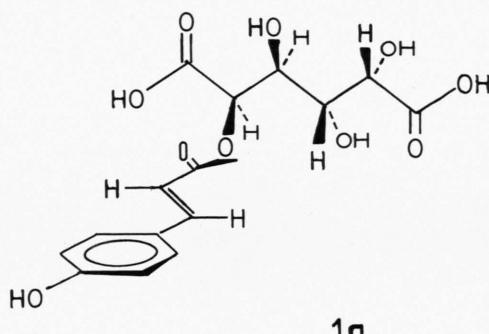
The synthesis of 2-(E)-O-(4-hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactaric acid (**1a**) is described. Starting with free galactaric acid (**2**) and 4-acetoxy-cinnamoyl-chloride (**3**), these compounds were esterified under regioselective conditions to racemic 2-(E)-O-(4-acetoxy-cinnamoyl)-galactaric acid (**4**). After deprotection of the *p*-coumaroyl moiety **1a** was obtained as a photo-unstable product. Optical resolution of racemate **1a** on bovine serum albumin covalently bound to silica resulted in the isolation of the pure optical isomers. The (+)-dextrorotatory synthetic enantiomer **1a** proved to be identical with the natural factor.

Bei der Suche nach den verborgenen Ursachen des Pflanzenschlafs haben wir mit der Strukturaufklärung der Periodic Leaf Movement Factors die Theorie der pflanzlichen Turgorbewegung auf eine chemische Basis gestellt [3]. Die als Turgorine bezeichneten Wirkstoffe wurden aus nyktinastisch reagierenden Pflanzen isoliert, deren tagesperiodische Blattbewegungen durch eine endogene selbsterregende Oszillation, der inneren Uhr, gesteuert sind [4]. Auch die Sojabohne *Glycine max* zeigt einen ausgeprägten Tag/Nacht-Rhythmus, deutlich erkennbar am Heben und Senken ihrer Blattstiele [5].

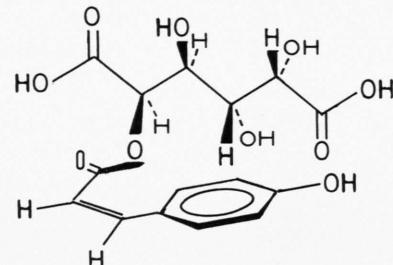
Bei Varianten der Art *Glycine max* aber wird die Turgorbewegung bei der photonastischen Reaktion der Blätter durch einen Lichtwechsel oder durch Intensitätsschwankungen des Lichts verursacht [6]. So mit übernimmt das Licht die Rolle des Zeitgebers.

Aus den Pflanzenextrakten der Leguminose wurde der Faktor **1a** isoliert [7], der eine photolabile Doppelbindung enthält und im Tageslicht leicht zu **1b** isomerisiert.

Da je nach dem Verhältnis der geometrischen Isomeren zueinander im Bewegungstest mit *M. pudica* [8] die chemonastische Blattreaktion ausgelöst wur-



1a



1b

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Schildknecht.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen 0341-0382/88/0700-0519 \$ 01.30/0

de, konnte man vermuten, daß mit der Strukturänderung auch eine unterschiedliche biologische Aktivität verbunden ist.

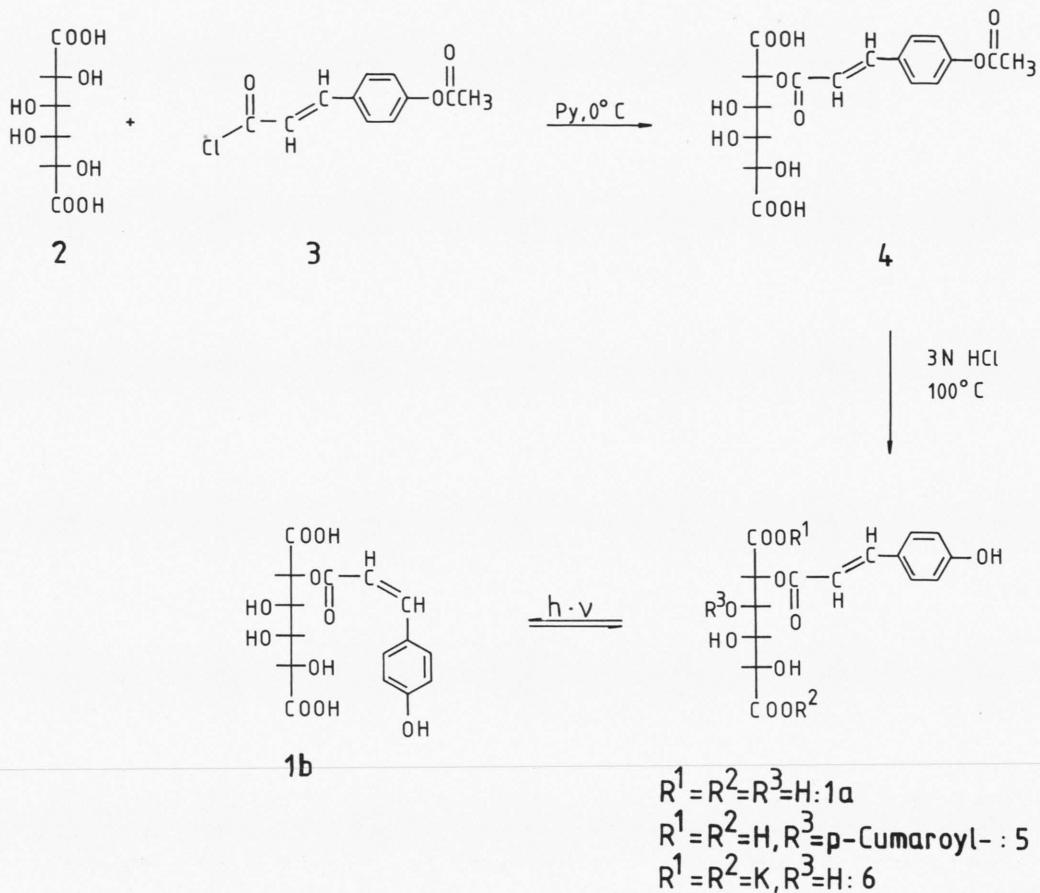


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

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 digitized 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.



