

Zur Biogenese der Flavonoide

IV. Mitt.*: 2'.4.4'.6'-Tetrahydroxy-chalkon-2'-glucosid- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ als Vorstufe für Quercetin und Cyanidin

Von HANS GRISEBACH und LENI PATSCHKE

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforschg. **16 b**, 645—647 [1961]; eingegangen am 25. Juli 1961)

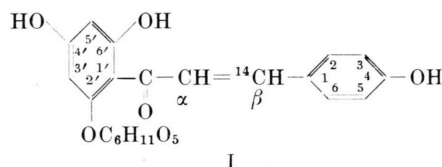
2'.4.4'.6'-Tetrahydroxychalcone-2'-glucoside- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ is incorporated into cyanidin in red cabbage and into cyanidin and quercetin in buckwheat. In all cases no randomization of radioactivity occurs, as was shown by degradation of the compounds. Therefore the chalcone is probably a common precursor of the anthocyanin and flavonol. Furthermore, it can be concluded from the experimental results that the oxidation state of the heterocyclic ring and ring B in the flavanoids is determined at the stage of a chalcone or of a related C_{15} intermediate.

Wie GRISEBACH und BOPP¹ in einer früheren Arbeit zeigen konnten, werden Quercetin und Cyanidin beim Buchweizen parallel aus einer gemeinsamen Vorstufe gebildet. Aus den bisherigen Versuchen ging jedoch nicht hervor, ob die Gabelung des Biosyntheseweges bereits auf einer Phenylpropanvorstufe oder aber erst von einer C_{15} Vorstufe aus erfolgt.

Nach den augenblicklichen Kenntnissen über die Biogenese der Flavonoide sind deren wahrscheinlichste Bausteine die Coenzym-A-Verbindung einer Zimtsäure und 3 Moleküle Malonyl-CoA². Durch Kondensation dieser Verbindungen würde zunächst ein Chalkon entstehen, das in einem Gleichgewicht mit dem entsprechenden Flavanon steht. Das natürliche Vorkommen optisch aktiver Flavanone³ läßt sich nur mit einer enzymatischen Umwandlung Chalkon $\rightleftharpoons$ Flavanon erklären. Aus Zitronenschalen (*Citrus aurantium*) gewann SHIMOKORIYAMA⁴ einen Extrakt, der diese Umwandlung katalysiert, und Extrakte aus *Cosmos sulphureus* und *Coreopsis lanceolata* verwandeln Chalkonglykoside in die entsprechenden Benzalcumaronglykoside⁵.

Bei der Biosynthese der Isoflavone konnten wir die Umwandlung des 4.4'.6'-Trihydroxy-chalkon-4'-glucosid- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ in das Formononetin beweisen^{6,7}. Der Gedanke lag deshalb nahe, ein geeignet substituiertes ^{14}C -markiertes Chalkon als gemeinsame Vor-

stufe für Anthocyane und Flavonole zu prüfen. Durch Kondensation von *p*-Hydroxybenzaldehyd- $[\text{carbonyl-}^{14}\text{C}]$ ⁶ mit 2-(Tetraacetylglucosido)-4-benzoyl-phloracetophenon⁸ erhielten wir 2'.4.4'.6'-Tetrahydroxy-chalkon-2'-glucosid- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ (I), das sich als Vorstufe für Cyanidin und Quercetin erwies.



Methode

2'.4.4'.6'-Tetrahydroxy-chalkon-2'-glucosid- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$

29 mg *p*-Hydroxybenzaldehyd- $[\text{carbonyl-}^{14}\text{C}]$ (spez. Aktivität 3 mC/mMol) wurden mit 150 mg 2-(Tetraacetylglucosido)-4-benzoyl-phloracetophenon unter den von ZEMPLÉN⁸ angegebenen Bedingungen unter Stickstoff zur Kondensation gebracht und aufgearbeitet. Während bei den inaktiven Vorversuchen ein kristallisiertes Chalkonglycosid erhalten werden konnte, kristallisierte die ^{14}C -markierte Verbindung nicht. Zur Reinigung wurde sie im Streifen auf Schleicher Schüll-Karton 2071 aufgetragen und absteigend mit Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) chromatographiert. Nach Elution der Chalkonzone ($R_f=0,45$) mit Methanol unter Stickstoff wurde in Anteilen von je 3 mg noch 3-mal auf Schleicher & Schüll 2043 b (säuregewaschen)

* Fortsetzung der Arbeiten „Zur Biogenese des Cyanidins“. III. Mitt.: H. GRISEBACH, Z. Naturforschg. **13 b**, 335 [1958].

