

Natürliche Hemmstoffe von Keimung und Wachstum II

Isolierung und Struktur von Hemmstoffen aus *Avena sativa* L.⁺

Natural Inhibitors of Germination and Growth II

Isolation and Structure of Inhibitors from *Avena sativa* L.

Edith Lohaus *, Inge Blos *, Wolfram Schäfer ** und Wolfhart Rüdiger *,

* Botanisches Institut der Universität München, Menzinger Straße 67, 8000 München 19 und

** Max-Planck-Institut für Biochemie, 8033 Martinsried

Z. Naturforsch. 37 c, 802–811 (1982); received April 27, 1982

Amaranthus caudatus, *Avena sativa*, Dihydrohematinic Acid, Dimethoxyacetophenone, Dimethoxybutylbenzene, Seed Germination.

Extracts from oat husks which inhibit germination of a variety of seeds were fractionated. After mild alkaline hydrolysis, two active fractions A₁ and A₂ were obtained. From A₁ which contains mainly aliphatic di- and tricarboxylic acids, the inhibitor was isolated by chromatographic procedures and identified as 1,3,4-pentanetricarboxylic acid (**11 b**) by mass spectrometry. The structure was confirmed by total synthesis of the compound in the form of a mixture of diastereomers **11 a/11 b**. From A₂, two aromatic compounds were isolated by chromatography and identified by gas chromatography and mass spectrometry as 3,4-dimethoxyacetophenone (**12**) and dimethoxybutylbenzene. Compounds with similar structures were compared with the natural germination inhibitors with regard to their bioactivity.

Einleitung

In der vorstehenden Arbeit [1] war gezeigt worden, daß in Extrakten aus Haferspelzen Keimungshemmstoffe enthalten sind. Bei der Fraktionierung durch Verteilung zwischen Wasser und Ether ging nur ein Teil der Hemmaktivität in die organische Phase, während ein anderer Teil der Hemmaktivität in der wäßrigen Phase verblieb. Neben der Möglichkeit, daß in der wäßrigen Phase völlig andere Hemmstoffe vorliegen als in der Etherphase, war die andere Möglichkeit ins Auge zu fassen, daß neben freien (etherlöslichen) Hemmstoffen auch gebundene (wasserlösliche) Hemmstoffe vorkommen. Glykoside von Pflanzenhormonen und ähnlichen Wirkstoffen wurden bereits mehrfach beschrieben, u. a. von Gibberellinsäure [2], Indoleessigsäure [3], Abscisinsäure [4], Benzoxazolinon-Vorstufen [5], Phenolcarbonsäuren [6, 7]. Voraussetzung zur Entfaltung der Wirkung scheint eine Abspaltung des Zuckerrestes zu sein (vgl. [8]).

Im folgenden wird die Hydrolyse der in der wäßrigen Phase vorliegenden Verbindungen sowie die nachfolgende Isolierung und Strukturaufklärung freier Hemmstoffe beschrieben.

Material und Methoden

Extraktion und Fraktionierung von Hemmstoffen

100 g Spelzen von *Avena sativa* wurden mit 1 l Wasser bei 100 °C extrahiert und aufgearbeitet wie vorher beschrieben [1]. Die Chromatographie an Acrylex P 2 wurde ausgelassen. Das in 100 ml Wasser aufgenommene Lyophilisat wurde direkt mit Ether zunächst bei pH 7, dann bei pH 1 extrahiert. Die verbleibende wäßrige Phase wurde mit 33-prozentigem NH₃ auf pH 11 gebracht und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der pH-Wert unter Eiskühlung auf 1 eingestellt und die angesäuerte Lösung erschöpfend mit Ether extrahiert.

Der Rückstand der Etherphase wurde von 5 Aufarbeitungen gesammelt, in wenig Wasser aufgenommen und auf eine mit Wasser äquilibrierte Säule von Sephadex LH 20 (50 × 600 mm) gegeben. Die Hemmstoffe wurden mit Wasser bei einer Durchflußrate von 30 ml/h eluiert (Abb. 1). Eine Hemmwirkung wurde nur in den Fraktionen A₁ und A₂ gefunden (Keimtest mit *Amaranthus caudatus*, vgl. [1]).

Die hemmenden Fraktionen A₁ und A₂ wurden getrennt gefriergetrocknet und mit etherischer Diazomethanolösung versetzt, bis die Stickstoffentwicklung nachließ und die gelbe Farbe des Diazomethan erhalten blieb. Die Lösung ließ man noch

⁺ Herrn Professor Dr. H. Schildknecht zum 60. Geburtstag gewidmet.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Rüdiger.

0341-0382/82/0900-0802 \$ 01.30/0

ca. 12 h bei 4 °C eventuell unter erneuter Zugabe von Diazomethan reagieren. Nach Abgießen von unlöslichem Rückstand wurde die Etherlösung der methylierten Produkte in eine Sublimationsapparatur überführt. Ether und Diazomethan wurden im Stickstoffstrom entfernt. Die Kurzwegdestillation des Rückstandes erfolgte 1 h bei 120 °C/0,2 Torr. Das Destillat wurde mit wenig Ether vom Sublimationsfinger gelöst. Der Destillationsrückstand, der sich nur in Methanol löste, enthielt keine Hemmaktivität mehr.