Synthese der 2-(*E,Z*)-O-(4-Hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactarsäure **1a**, **1b**

Synthese

Mit der Strategie des minimalen Schutzes gelang uns die direkte Veresterung der freien Galactarsäure (**2**) mit dem geschützten *p*-Acetylumarsäurechlorid (**3**) in der gewünschten 2-OH-Position.

Als regioselektive Veresterungsbedingungen wählten wir 0° C und den dreifachen Überschuß der Zuckersäure **2** im Vergleich zum acylierenden Agens **3**. Die durch die Symmetrie von **2** bedingte Kristallgitterenergie [9] mußte durch vorhergehendes Erhitzen im Lösungsmittel überwunden werden. Unter dem Einfluß der stark dirigierenden Wirkung der sich ausbildenden Wasserstoffbrücken in Pyridin [10] wurde die hohe stereochemische Lenkung der

Reaktion zur racemischen 2-(*E*)-O-(4-Acetoxy-cinnamoyl)galactarsäure (**4**) erreicht.

Ohne die neu geknüpfte Esterbindung wieder zu lösen, konnte die phenolische Acetylgruppe bei 100° C in 3 N HCl zum Zielmolekül **1a** abgespalten werden. Eine Isomerisierung von **1a** durch intramolekulare Umesterung zur 3-O-(4-Hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactarsäure (**5**) wurde nicht beobachtet [11]. Mit der Entfernung der phenolischen Acetylgruppe haben sich die elektronischen Verhältnisse des konjugierten π -Systems so verändert, daß eine rasche Photoisomerisierung unter dem Einfluß von Tageslicht zu **1b** erfolgte. Das geometrische Isomergemisch ($E:Z = 64:36$) wurde auf Reversed-

Phase C-18-Gelen HPLC-chromatographisch endge-reinigt. Bei der Darstellung von **1b** durch UV-Be-strahlung der wäßrigen Lösung von **1a** stieg der Z-Isomerenanteil nicht über 54%.

Charakterisierung

Die Daten der UV-, ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie stimmten für den Naturstoff und das Syntheseprodukt vollkommen überein. Dagegen wiesen die FT-IR-Spektren der beiden Säureformen des enantiomerenreinen Naturstoffs und des optisch inaktiven Syntheseprodukts **1a** Verschiebungen und Intensitätsänderungen der Banden auf. Diese Abweichungen waren auf die Untersuchung zweier Proben unterschiedlicher Kristall-Modifikation zurückzuführen. Aufgrund der nur geringen Unterschiede der Absorptionsbanden ist es naheliegend, das optisch inaktive System **1a** als racemischen Mischkristall aufzufassen [12].

Das 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 1) lässt zwei Bereiche der monofunktionalisierten Galactarsäure **1a** erkennen.

Der Tieffeldteil ist durch das AA'BB'-Spinnmuster des *p*-disubstituierten Aromaten gekennzeichnet. Die olefinischen Protonen der *p*-Hydroxyzimtsäure werden bei δ = 6,6 (H- α) und 7,9 (H- β) gefunden. Die Asymmetrie dieses AB-Systems bezüglich der Signalhöhen der beiden Dubletts wird auf Fernkopplungen zu den aromatischen Protonen zurückgeführt [13].

Bei δ = 5,46 fällt das geminal zur veresterten Hydroxygruppe stehende Proton H-2' auf, das im Vergleich zur freien Galactarsäure um 1,23 ppm zu tiefem Feld verschoben ist.

Die Verknüpfungsstelle in 2-O-Position der Galactarsäure (**2**) wurde durch ein computersimuliertes Spektrum bereits belegt [7]. Werden vicinale Kopplungskonstanten aus Spektren 1. Ordnung im Sinne einer vorherrschenden Konformation betrachtet, dann nehmen die Protonen H-2', 3' bzw. H-4',5' gemäß der kleinen Kopplungskonstanten von $^3J_{2',3'} = 1,77$ Hz bzw. $^3J_{4',5'} = 0$ einen Diederwinkel von 60° (synclinale Orientierung) bzw. 90° ein. Die Äquivalenz der Galactarsäuregerüstprotonen H-3' und H-4' wurde durch Veresterung mit dem *p*-Cumaroylrest in 2-Stellung aufgehoben. Es resultieren die für *trans*-ständig stehende Protonen großen Kopplungskonstanten von $^3J_{3',4'} = 9,95$ Hz, so daß auf das Vorlie-

gen einer ausgedehnten Zickzack-Konformation in Lösung geschlossen wird [14].

Die schlechte Löslichkeit der Säure **1a** in Wasser (0,5 mg H^+ -Form/0,5 ml H_2O , 20 °C) veranlaßte uns, die Salzform **6** ^{13}C -NMR-spektroskopisch zu untersuchen. Die Resonanzlagen des aromatischen Aglykons konnten anhand der „Off-Resonanz-Entkopplung“, Inkrementberechnungen und Spektrenvergleiche eindeutig zugeordnet werden. Im Phenolcarbonsäureester **1a** ist die im Edukt **2** vorherrschende S_2 -Symmetrie aufgehoben, womit alle sechs ^{13}C -Resonanzen des Zuckersäureteils erscheinen.

Zum massenspektrometrischen Vergleich wurden Naturstoff und Syntheseprodukt mit N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) in Pyridin persilyiert [15]. Das Massenspektrum wurde über Direkteinlaß des Sektorfeldgeräts mit Massenfeinbestimmung aufgenommen. Im Vergleich zum Naturstoffspektrum, das an anderer Stelle ausführlich diskutiert ist [7], konnte das Molekülion mit der nominalen Masse von $m/z = 788$ bei einer Auflösung von 1000 auf dem Photopapier mit einer rel. Intensität von 0,04% erstmals nachgewiesen und mit der Peakmatchmethode vermessen werden.