¹ H. GRISEBACH u. M. BOPP, Z. Naturforschg. **14 b**, 485 [1959].

² Zusammenfassungen siehe: A. C. NEISH, Ann. Rev. Plant Physiol. **11**, 55 [1960]; L. BOGORAD, Ann. Rev. Plant Physiol. **9**, 417 [1958]; H. GRISEBACH u. W. D. OLLIS, Experientia [Basel] **11**, 4 [1961]; vgl. J. D. BU'LOCK u. H. M. SMALLEY, Proc. chem. Soc. [London] **1961**, 209.

³ W. KARRER, Konstitution und Vorkommen Organischer

Pflanzenstoffe (exclusive Alkaloide), Birkhäuser Verlag, Basel 1958.

⁴ M. SHIMOKORIYAMA, J. Amer. chem. Soc. **79**, 4199 [1957].

⁵ M. SHIMOKORIYAMA u. S. HATTORI, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2277 [1953].

⁶ H. GRISEBACH u. L. PATSCHKE, Chem. Ber. **93**, 2326 [1960].

⁷ H. GRISEBACH u. G. BRANDNER, Z. Naturforschg. **16 b**, 2 [1961].

⁸ G. ZEMPLÉN u. R. BOGNÁR, Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 1040 [1942].

mit Essigester/Ameisensäure/Wasser (10 : 2 : 3) chromatographiert ($R_f=0,72$). Chromatogramme des so gereinigten Chalkons mit verschiedenen Laufmittelsystemen zeigten im Radio-Papierchromatographen keine radioaktiven Verunreinigungen mehr.

Versuche mit Rotkohl

Die Ankeimung der Samen (Sorte Dauerrot) erfolgte in Petrischalen. 90 5 Tage alte Keimlinge ohne Wurzeln erhielten 1 mg radioaktives Chalkonglucosid in dest. Wasser. Versuchsdauer 3 Tage unter Belichtung wie früher angegeben⁹. Die Aufarbeitung der Pflänzchen erfolgte ebenfalls wie schon beschrieben⁹. Das mit 120 mg Cyanidinchlorid verdünnte und 1-mal aus 7-proz. HCl umkristallisierte Cyanidinchlorid wurde zur weiteren Reinigung in 5 cm³ Methanol + 1 Tropfen 20-proz. HCl gelöst, die Lösung auf eine Polyamidsäule (25 · 4,5 cm; Ultramid Pulver K 228/BM 2 *) gegeben und mit Methanol/konz. HCl (200 : 0,5 vol.) entwickelt. Nach Zusatz von 10 cm³ 8-proz. HCl zur Anthocyanfraktion entfernte man das Methanol im Vakuum. Das nach Erkalten auskristallisierte Cyanidin (100 mg) wurde zur weiteren Reinigung in das Pikrat überführt¹⁰. Die Spaltung des Pikrats ergab 74 Milligramm. Zur Alkalischemelze des Cyanidins wurden 50 mg eingesetzt. In Abänderung der früheren Angaben⁹ setzte man jedoch nach der Schmelze keine Protocatechusäure und kein Phloroglucin zu. Die ätherische Lsg. der Protocatechusäure wurde durch präparative Papierchromatographie mit Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1) gereinigt und nach der Elution aus dem Papier die Konzentration bei 293 m μ und 257 m μ bestimmt (5,4 mg). Das Phloroglucin wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie mit dem System Benzol/Äthanol (70 : 29) gereinigt.