Die Etherlösung des Destillats, das die gesamte Hemmaktivität enthielt, wurde im Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wurde in ca. 3 ml *n*-Hexan/Ethylacetat (1 : 1) aufgenommen, die Lösung zur Trennung durch Liquid-Chromatographie (LC) auf eine Säule (10 × 200 mm) gegeben, die mit Kieselgel (Lichroprep Si 60, Fa. Merck) gefüllt und mit *n*-Hexan äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit *n*-Hexan, dem steigende Mengen Ethylacetat zugesetzt wurden (5–50%). Es wurden Fraktionen von je 0,5 ml aufgefangen. Von allen Fraktionen wurden Aliquote für die Gaschromatographie (1–2 µl) und für den Biotest (100–200 µl) entnommen. Die Ergebnisse der Aufarbeitung von Fraktion A₁ sind in Abb. 3 und 4, die von Fraktion A₂ in Abb. 8 zu finden.

Hemmfraktion A₁

Der Rückstand der LC-Fraktion 71 (vgl. Abb. 4) wurde durch Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC Waters System Modell 6000 A mit Injektor UGK, UV/S-Detektor Modell 1202 der Fa. Latek, Stahlsäule 20 × 250 mm) an Lichroprep RP 8 (5–20 µm) mit einem Methanol/Wasser-Gradienten (von 30 bis 100% Methanol) weiter aufgetrennt. Zunächst wurde das Elutionsdiagramm durch Messung der Absorption bei 254 nm aufgenommen. Dann wurden die Fraktionen gaschromatographisch untersucht (s. oben). Alle Fraktionen, die die Komponente mit Retentionszeit 29,5 nm enthielten, wurden vereinigt und erneut durch Säulenchromatographie an Lichroprep Si 60 mit Hexan/Ethylacetat gereinigt (Ergebnis in Abb. 5).

Hemmfraktion A₂

Da die LC-Fraktionen 27–29 die höchste Bioaktivität aufwiesen (vgl. Abb. 8), wurde Fraktion 28 mittels Gaschromatographie/Massenspektro-

metrie untersucht. Die Hauptkomponente besitzt eine Retentionszeit von 27,3 min, daneben findet man eine Nebenkomponekte bei einer Retentionszeit von 26,7 min. Beide Komponenten zeigen einen Anstieg bzw. Anfall in den LC-Fraktionen 25–30 parallel mit dem Anstieg bzw. Abfall der Bioaktivität. Die Massenspektren der beiden Verbindungen sind in Abb. 9 a, b zu finden.

Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie erfolgte mit Glaskapillarsäulen (Länge 20 bzw. 25 m) entweder OV 101 oder SP 1000 (belegt mit FFAP). Geräte: Carlo Erba Model 2300 bzw. 2101 AC. Detektion durch Flammenionisationsdetektor. Trägergas Helium bzw. Stickstoff (Flußrate 2 cm³ min⁻¹). Injektortemperatur 225 °C, Injektion splitlos; Temperaturprogramm 60–240 °C mit 3 ° min⁻¹.

Für die GC-MS-Kopplung wurde ein System, bestehend aus dem Massenspektrometer Varian CH 7A, Datensystem SS188MS und dem Gaschromatograph Carlo Erba 2101 AC verwendet. Ionisierungsenergie 70 eV. Das hochauflösende Massenspektrum wurde mit dem MS-Datensystem ZAB/V6-Multispec der Firma Vakuum Generators aufgenommen.

Synthese von Modellverbindungen

Dihydrohämatinsäure (11 a, b)

Nach der Vorschrift von Gray und Nicholson [14] wurde Cyanessigester zunächst mit α -Brompropionsäure, das entstandene Produkt dann mit β -Brompropionsäure umgesetzt. Nach Hydrolyse mit siedender HCl wurde ein Gemisch von erythro- und threo-Verbindung **11 a/11 b** kristallin (aus Aceton) erhalten. Durch Umkristallisation aus halbkonzentrierter Salzsäure wurde aus 3,0 g des Gemisches **11 a/11 b** die erythro-Verbindung **11 a** rein erhalten (Kontrolle durch Gaschromatographie nach Methylierung mit Diazomethan) und aus Aceton erneut umkristallisiert, Ausbeute 0,3 g, Schmp. 169 °C (170 °C [14]). Die Mutterlauge der Kristallisation aus Salzsäure wurde i. Vak. über KOH zur Trockene gebracht, der kristalline Rückstand wurde aus Aceton umkristallisiert, Ausbeute 0,1 g. Entsprechend der Gaschromatographie des Trimethylesters handelt es sich um die threo-Verbindung **11 b**, die < 1% **11 a** enthält. Schmp. 139 °C (144 °C [14]).