Racemattrennung und CD-spektroskopischer Vergleich zwischen Naturprodukt und den optischen Antipoden (+)-**1a** und (-)-**1a**

Um das racemische Syntheseprodukt **1a** HPLC-chromatographisch in die entsprechenden Enantiomeren aufzutrennen [16], verwendeten wir als chirales Trägermaterial Bovin-Serum-Albumin (BSA), das kovalent an 5 μ Kieselgel 300 gebunden war. Nach der Optimierung der unabhängigen Parameter der mobilen Phase wie Isopropanolgehalt, Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur [17] konnten unterschiedliche Kapazitätsfaktoren der optischen Isomeren im Trennmedium und ein Trennfaktor $\alpha = 3$ erreicht werden (Abb. 2).

Anschließend wurde das Puffersalz durch präparative HPLC auf RP-Gelen abgetrennt, wobei gleichzeitig eine Auftrennung in die geometrischen Isomeren (+)-**1a** und (+)-**1b** bzw. (-)-**1a** und (-)-**1b** erfolgte.

Da sich die *p*-Hydroxyzimtsäure als inhärent symmetrischer Chromophor erst durch die Esterbindung zur Galactarsäure in einer chiralen Umgebung befand, wies der Chromophor nur eine geringe meßbare optische Aktivität auf.

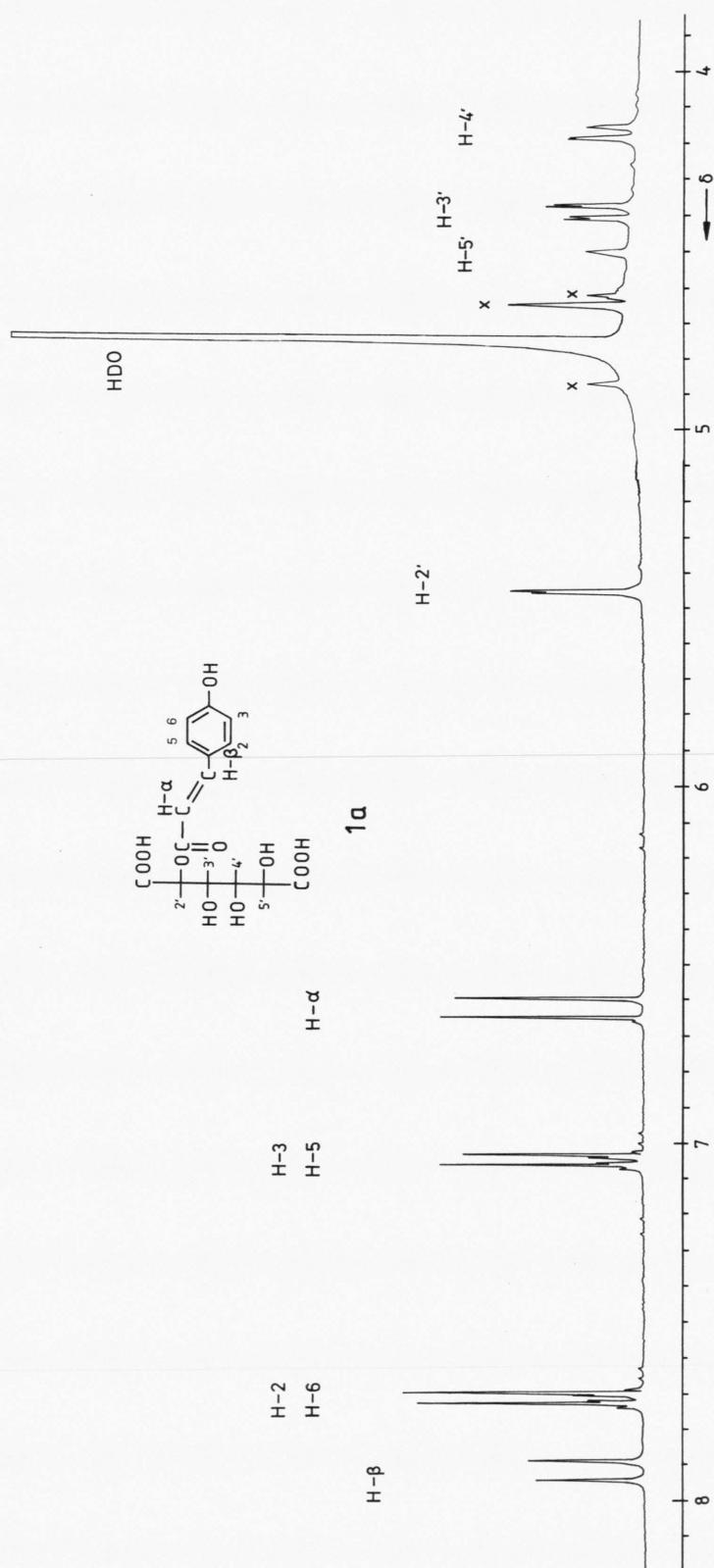
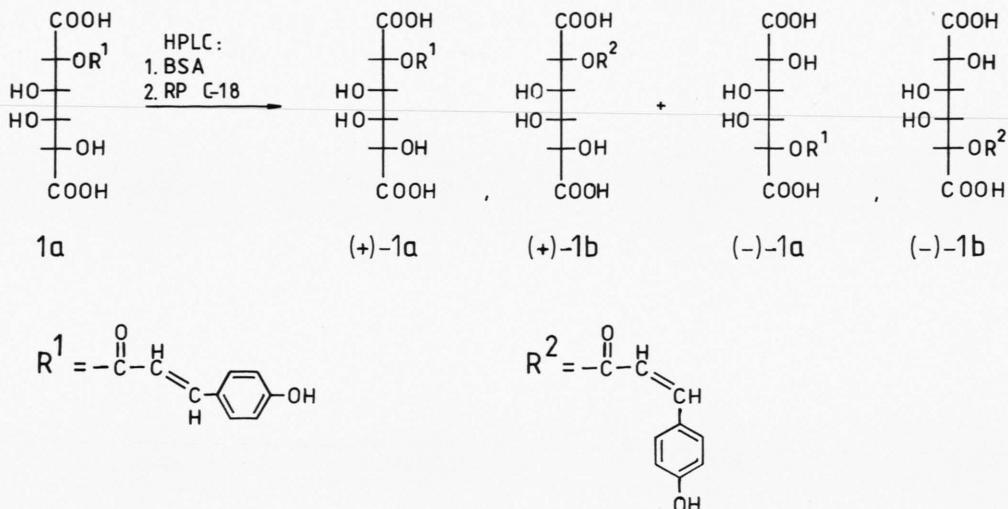


Abb. 1. 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum von **1a** in D_2O (4608 Scans, Standard: HDO $\delta = 4,78$, 308 K).