Versuche mit Buchweizen

50 10 Tage alte Buchweizenkeimlinge ohne Wurzeln erhielten 0,9 mg des Chalkonglucosids in dest. Wasser. Nach 48 Stdn. Wachstum unter Belichtung wurde wie früher beschrieben aufgearbeitet¹. Das aus dem Papierchromatogramm eluierte Rutin wurde nach der Konzentrationsbestimmung bei 357 m μ mit 3 mg inaktivem Rutin verdünnt und zur Hydrolyse 1 Stde. mit 1 cm³ 2-n. HCl unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Entfernung der HCl durch Gefriertrocknung löste man den Rückstand in wenig Methanol und chromatographierte auf Whatman Nr. 3 mit Eisessig/Wasser (3 : 2). Nach Elution der Quercetinzone mit Methanol wurde mit 20 mg Quercetin verdünnt und 2-mal aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Die Anthocyanzone der ersten Chromatographie eluierte man mit Methanol und verfuhr weiter wie beim Rotkohlversuch beschrieben.

Messung der Radioaktivität

Die Substanzen wurden nach Verbrennung als Kohlendioxyd im Proportionalzählrohr (Zählgerät UNI Z der Firma Berthold) gemessen¹¹.

Ergebnisse

1. Versuche mit Rotkohl

Gabe des radioaktiven Chalkonglucosids an Rotkohlkeimlinge ohne Wurzeln ergab nach Isolierung, Hydrolyse und Reinigung des Anthocyan radioaktives Cyanidinchlorid. Dieses wurde durch Alkalischemelze zu Protocatechusäure und Phloroglucin abgebaut⁹. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen des Cyanidins nach verschiedenen Reinigungsschritten und der Abbauprodukte sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Verbindung	[ipm/mMol]	Reinigungsschritte
Cyanidin-chlorid	29620	2-mal umkristallisiert Polyamidsäulenchromatographie
Cyanidin-chlorid	23150	1-mal umkristallisiert nochmals umkristallisiert
Cyanidin-chlorid	19595	Reinigung über das Pikrat
Cyanidin-chlorid	21789	Zweite Reinigung über Pikrat
Protocatechusäure	23133	1-mal chromatographiert
Phloroglucin	0	1-mal chromatographiert

Tab. 1. Aktivität des Cyanidins nach verschiedenen Reinigungsschritten und Aktivität der Abbauprodukte des Cyanidins.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß es verschiedener Reinigungsschritte bedarf, bis das Cyanidin konstante spezifische Aktivität erreicht hat. Wie bei einem intakten Einbau des Chalkons zu erwarten ist, befindet sich die gesamte Aktivität in der Protocatechusäure (C-2; die Säure war nicht ganz sauber, so daß sie daher möglicherweise eine etwas höhere Aktivität als das reine Cyanidin besitzt).

2. Versuche mit Buchweizen

Nach Gabe von I an Buchweizenkeimlinge ohne Wurzeln wurden nach papierchromatographischer Trennung von Rutin und Anthocyan, Hydrolyse und Reinigung radioaktives Quercetin und Cyani-

⁹ H. GRISEBACH, Z. Naturforschg. **12 b**, 227 [1957].

* Der Badischen Anilin- und Sodafabrik danken wir für die Überlassung des Polyamidpulvers.

¹⁰ A. ROBERTSON u. R. ROBINSON, J. chem. Soc. [London] **1928**, 1526.

¹¹ H. SIMON, H. DANIEL u. F. KLEBE, Angew. Chem. **71**, 303 [1959].

din gewonnen. Durch Konzentrationsbestimmung des unverdünnten Rutins bei 357 m μ und dessen Aktivitätsmessung konnte die Verdünnung der spez. Aktivität beim Einbau des Chalkons errechnet werden (Tab. 2).

Verbindung	[ipm/ μ Mol]	Gesamtmenge	Verdünnung*	Einbaurrate
Chalkonglucosid	5513000	0,9 mg (2 μ Mol)		
Rutin	11450	4,04 mg (6,63 μ Mol)	480	0,6%

$$* \text{ Verdünnung} = \frac{\text{spez. Aktivität Chalkonglucosid}}{\text{spez. Aktivität Rutin}}$$

Tab. 2. Verdünnung der spez. Aktivität und Einbaurrate von I in Rutin.