Ergebnisse und Diskussion

Aus dem wäßrigen Rohextrakt von Haferspelzen kann bei pH 7 und pH 1 ca. 50% der Hemmaktivität mit Ether extrahiert werden [1]. Alle noch in der hydrophilen Phase vorhandene Aktivität wird durch Hydrolyse mit Ammoniak und nachfolgendes Ansäuern mit Ether extrahierbar. Durch saure oder enzymatische Hydrolyse (Glykosidasen, Esterasen, Pektinasen) ist nur ein Teil der Hemmaktivität in Ether überführbar. Wahrscheinlich lagen wasserlösliche Ester der Hemmstoffe vor.

Die etherlöslichen Hydrolyseprodukte wurden durch Chromatographie an Sephadex LH 20 weiter aufgetrennt (Abb. 1). Die Hemmaktivität fand man in den Fraktionen A₁ und A₂. Während Fraktion A₁ eine im Vergleich zur Hemmwirkung geringe UV-Absorption aufweist, absorbiert Fraktion A₂ im UV-Bereich relativ stark. Phenolcarbonsäuren (z. B. *p*-Cumarsäure und ähnliche Verbindungen), die eine starke UV-Absorption besitzen und die als Hemmstoffe diskutiert worden waren (vgl. [1]) wurden deutlich nach der Hemmaktivität eluiert. Es muß sich also bei den in den Fraktionen A₁ und A₂ enthaltenen Stoffen um Hemmstoffe anderer Strukturtypen handeln.

Hemmstoff aus Fraktion A₁

Nach den IR-Spektrum des Rückstandes von Fraktion A₁ [9] waren hier aliphatische Carbonsäuren enthalten. Um flüchtige, der gaschromatographischen Analyse zugängliche Derivate zu erhalten, haben wir diese Säurefraktion mit Diazomethan methyliert. Die Bioaktivität blieb bei dieser Umset-

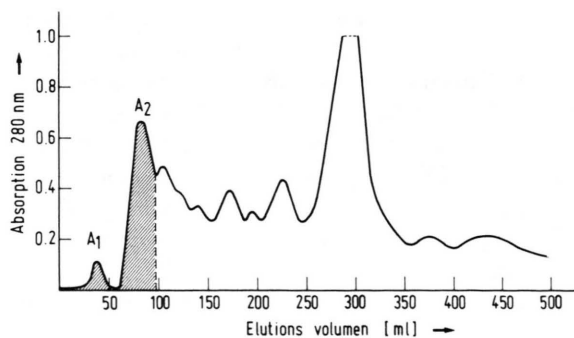


Abb. 1. Elutionsdiagramm der Chromatographie an Sephadex LH-20 der etherlöslichen Hydrolyseprodukte aus einem Rohextrakt von 100 g Haferspelzen. Fraktionen mit Hemmaktivität schraffiert.

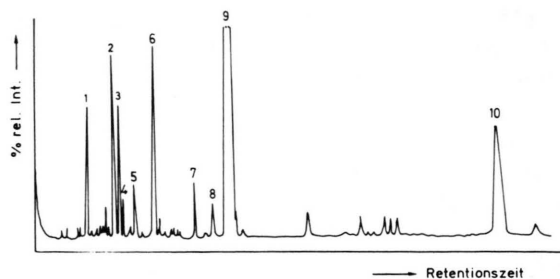


Abb. 2. Gaschromatogramm der Fraktion A₁ (vgl. Abb. 1) nach Methylierung und Kurzwegdestillation. Glaskapillare SP 1000. Sonstige Bedingungen in Material und Methoden. Die Nummern entsprechen den in Tab. I aufgeführten Verbindungen.

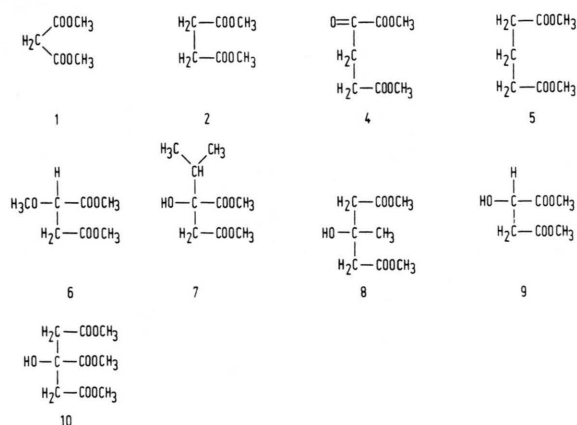
zung vollständig erhalten. Daß die Hemmstoffe selbst mit Diazomethan reagiert hatten, ließ sich wie folgt zeigen: Die Hemmstoffe der Fraktion A₁ sind nicht flüchtig; bei Versuchen zur Kurzwegdestillation (100 °C Badtemperatur, 1 Torr) blieb die Bioaktivität im Rückstand. Bei längerem Erhitzen auf 200 °C ging die Aktivität verloren. In keinem Fall war Hemmaktivität im Destillat nachweisbar. Dagegen fand man bei der Kurzwegdestillation der Zone A₁ nach Methylierung die Bioaktivität quantitativ im Destillat; der Rückstand enthielt keine Aktivität mehr.