RACEMATSPALTUNG von 1a

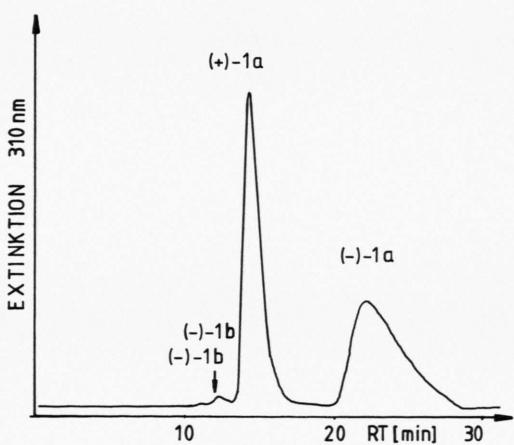


Abb. 2. HPLC-Elutionsdiagramm von racemischem **1a**; Säule: BSA, 900 × 9,6 mm, Si 300 Å; mob. Phase: 15% *i*-Propanol, 6 mm KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer (pH = 5); Druck: 101 bar; Fluß: 2 ml/min; 32 °C; Empf. 1; aufgetragene Menge: 150 µg/150 µl.

Die zuerst eluierte Fraktion **(+)-1a** war rechtsdrehend und mit dem Naturstoff identisch. Die spezifische Drehung wurde aus der gemessenen Drehung und der UV-spektroskopisch bestimmten Konzentration berechnet. Neben dem positiven Maximum bei 310 nm von **(+)-1a** (Tab. I) fällt im Bereich zwischen 225 und 210 nm der bisignate Verlauf der Kurve (CD-Couplet) auf. Dies kann damit erklärt werden, daß in Lösung eine starre Konformation gebildet wird, die es den identischen Carboxylchromophoren ermöglicht, mit ihren elektrischen Über-

Tab. I. Vergleich der $\Delta\epsilon$ -Werte des Naturstoffs mit den synthetischen Enantiomeren; *g*-Faktor.

	$\Delta\epsilon_{310}$ [L × mol ⁻¹ × cm ⁻¹]	$\Delta\epsilon_{210}$ [L × mol ⁻¹ × cm ⁻¹]	<i>g</i> -Faktor (310 nm)
+1a	+0,23	+0,17 (225 nm) -0,17 (210 nm)	$2,3 \times 10^{-5}$
-1a	-0,28	-0,63	8×10^{-5}
Naturstoff	+0,22	+0,45	

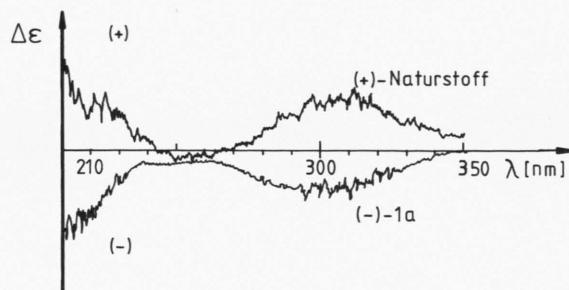


Abb. 3. Vergleich der spiegelbildlichen CD-Spektren des (+)-Naturstoffs und des synthetischen (-)-1a.

gangsmomenten in chirale Wechselwirkung zu treten (Exciton Chirality Method) [18].

Abb. 3 zeigt die enantiomorphen Kurven, d. h. die hinsichtlich der Wellenlängenachse spiegelbildlichen Spektren der beiden optischen Isomeren des (+)-drehenden Naturstoffs und des (-)-drehenden Syntheseprodukts 1a.

Interessant ist, daß der Naturstoff bei höheren Konzentrationen (0,15 mg/ml H₂O) zu Selbstassoziationen, d. h. Ausbildung von Stapeln neigt, was sich im CD-Spektrum in einer Vorzeichenumkehr (lineardichroistische Artefaktbildung) bei 310 nm äußert.

Mit der Bestimmung des dimensionslosen Verhältnisses von circulardichroistischer und isotroper Absorption [19] $g = \frac{\Delta\epsilon}{\epsilon}$ für (+)-1a und (-)-1a erfolgte die Identifizierung der enantiomerenreinen HPLC-Fraktionen.

Diskussion

Die synthetische, mit dem Naturstoff identische 2-(*E*)-O-(4-Hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactarsäure, also die rechtsdrehende Form (+)-1a, zeigte im Biotest mit *Mimosa pudica* L. keinerlei Wirksamkeit. Für die vermeintliche terminale Aktivität ist sehr wahrscheinlich das Turgorin PLMF 1 verantwortlich.

Um den Einfluß von 1a auf das photonastische Verhalten der Sojabohne kennenzulernen, haben wir den Verlauf der Blattbewegungen im 3-h-Licht/Dunkel-Wechsel von chemisch gereizten Versuchspflanzen und Kontrollpflanzen verglichen. Das Di-Kaliumsalz von 1a ließ jedoch weder eine blattbewegungshemmende noch -fördernde Wirkung erkennen.

Über die Frage nach der Bedeutung des Faktors 1a in turgoraktiven Pflanzen wie *Glycine max* [20–23] kann man im Augenblick nur Hypothesen erstellen, zumal 1a auch in turgorinaktiven Pflanzen wie Roggen und Citrusfrüchten nachzuweisen ist [24, 25].