Da sich das unverdünnte Anthocyan bei diesem Versuch teilweise zersetzte, kann über den Einbau von I in diese Verbindung keine quantitative Aussage gemacht werden. Qualitativ war jedoch der Einbau in das Cyanidin stärker.

Zur Lokalisierung der Aktivität im Quercetin wurde dieses, entsprechend den Angaben von UNDERHILL und Mitarbb.¹², über den Quercetinpentamethyläther in 2'-Hydroxy-2,4,6'-trimethoxyacetophenon und Veratrumsäure gespalten. Alle Aktivität befindet sich dabei in der Veratrumsäure (Tab. 3).

Verbindung	[ipm/mMol]	Aktivität von Quercetin [%]
Quercetin-pentamethyläther	17 448	100
Veratrumsäure	16 829	97

Tab. 3. Aktivitätsverteilung im Quercetin nach alkalischer Hydrolyse.

Ebenso wie beim Cyanidin tritt also auch beim Einbau des Chalkons in das Quercetin keine Verteilung der Radioaktivität ein.

* Da in wässriger Lösung ein Gleichgewicht zwischen Chalkon und dem Flavanon vorliegt, gelten alle Überlegungen ebenso gut für letztere Verbindung. Vgl. I. c.⁴.

¹² E. W. UNDERHILL, J. E. WATKIN u. A. C. NEISH, Can. J. Biochem. Physiol. 35, 219 [1957].

Diskussion

Da beim Einbau des Chalkons* in Cyanidin und Quercetin keinerlei Verteilung der Radioaktivität auftritt, ist der intakte Einbau des Chalkons in diese Verbindungen sehr wahrscheinlich. Ein vorhergehender Abbau des Chalkons zu einer Phenylpropanvorstufe, deren Einbau zur gleichen Markierung führen würde, ist sehr unwahrscheinlich, wie schon früher erörtert wurde⁶. Beim Einbau des 4,4',6'-Trihydroxy-chalkon-4'-glucosid-[β -¹⁴C] in das 7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavon konnte ein derartiger Abbau ausgeschlossen werden⁷. Die Verdünnung der spez. Aktivität des Chalkons ist gleich groß wie beim Einbau in das Isoflavon⁷. Bei Bewertung dieser Größe und der Einbaurrate muß berücksichtigt werden, daß sicher nur ein Teil des Chalkons an den Synthesort in der Zelle gelangt.

Aus den Ergebnissen kann daher der Schluß gezogen werden, daß die Pflanze das Chalkon in der Weise zu verändern vermag, daß einerseits ein Anthocyan, andererseits ein Flavonol entsteht, wobei zusätzlich eine Hydroxylgruppe am C-3 des Chalkons (bzw. C-3' der Flavanoide) eingeführt wird. Sehr wahrscheinlich wird daher auch der Oxydationszustand des Heterocyclus der Flavonoide und des Ringes B im Zuge der Biosynthese erst auf der Chalkonstufe oder einer nahe verwandten C₁₅ Zwischenstufe festgelegt¹³.

Ob die Chalkone die eigentlichen biogenetischen Zwischenstufen** sind oder nur leicht in diese übergehen können, läßt sich aus unseren bisherigen Versuchen nicht sagen. Tritt das Chalkon als freie Zwischenstufe auf, so sollte es möglich sein, bei Gabe einer ¹⁴C-markierten Phenylpropanvorstufe das radioaktive Chalkon durch Verdünnungsanalyse abzufangen. Entsprechende Versuche und weitere Untersuchungen über die Umwandlung von I in anderen Pflanzen sind im Gange.

Diese Arbeit wurde in dankenswerter Weise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. Weiterhin danken wir dem Fonds der Chemie und der Badischen Anilin- und Sodafabrik für Sachbeihilfen.

¹³ Vgl. A. J. BIRCH, XVII. Internationaler Kongreß für Reine u. Angewandte Chemie, Verlag Chemie 1960, Band II, S. 73.

** Zur Definition Vorstufe (precursor) und Zwischenstufe (intermediate) s. B. D. DAVIS, Advances in Enzymol. 16, 247 [1955].