Die Methylierung und anschließende Kurzwegdestillation wurden daher als nächste, sehr effektive Reinigungsmethode angeschlossen. Die gaschromatographische Analyse des Destillats auf einer polaren GC-Kapillare (SP 1000) zeigt, daß neben einer Hauptkomponente ca. 10 NebenkompONENTEN und eine große Zahl von Spurenkomponenten vorhanden waren, die Hemmstoffe enthalten können (Abb. 2). Durch GC/MS-Analyse wurden 9 Komponenten identifiziert (Tab. I). Die Hauptkomponente 9, Äpfelsäuredimethylester, sowie die NebenkompONENTEN 1, 2, 5 und 10 zeigen im Konzentrationsbereich von $1 - 2 \times 10^{-4}$ M keine Hemmwirkung bei der Keimung; bei 1 und 9 war sogar eine Wachstumsförderung der Keimwurzel zu beobachten.

Der in kleiner Menge gefundene Methoxybernsteinsäuredimethylester (6) ist wahrscheinlich aus der Hauptkomponente 9 erst bei der Umsetzung mit Diazomethan entstanden. Kontrollversuche zeigten, daß authentisches 9 bei längerer Einwirkung von Diazomethan kleine Mengen (maximal 5%) an 6 liefert, obwohl alkoholische Hydroxygruppen eigentlich nicht methyliert werden sollten.

Tab. I. Massenspektrometrische Identifizierung der nach GC/MS-Trennung der Fraktion A₁ erhaltenen Komponenten. Die angegebenen Komponenten wurden – soweit sie durch Massenspektren erfaßt wurden – im Gaschromatogramm Abb. 1 nach steigenden Retentionszeiten numeriert. Die Strukturen **1**, **2**, **4**, **5**, **9** und **10** wurden durch Aufnahme der Massenspektren der authentischen Verbindungen, die Strukturen **6**, **7** und **8** durch Vergleich mit Literaturdaten [16] abgesichert.

Nr.	Summenformel Name d. Verbindung	Mol- Gew.	Massenspektrum <i>m/e</i> [% rel. Int.]
1	C ₅ H ₈ O ₄ , Malonsäuredimethylester	132	132(4), 101 (100), 74(53), 59(94), 57(32), 45(5)
2	C ₆ H ₁₀ O ₄ , Bernsteinsäuredimethylester	146	115 (100), 114(27), 87(15), 59(18), 55(26)
3	Methoxycarbonsäureester		126(3), 104(8), 103(5), 101(3), 75(6), 73(18), 72(39), 59(52), 60(14), 45 (100)
4	C ₇ H ₁₀ O ₅ , α-Ketoglutaräuredimethylester	170	144(2), 143(3), 135(3), 116(6), 115 (100), 113(34), 112(6), 95(7), 87(22), 59(18), 57(83), 55(43), 45(45)
5	C ₇ H ₁₂ O ₄ , Glutarsäuredimethylester	160	129(86), 128(67), 101(65), 100(96), 87(30), 74(11), 69(6), 59 (100), 58(11), 55(60)
6	C ₇ H ₁₂ O ₅ , Methoxybernsteinsäuredimethylester	176	146(7), 117(68), 85(3), 75 (100), 59(21), 55(5), 47(7), 45(5)
7	C ₉ H ₁₆ O ₅ , Isopropyläpfelsäuredimethylester	204	161(9), 145(65), 127(17), 113(21), 102(14), 101(28), 85(4), 74(11), 71 (100), 59(12), 45(5)
8	C ₈ H ₁₄ O ₅ , β-Hydroxy-β-Methylglutarsäuredimethylester	190	175(7), 143(33), 117 (100), 101(26), 85(77), 75(13), 74(12), 59(14)
9	C ₈ H ₁₀ O ₅ , Äpfelsäuredimethylester	162	131(9), 130(7), 113(7), 104(6), 103 (100), 74(8), 71(81), 61(47), 59(24)
10	C ₉ H ₁₄ O ₇ , Citronensäuretrimethylester	234	175(20), 152(4), 144(8), 143 (100), 111(4), 101(66), 69(9), 59(23), 57(9)



Da die identifizierten Verbindungen keine Hemmwirkung zeigten, mußte der Hemmstoff durch weitere Konzentrierung und Auftrennung aus den Spurenkomponenten angereichert werden. Dies geschah durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit

Hexan/Ethylacetat. Eine Hemmwirkung wurde dabei in den Fraktionen 68 bis 73 beobachtet. Alle Fraktionen der Säulenchromatographie wurden nach Konzentrierung gaschromatographisch untersucht. Aufgrund der Anreicherung in den einzelnen säulenchromatographischen Fraktionen wurden jetzt zahlreiche Spurenkomponenten in den Gaschromatogrammen sichtbar, die im ursprünglichen GC (vgl. Abb. 2) noch nicht erkennbar waren. Das Ergebnis der GC-Analysen der LC-Fraktionen 62–75 ist in Abb. 3 dargestellt. Das Diagramm zeigt, daß die Komponente mit der Retentionszeit 29,5 min als einzige in *allen* hemmenden Fraktionen (68–73), aber *nur* in diesen vorkommt. Die anderen GC-Komponenten werden auch in LC-Fraktionen ohne Hemmwirkung oder nur in einem Teil der Fraktionen mit Hemmwirkung (z. B. 69–71) gefunden; sie können somit nicht den für die Hemmwirkung verantwortlichen Stoff enthalten. Abb. 4 zeigt, daß die

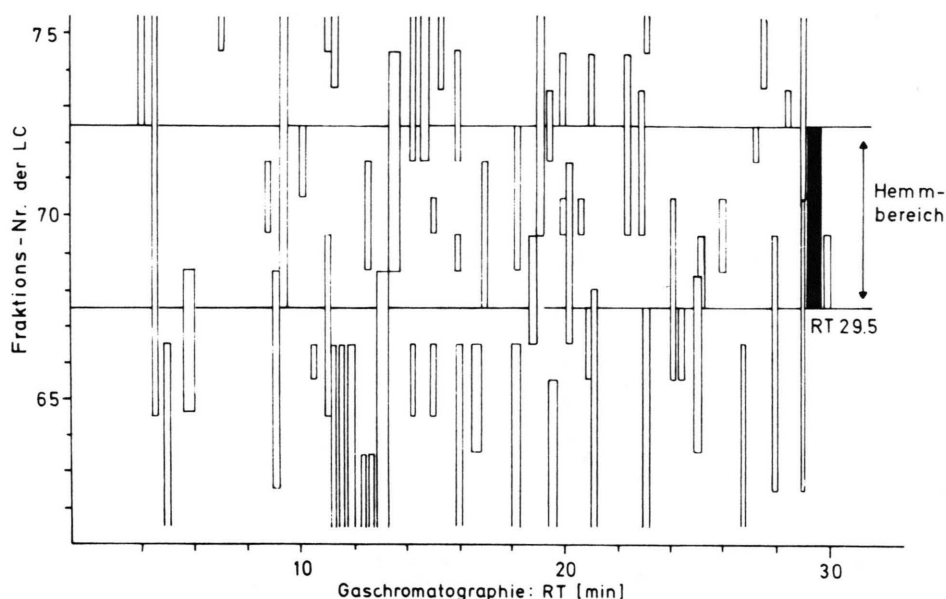


Abb. 3. Gaschromatographische Analyse der Fraktionen 62–75 der Säulenchromatographie (LC) an Kieselgel. Glas-kapillarsäule OV 101; 25 m Länge. Analoge GC-Komponenten sind als senkrechte Balken dargestellt, deren horizontale Dimension ein qualitatives Maß der Konzentration darstellt. Schwarz: Hemmstoff mit Retentionszeit 29,5 min.

Konzentration des Hemmstoffs in Fraktionen 68–73 tatsächlich mit der biologischen Aktivität korreliert. Durch weitere verlustreiche Reinigung mittels HPLC und anschließender Rechromatographie an Kieselgel, stets unter Kontrolle des Biotests [1], wurde die Substanz mit der Retentionszeit 29,5 min fast rein erhalten. Die Endstufe der Reinigung zeigt Abb. 5.

Identifizierung des Hemmstoffs

Da von dem Hemmstoff nur kleine Mengen zur Verfügung standen, wurden zur Strukturaufklärung hauptsächlich mikroanalytische und spektroskopische Methoden herangezogen. Die Gaschromatographie der Hemmfraction mit einem für Stickstoffverbindungen spezifischen Detektor zeigte, daß der

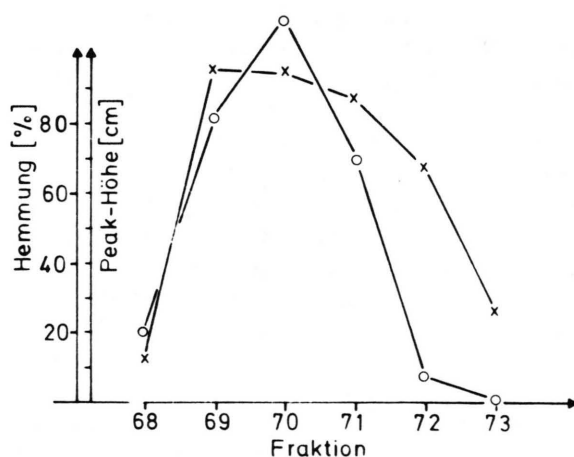


Abb. 4. Korrelation der Hemmwirkung und der Peakhöhe der Komponente mit Retentionszeit 29,5 min. Untersucht wurden die Fraktionen 68–73 der Säulenchromatographie an Kieselgel. Zur Gaschromatographie vgl. Abb. 3.