Experimenteller Teil

Schmp.: nach Dr. Tottoli (Büchi), unkorrigiert – Elementaranalysen: Chemisches Institut der Universität Heidelberg – FT-IR-Spektrometer IFS 85 (Bruker), Aspect 2000: KBr-Makropreßlinge – Kernresonanzspektrometer WH 300 (Bruker), Aspect 2000; Meßfrequenzen: ¹H-NMR: 300 MHz, ¹³C-NMR: 75,46 MHz, Quadratur Detektion – innerer Standard für Messungen in D₂O: HDO bei $\delta = 4,78$ und 308 K (300 MHz) und CH₃OH bei $\delta = 51,7$ (75,46 MHz); in CDCl₃ wurde das Lösungsmittesignal zugrundegelegt. – Massenspektrometer Micromass ZAB, VG Multispec (Vacuum Generators) – UV-Spektrophotometer U-3200 (Hitachi) – Spectropolarimeter J-500 (Jasco), J-DPY-Data Processor: die digital aufgezeichneten Kurven wurden im Dataprozessor geglättet, nach viermaliger Aufnahme gemittelt und die Grundliniensustraktion durchgeführt – Polarimeter 141 (Perkin Elmer) – HPLC-System: P 400 (Latek), Spectroflow 77 (Kratos); Säulen: I: Nucleosil 5 μ RP C-18; 250 \times 8 mm; II: Nucleosil 5 μ RP C-18: 250 \times 16 mm (Macherey Nagel); Bovin-Serum-Albumin Si 300, 500 \times 9,6 mm, 5 μ No 17037 (Serva) – MPLC-System: Mitteldruckkolbenpumpe MD 80/100 (Labomatik), Manometer mit Druckwächter (LKB), Zweikanalschreiber (Knauer); Säule: 370 \times 30 mm, Trägermaterial: HD-SIL-RP-C18, 60 μ m, 60 Å, Charge 951 (Orpegen) – DC-Fertigplatten SIL G-25 UV 254 F (Macherey Nagel) – Kieselgel DC-Platten RP-18 F 254 S, 5 \times 20 cm (Merck).

D,L-Galactarsäure (2) [26]

20 g Galactose und 2 g NaNO₂ werden im 500 ml Dreihalskolben, der mit einem Rückflußkühler und Gasableitungsrohr verbunden ist, trocken vermischt. Der Kolben wird mit dem Eisbad auf 0–3 °C abgekühlt und es werden unter Röhren 60 ml eiskalte, 70prozentige HNO₃ zugegeben bis zur vollständigen Auflösung des Festkörpers. Das Reaktionsgemisch wird vier Stunden bei dieser Temperatur gerührt, da-

nach auf RT erwärmt und für weitere 20 Stunden geführt, wobei kristalline Schleimsäure ausfällt. Die Suspension wird mit 40 ml einer gesättigten Schleimsäurelösung verdünnt und über eine Porzellanfritte abgesaugt.

Ausb. 20,5 g (88%), Schmp. 210–220 °C. – IR: 3287 cm^{-1} , 3000–2500 (O–H), 1725 (C=O), 1295, 1121, 1061 (C–O), 920 (δ C=O). – $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆): δ = 3,77 (s, 2H, H-3, H-4), 4,23 (s, 2H, H-2, H-5); CH-Analyse [26].

p-AcetylCumarsäurechlorid (3) [27]

4 g (0,02 mol) p-AcetylCumarsäure, die in Abänderung der Vorschrift aus p-Cumarsäure in Acetanhydrid und katalytischen Mengen Pyridin quantitativ erhalten wurden, werden mit der fünfachen Menge Thionylchlorid (7,3 ml) übergossen, das zuvor über eine 20 cm Vigreux-Kolonne destilliert wurde. Nun wird die Suspension langsam auf 90 °C erhitzt und für drei Stunden unter Rückfluß gehalten. Nach dem Abkühlen auf RT wird am Rotationsverdampfer das überschüssige SOCl_2 abdestilliert und der Kolbeninhalt mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird in PE 90/100 umkristallisiert.

Ausb. 3,7 g (85%) weiße feine Nadeln, Schmp. 119 °C (114 °C, Benzol Lit. [27]). – IR: 1759, 1732 cm^{-1} (C=O), 1623, 1600, 1510 (C=C), 1368 (δ C–H), 1217, 1169 (C–O), 1098, 992, 834. – $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): δ = 7,85 (d, J_{trans} = 16 Hz, 1H, H- β), 7,65 (d, 3J = 8 Hz, 2H, H-2, H-6), 7,25 (d, 3J = 8 Hz, 2H, H-3, H-5), 5,65 (d, J_{trans} = 16 Hz, 1H, H- α), 2,3 (s, 3H, CH_3CO). – $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 168,6, 165,7 (C-9, C-10), 153,5 (C-4), 149,1 (C-7) 130,5 (C-1), 130,1 (C-2, C-6), 122,4 (C-3, C-5), 122,4 (C-8), 20,9 (C-11). – MS (EI, 70 eV): ber. M^+ = 224,02 gef. M^+ = 224,16 (5%). $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_3\text{Cl}$ (224,64) ber. C 58,81 H 4,04 Cl 15,78 gef. C 58,90 H 4,20 Cl 15,28.

2-(E)-O-(4-Acetoxy-cinnamoyl)-D,L-glaetarsäure (4)

5 mmol (1,05 g) Galactarsäure (2), die zuvor in der Trockenpistole bei 80 °C und 0,1 Torr über P_2O_5 mehrere Stunden getrocknet wurden, werden in 125 ml trockenem Pyridin in der Siedehitze gelöst und langsam auf 0 °C abgekühlt. Dann werden 1,6 mmol (0,37 g) 3, das in 15 ml trockenem THF gelöst ist, über einen Zeitraum von 20 Minuten zuge tropft. Nach vier Stunden wird das Eisbad entfernt

und weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur geführt.

Die ausgefallene Galactarsäure wird abfiltriert und mit Toluol gewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einrotiert und der Rückstand mehrere Male mit Toluol eingedampft (40 °C). Das Rohprodukt wird in 100 ml 0,1 n eiskaltem HCl aufgenommen und von unlöslichen Bestandteilen, die mit 50 ml kaltem H_2O gewaschen werden, bei 0 °C abgetrennt. Das Filtrat wird dreimal mit 30 ml kaltem Essigester extrahiert; danach wird die wässrige Phase mit NaHCO_3 auf pH 4 bis pH 5 eingestellt und einrotiert. Die Reinigung des Produkts erfolgt durch Mitteldruck-Säulenchromatographie an Reversed-Phase-Materialien. Zur Vorreinigung wird der bräunliche Rückstand in 50 ml kaltem Ethanol digeriert, abfiltriert und mit wenig Ethanol gewaschen. Rohausbeute: 700 mg Produktgemisch.

MPLC-Trennung: (50% Methanol, 0,5% AcOH; 17–20 ml/min, 12–13 bar, Det.: 254 und 206 nm, 0,5 Abs): $t_{\text{R}} = 9$ min. **Vorbehandlung:** Das schwerlösliche Rohprodukt wird in 26 ml heißem Wasser gelöst und nach dem Abkühlen von geringen Mengen ausgefallener Galactarsäure abzentrifugiert. Trennmenge: 0,8 ml \triangleq 22 mg/Injektion; 25 min/ Trennung \times 32 Injektionen = 14 Stunden. Die Trennungen werden ohne Methanolzwischenspülungen durchgeführt. Elutionsmittelverbrauch: 22 l. Das Eluat wird bis auf wenige Milliliter einrotiert und am Ölumpenvakuum gefriergetrocknet. Für C,H-Gehaltsbestimmung wird das Produkt 4 aus H_2O umgefällt.

Ausb. 0,128 g (19%) weißes Pulver, Schmp. 179–181 °C; $R_f = 0,48$ (Essigester–AcOH– H_2O = 60:30:10), 0,45 (RP C-18, MeOH – H_2O –AcOH = 35:65:0,5), HPLC (I, 30% Methanol, 2 mm TFA): $t_{\text{R}} = 14,0$ min. – UV (H_2O): λ_{max} (Abs) = 282,8 nm (0,787), 217,6 (0,465), 204,2 (0,456). – IR: 3411 cm^{-1} (O–H), 1725 (C=O), 1636 (C=C), 1252, 1215, 1161, 1109 (C–O), 1058, 993, 837, 515. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ = 7,95 (d, J_{trans} = 15,9 Hz, 1H, H- β), 7,84 (d, 3J = 8,8 Hz, 2H, H-2, H-6), 7,31 (d, 3J = 8,8 Hz, 2H, H-3, H-5), 6,75 (d, J_{trans} = 15,9 Hz, 1H, H- α), 5,42 (d, $^3J_{\text{H-2,3'}} = 1,3$ Hz, 1H, H-2'), 4,62 (s, 1H, H-5'), 4,37 (dd, $^3J_{2',3'} = 1,7$ Hz, $J_{3',4'} = 9,7$ Hz, 1H, H-3'), 4,16 (d, $^3J_{4',3'} = 9,7$ Hz, 1H, H-4'), 2,44 (s, 3H, CH_3CO). – $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ = 171,3, 175,9, 180,5, 177,9 (C-9, C-10, C-1', C-6'), 154,6 (C-4), 148,1 (C-7), 135,3 (C-1), 132,7 (C-2, C-6), 125,1 (C-3, C-5), 120,3 (C-8), 77,6 (C-

2'), 73,8 (C-3'), 73,5 (C-4'), 74,3 (C-5'), 23,2 (C-11). C₁₇H₁₈O₁₁ (398,32) ber. C 51,26 H 4,56 O 44,18 gef. C 51,09 H 4,61 O 44,30.

2-(*E*)-O-(*p*-Hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactarsäure (1a)

1,06 g (0,266 mmol) **4** werden in 6,8 ml 0,12 N HCl suspendiert und zwei Stunden in der Siedehitze gerührt. Die Vollständigkeit der Umsetzung lässt sich dünnenschichtchromatographisch auf RP-C18-Fertigplatten und dem Laufmittelgemisch MeOH/H₂O/Eisessig 30:70:0,5) verfolgen (*R_f* = 0,75).

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur unterwirft man die wäßrige Phase einer Essigester-Verteilung bei 0 °C, stellt die Lösung mit eiskalter NaHCO₃-Lösung auf pH 5 ein und rotiert sie bis zur Trockne ab. Zur Abtrennung von Nebenprodukten wird das Rohprodukt durch Mitteldruck-Säulenchromatographie an Reversed-Phase-Kieselgel vorgereinigt. Die anschließende Feintrennung des Isomerengemisches erfolgt mittels HPLC. Auswaage: 153 mg Rohprodukt.

MPLC: (45% Methanol, 0,5% AcOH, 20,5 ml/min, 13–15 bar, Det. 254 und 206 nm, 0,6 Abs.): *t_R* = 7,5 min; dazu wird das Rohprodukt in 7 ml H₂O gelöst. Trennmenge: 0,8 ml = 17,5 mg; Trenndauer: 25 min/Trennung × 9 Schuß = 4 Stunden. Die Elutionskraft des Laufmittelsystems ermöglicht eine kontinuierliche Trennfolge ohne Methanolzwischen-spülungen. Das Eluat wird anschließend aufkonzentriert und im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet.

Auswaage: 55 mg **1a**, **1b**-Isomerengemisch, Schmp. 125–130 °C.

Präp. HPLC (II, 15% Methanol, 2 mm TFA, 210 bar, 10 ml/min Det. 220 nm); eingespritzte Menge: 1,35 mg/300 µl; Dauer: 30 min/Trennung × 40 Injektionen ≈ 20 Stunden. Die Säure wird zur Vermeidung von *cis/trans*-Isomerisierungen in schwarzen Kolben (Polyacrylamidfarblack) aufgefangen, aufkonzentriert und im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet. Methanolzwischen-spülung.