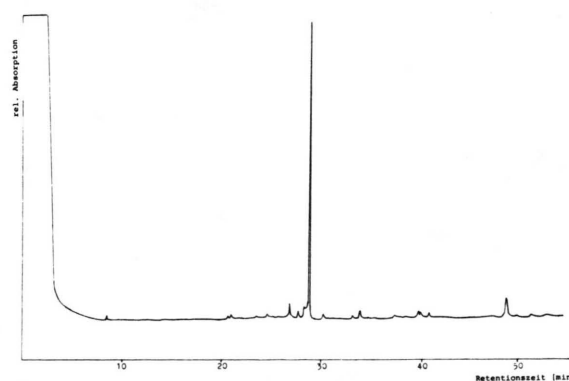


Abb. 5. Gaschromatogramm des Hemmstoffs **11 b** (Retentionszeit 29,5 min) nach Reinigung der HPLC und Rechromatographie an Kieselgel (vgl. Material und Methoden). Bedingungen der Gaschromatographie vgl. Abb. 3.

Hemmstoff keinen Stickstoff enthält. Der gereinigte Hemmstoff zeigt keine UV-Absorption. Das durch GC-MS-Kopplung erhaltene Massenspektrum (Abb. 6a) weist auf einen Carbonsäuremethylester hin (Fragmente bei m/e 59, 74, 88). Das Fragment mit der höchsten Masse bei m/e 215 kann nicht das Moleküllion sein, da hierfür eine gerade Masse zu fordern ist. Moleküllionen werden in der Regel bei Di- und Tricarbonsäuremethylestern nicht beobachtet, vielmehr findet man als Ionen der höchsten Masse Fragmente bei $M^+(\text{OCH}_3)$ oder $M^+(\text{COOCH}_3)$. Die Verbindung ließ sich im Gegensatz zu Hydroxycarbonsäureestern nicht trimethylsilylieren, besitzt also keine freie Hydroxylgruppe. Nach diesen Ergebnissen konnten ein Methoxydicarbonsäuremethylester ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_5$, MG 246 bzw. $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_5$, MG 274) oder ein Tricarbonsäuremethylester ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_6$, MG 246 bzw. $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_6$, MG 274) vorliegen. Der Verlust von OCH_3 bzw. COOCH_3 würde bei diesen Verbindungen die Entstehung des Ions m/e 215 erklären.

Die Entscheidung zwischen beiden Verbindungstypen ist durch Methylierung des Hemmstoffs mit Deuteriodiazomethan herbeizuführen. Die Methylierung wird bei 8 °C ausgeführt und das überschüssige Deuteriodiazomethan sofort nach Beendigung der Stickstoffentwicklung entfernt, damit eventuelle unspezifische Methylierungen vermieden werden (vgl. Diskussion zu Tab. I). Das Fragment m/e 215 wird dadurch um 6 Masseneinheiten nach m/e 221 verschoben (Abb. 6b). Dieses Ergebnis fordert die Struktur eines Tricarbonsäuremethylesters. Die Entscheidung zwischen den beiden möglichen Estern liefert das Massenspektrum hoher Auflösung (Tab. II). Das Fragment bei m/e 215 hat die Elementarzusammensetzung $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_5$, die Summenfor-

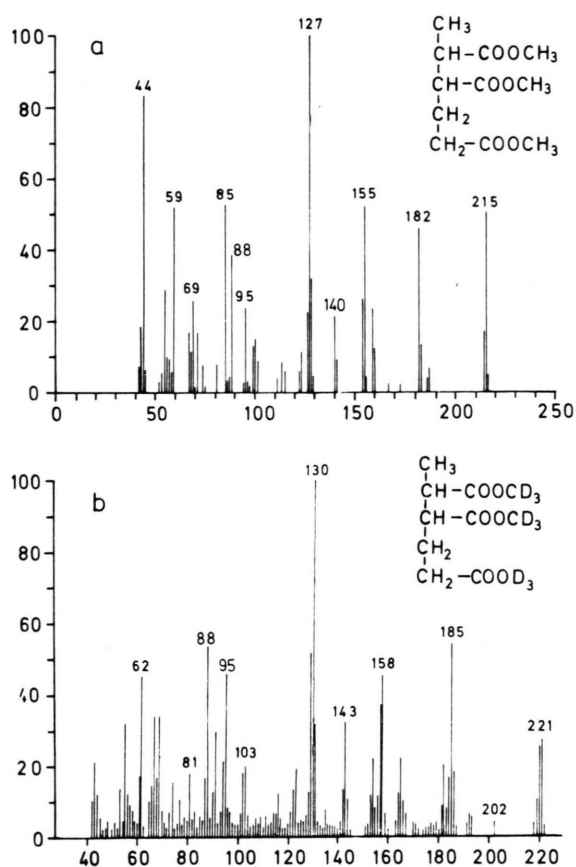


Abb. 6. Massenspektren des Hemmstoffs **11 b** (Retentionszeit 29,5 min) aufgenommen durch GC/MS-Kupplung. a) Methylierung mit Diazomethan; b) Methylierung mit Deuteriodiazomethan

mel des Pentantricarbonsäuretrimethylesters **11** ist deshalb $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_6$ (MG 246).