Fraktion I: *t_R* = 12,5 min, **1a** als weißes, schlechtlösliches Produkt; Ausb. 24 mg (25%); Schmp. 150–160 °C. HPLC (I, 10% Methanol, 2 mm TFA, 3 ml/min 170 bar): *t_R* = 23,2 min – UV (H₂O): $\lambda_{\text{max}} (\varepsilon)$ 310,8 nm (9700 1 mol⁻¹ cm⁻¹), 295 sh, 226 (5500), 210 (4640). – IR: 3412 cm⁻¹ (O–H), 1737 (C=O) 1687 (C–H *trans*), 1605 (C=C), 1433, 827 (δ C–H), 1264, 1250 (C–O), – ¹H-NMR (D₂O): δ = 7,93 (d,

J_{trans} = 16,1 Hz, 1H, H-β), 7,72 (d, ³J = 8,6 Hz, 2H, H-2, H-6), 7,05 (d, ³J = 8,6 Hz, 2H, H-3, H-5), 6,63 (d, *J_{trans}* = 15,9 Hz, 1H, H-α), 5,46 (d, ³J_{2',3'} = 1,55 Hz, 1H, H-2'), 4,5 (s, 1H, H-5'), 4,39 (dd, ³J_{H-2',3'} = 1,77 Hz, ³J_{H-3',4'} = 9,95 Hz, 1H, H-3'), 4,17 (dd, ³J_{4',5'} = 1,1 Hz, ³J_{4',3'} = 9,95 Hz, 1H, H-4'). – MS (EI, 70 eV): C₃₃H₅₄O₁₀Si₆ ber. M⁺ = 788,3078 gef. M⁺ = 788,3087.

Fraktion II: *t_R* = 14,2 min, **1b** als weiß-braunes Produkt; Schmp. 140–145 °C; Ausb. 12 mg (12,5%).

Di-K⁺-Salz der 2-(*E*)-O-(*p*-Hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactarsäure (6)

Die Säure **1a** wird in wenig Wasser gelöst und unter Lichtausschluß über eine Säule mit Amberlite (CG 50/K⁺-Form) gegeben. Das Eluat wird im Dunkeln aufkonzentriert und gefriergetrocknet.

Weißes, schaumiges Produkt; Schmp. 170–175 °C; HPLC: siehe **1a**; – IR: 3407 cm⁻¹ (O–H), 1700, 1604 (C=O), 1515 (C=C), 1394 (C=C–H), 1260, 1204, 1071 (C–O), 830 (C–H). – ¹H-NMR (D₂O): δ = 7,88 (d, *J_{trans}* = 16,3 Hz, 1H, H-β), 7,69 (d, ³J = 8,8 Hz, 2H, H-2, H-6), 7,02 (d, ³J = 8,8 Hz, 2H, H-3, H-5), 6,60 (d, *J_{trans}* = 15,9 Hz, 1H, H-α), 5,31 (d, ³J_{2',3'} = 1,77 Hz, 1H, H-2'), 4,42 (d, ³J_{5',4'} = 0,88 Hz, 1H, H-5'), 4,29 (dd, ³J_{2',3'} = 1,77 Hz, ³J_{3',4'} = 10,17 Hz, 1H, H-3'), 4,08 (dd, ³J_{4',5'} = 0,88 Hz, ³J_{4',3'} = 9,7 Hz, 1H, H-4'). – ¹³C-NMR (D₂O): δ = 181,4, 178, 171,8 (C-1', C-6', C-9), 1,61 (C-4), 149 (C-7), 133,3 (C-2, C-6), 129,4 (C-1), 118,7 (C-3, C-5), 117,2 (C-8), 77,4 (C-2'), 73,9 (C-3'), 73,6 (C-4'), 74,3 (C-5').

2-(*Z*)-O-(*p*-Hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactarsäure (1b) aus 2-(*E*)-O-(4-Hydroxy-cinnamoyl)-D,L-galactarsäure (1a)

20 mg (0,06 mm) **1a** werden in 60 ml H₂O gelöst und in ein mit fließendem Wasser kühlables Duran-glasgefäß und eintauchender Hg-Niederdrucklampe (Firma Heraeus, 15 Watt) eingefüllt. Unter einem konstanten N₂-Strom wird die Lösung bei RT gerührt und 15 min photoisomerisiert. Das entstandene 1:1-Isomerengemisch wird anschließend HPLC-chromatographisch aufgetrennt. Beide Fraktionen werden unter Lichtausschluß aufgefangen und gefriergetrocknet.

Präp. HPLC (II, 10% Methanol, 2 mm TFA, 10 ml/min, 225 bar): **Fraktion I:** **1a**, *t_R* = 22,5 min.

Fraktion II: 1b, $t_R = 27$ min; Ausb. 8 mg (80%), weißbrauner Schaum, Schmp. 140–145 °C; $R_f = 0,7$ (RP C-18, MeOH–H₂O–AcOH = 35:65:0,5); HPLC (I, 10% MeOH, 2 mM TFA, 3 ml/min, 170 bar): $t_R = 27,4$ min – UV (H₂O): λ_{\max} (ϵ) = 308 nm (6250 l mol⁻¹), 220 (5880), 210 (6951). – IR: 3404 cm⁻¹ (O–H), 1702, 1679 (C=O), 1628 (C=C–H *cis*), 1605, 1514 (C=C), 1205, 1162 (C=O), 841, 801, 728. – ¹H-NMR (D₂O): $\delta = 7,24$ (d, $J_{cis} = 12,4$ Hz, 1H, H-β), 7,64 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-2, H-6), 6,98 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3, H-5), 6,15 (d, $J_{cis} = 12,4$ Hz, 1H, H-α), 5,41 (d, $J_{2',3'} = 1,32$ Hz, 1H, H-2'), 4,34 (dd, $J_{3',2'} = 1,7$ Hz, $J_{3',4'} = 8,4$ Hz), 1H, H-3'), 4,08 (d, $J_{4',3'} = 9,73$ Hz, 1H, H-4'), 4,48 (s, 1H, H-5').

(+)-(E)- und (+)-(Z)-2-O-(4-Hydroxy-cinnamoyl)-galactarsäure (+)-1a) und (+)-1b; (−)-(E)- und (−)-(Z)-2-O-(4-Hydroxy-cinnamoyl)-galactarsäure (−)-1a) und (−)-1b

Ausgehend von der racemischen *trans*-Verbindung werden 10 mg **1a** (0,026 mM) in 10 ml H₂O gelöst und auf einer Bovin-Serum-Albumin derivatisierten Kieselgelsäule der Firma Serva HPLC-chromatographisch in die optischen Antipoden (+)-1 und (−)-1 gespalten. Die beim Trennvorgang anfallenden Puffersalze werden mittels präparativer HPLC auf einer RP-Kieselgelphase abgetrennt. Gleichzeitig wird eine Fraktionierung der isolierten Enantiomeren in die geometrischen Isomere (+)-1a und b sowie (−)-1a und b vorgenommen.

Semipräparative HPLC auf der chiralen BSA-Phase

Säulendimension: 500 × 9,2 mm; Inhalt: ca. 18 g optisch aktives Rinderprotein, gekoppelt an Kieselgel. 300 Å, 5 µ; Thermostatisierung der Säule bei

32 °C; Det.: 310 nm; 15% *i*-Propanol, 6 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer (pH = 5); 101 bar; 2,0 ml/min; Belastbarkeit der Säule: 150 µg/Trennung. Nach dem Abrotieren des *i*-Propanols wird die wässrige Phase gefriergetrocknet.

Auswaage: (+)-drehendes Enantiomer $t_R = 13,7$ min, 634 mg Puffersalz/(+)-1a, b-Gemisch; (−)-drehendes Enantiomer $t_R = 19$ min, 1200 mg Puffersalz/(−)-1a, b-Gemisch.

Präparative HPLC (II, 15% Methanol, 2 mM TFA, 10 ml/min, 210 bar). Dazu löst man das jeweilige Puffer/Isomerengemisch in H₂O und zentrifugiert von geringen Mengen Säulenmaterial (BSA) ab. Die verschiedenen Eluate werden unter Lichtausschluß aufgefangen, am Rotationsverdampfer aufkonzentriert und gefriergetrocknet.

(+)-1a: $t_R = 18,12$ min, Ausb. 1,2 mg (22% Isomerengemisch)

(+)-1b: $t_R = 20,5$ min, Ausb. 1,0 mg

(+)-1a: $[\alpha]_D^{22} = +12^\circ$, ($c = 0,05$, H₂O)

CD: (+)-1a: $\Delta\epsilon_{310} = +0,23$, $\Delta\epsilon_{225} = +0,17$, $\Delta\epsilon_{210} = -0,17$ ($c = 0,095$ mg/ml, H₂O)

(−)-1a: $t_R = 18,12$ min, Ausb. 1,1 mg (21% Isomerengemisch)

(−)-1b: $t_R = 20,5$ min, Ausb. 0,9 mg

(−)-1b: $[\alpha]_D^{22} = -62^\circ$ (0,08, H₂O)

CD: (−)-1b: $\Delta\epsilon_{310} = -0,28$, $\Delta\epsilon_{210} = -0,63$.

Dank

Wir danken Herrn Dr. Nietsche der Firma Serva (Heidelberg) für die Unterstützung mit verschiedenen chiralen HPLC-Säulen zu Testzwecken, Herrn Dr. Würzer (BASF, Limburgerhof) für die Samen der Sojapflanze *Glycine max* SRF 450 und besonders dem Fonds der Chemischen Industrie für die immer gewährte besonders wertvolle finanzielle Hilfe.

- [1] XXX. Mitteilung: H. Schildknecht, Turgorine – Neue Signalstoffe des pflanzlichen Verhaltens. Spektrum der Wissenschaft **11**, 44–53 (1986).
- [2] Aus der Dissertation, H. Sauer, Univ. Heidelberg, 1988.
- [3] H. Schildknecht und R. Milde, Carbohydr. Res. **164**, 23–31 (1987).
- [4] H. Schildknecht, Endeavour **8**, 113–117 (1984).
- [5] E. Bünning, Die physiologische Uhr, 3. Aufl., S. 153, Springer, Berlin-Heidelberg 1977.
- [6] D. E. Brest, T. Hoshizaki und K. C. Hamner, Plant Physiol. **45**, 647 (1970).
- [7] G. Koch, Dissertation, Heidelberg 1984.
- [8] H. Schildknecht, Angew. Chem. **95**, 692 (1983).
- [9] G. A. Jeffrey und R. A. Wood, Carbohydr. Res. **108**, 205 (1982).
- [10] L. Birkofe und K. Idel, Liebigs Ann. Chem. **1974**, 5.
- [11] A. H. Haines, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **33**, 101 (1976).
- [12] S. Wirzing, Z. Anal. Chem. **267**, 1–13 (1973).
- [13] G. P. Newsoroff und S. Sternhell, Tetrahedron Lett. **47**, 3499 (1964).
- [14] J. L. Navia und D. E. Kiely, Carbohydr. Chem. **5**, 169–181 (1986).
- [15] L. Birkofe und G. Schmidberg, Chem. Ber. **104**, 3831 (1971).
- [16] R. Däppen, H. Arm und V. Meyer, J. Chromatogr. **373**, 1 (1986).
- [17] S. Allenmark, J. Biochem. Biophys. Meth. **9**, 13 (1984).
- [18] N. Harada und K. Nakanishi, CD-Spectroscopy; Exciton Coupling in Org. Stereochemistry, University Science Books, 1983.
- [19] A. F. Drake, J. M. Gould und S. Mason, J. Chromatogr. **202**, 239 (1980).
- [20] B. Overdiek, Dissertation, Heidelberg 1987.
- [21] D. Keller, Dissertation, Heidelberg 1987.
- [22] K. Bucher, Diplomarbeit, Heidelberg 1984.
- [23] K. Koppert, Diplomarbeit, Heidelberg 1988.
- [24] B. Risch, K. Herrmann, V. Wray und L. Grotjahn, Phytochemistry **26**, 509–510 (1987).
- [25] D. Strack, H. Keller und G. Weissenböck, J. Plant Physiol. **131**, 61–73 (1973).
- [26] W. W. Pigman, B. L. Browning, W. H. McPherson, C. R. Calkins und R. L. Leaf, J. Am. Chem. Soc. **71**, 2200–2204 (1949).
- [27] S. Ogawa, Bull. Chem. Soc. Japan **2**, 24 (1927).