Die Massenspektren niederer und hoher Auflösung erlauben zwischen den Strukturisomeren Pentantricarbonsäuretrimethylestern zu unterscheiden. Die Bruchstücke bei m/e 88 und m/e 159 (M^+-87) weisen auf einen α -Methylcarbonsäuremethylester hin. Strukturisomere, die monosubstituierte Malonsäure-, Methylmalonsäure- oder Bernsteinsäureester sind, können ausgeschlossen werden, da die für diese Strukturelemente zu erwartenden Ionen bei m/e 131 bzw. m/e 145 nicht beobachtet werden.

Von den noch möglichen Isomeren ist die Struktur des 1.3.4-Pentantricarbonsäureesters **11** als die am besten mit den MS-Daten übereinstimmende anzusehen. Das Fragmentierungsschema (Abb. 7) gibt

Tab. II. Hochauflösendes Massenspektrum des Hemmstoffs **11 b**, erhalten durch GC/MS-Kopplung.

m/e	C H O	gefundene Masse	Abweichung zur ber. Masse [mMU]
215	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_5$	215.0898	-2,1
182	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$	182.0569	-1,0
173	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_4$	173.0765	-4,9
159	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_4$	159.0653	-0,4
155	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_3$	155.0699	-0,9
140	$\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_3$	140.0410	-6,3
128	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3$	128.0455	-1,8
127	$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2$	127.0756	-0,3
127	$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_3$	127.0386	-0,9
95	$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}$	95.0459	-3,8

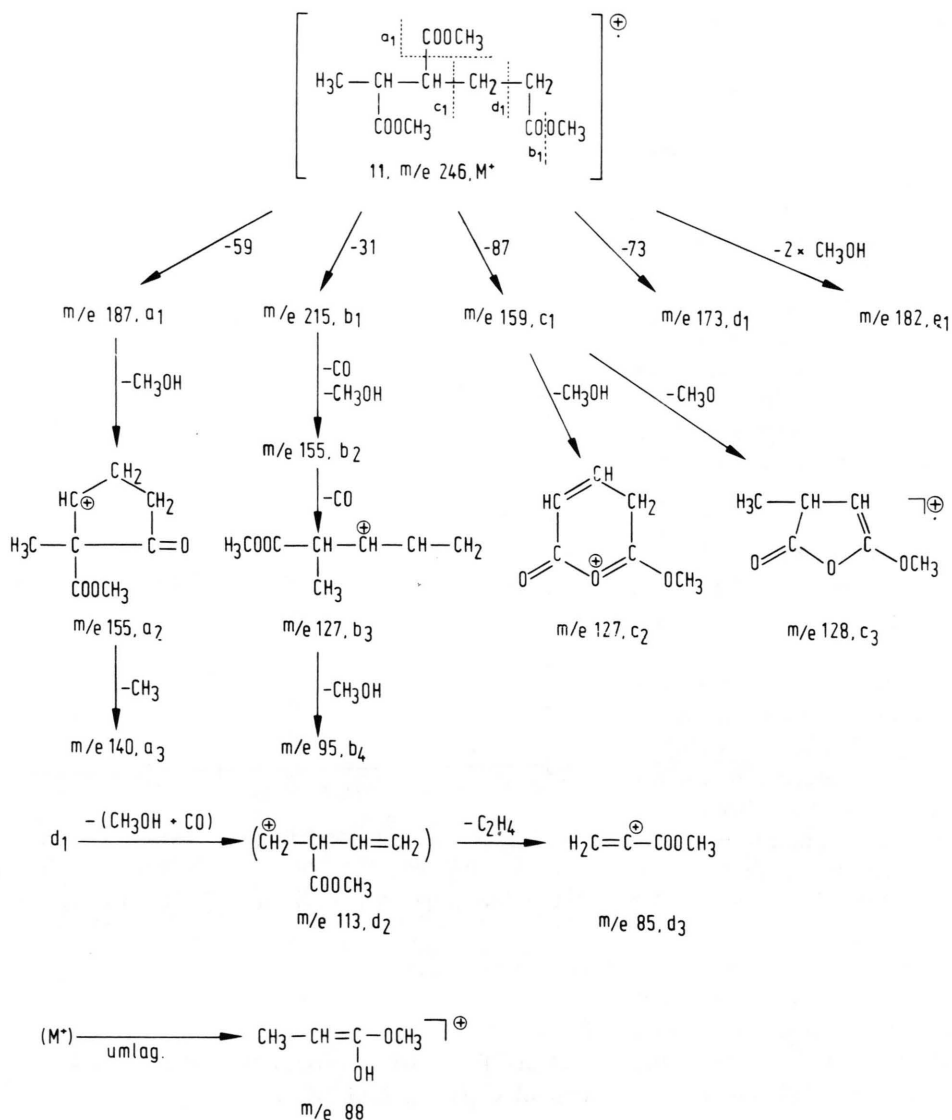


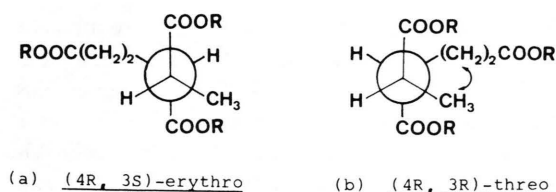
Abb. 7. Fragmentierungsschema des Hemmstoffs **11**. Die Elementarzusammensetzung der wichtigsten Ionen ist durch hochauflösende Massenspektrometrie gesichert (vgl. Tab. II).

die Deutung der Fragmentierungen, die sowohl durch die Bestimmung der Elementarzusammensetzung (Tab. II) als auch durch die Verschiebung nach Deuteriummarkierung (Abb. 6b) gesichert ist. Insbesondere erklärt es zwanglos die Bildung zweier Ionen m/e 127 (b_3 und c_2) verschiedener Elementarzusammensetzung.

1.3.4-Pentatricarbonsäure ist unter dem Trivialnamen Dihydrohämatsäure bekannt. Sie wurde bisher nicht als Naturprodukt beschrieben, wohl aber als Produkt des chemischen Abbaus von

Chlorophyllen [10–12] und von α -Santonin [13]. Auch eine chemische Synthese ist beschrieben [14], die zu einem Gemisch von threo- und erythro-Form führt. Die Trennung sollte durch fraktionierte Kristallisation möglich sein [14].

Unsere Synthese ergab hauptsächlich die leichter kristallisierende erythro-Form **11 a** neben wenig threo-Form **11 b**. Die Trennung der beiden Formen gelang durch (verlustreiche) Umkristallisation aus Salzsäure. Beide Formen, die in unserem gaschrom. System getrennt wurden, zeigten das gleiche Mas-



senspektrum, das mit dem Massenspektrum des Naturprodukts übereinstimmt. Damit ist die Struktur des Naturprodukts gesichert. Der GC-Vergleich von Naturstoff und Syntheseprodukt zeigt, daß dem Hemmstoff die Struktur **11 b** zuzuordnen ist. Das ist auch das aus Chlorophyllen erhaltene Isomere.

Die Newman-Projektion zeigt, daß die erythro-Form **11 a** gegenüber der threo-Form **11 b** thermodynamisch bevorzugt ist. Es ist daher verständlich, daß Isomerisierungsversuche a Säuren oder Trimethylester bevorzugt zu **11 a** führen. Immerhin konnte aus reinem **11 a** durch einstündige Einwirkung von Natriummethylat ein Isomerengemisch erhalten werden, das über 40% **11 b** enthält. Nach Bode und Brockmann [15] lassen sich die threo-Formen von 2,3-Dialkylbernsteinsäuren durch Erhitzen ihrer Anhydride mit Acetanhydrid aus den erythro-Formen gewinnen. Entsprechende Versuche mit **11 a** führten jedoch nur zur Zersetzung unter Decarboxylierung.

Für Versuche zur Messung der Bioaktivität wurden neben der natürlichen Verbindung **11 b** synthetisches **11 a** und das Isomerengemisch **11 a/11 b** eingesetzt. Das Ergebnis (Tab. III) zeigt, daß die natür-

Tab. III. Vergleich der Hemmwirkung von natürlichem und synthetischem Dihydrohämatinsäure-Dimethylester (**11**) beim Keimtest mit *Amaranthus caudatus*

Verbindung	Konzentration ^a [M]	% Keimungs- hemmung <i>A. caudatus</i>
natürliches 11 b	1×10^{-4}	100
natürliches 11 b	1×10^{-5}	100
synthetisches 11 a/11 b	1×10^{-3}	100
	1×10^{-4}	100
	1×10^{-5}	54
synthetisches 11 a ^b	1×10^{-4}	72
synthetisches 11 b ^b	1×10^{-4}	46
synthetisches 11 a/11 b (1:1) ^b	1×10^{-4}	54

^a Die Konzentration des Naturstoffs wurde durch quantitative Gaschromatographie bestimmt (vgl. Abb. 5).

^b Diese Versuche wurden mit neuen Samen von *A. caudatus* ausgeführt (Ernte 1981), die wesentlich weniger empfindlich auf Hemmstoffe reagierten als die alten Samen

liche Verbindung und der synthetische Trimethylester wirksame Keimungshemmstoffe sind. Allerdings ist die Hemmwirkung bei den synthetischen Produkten etwas geringer. Das könnte daran liegen, daß die synthetischen Produkte Racemate sind, während im Naturstoff möglicherweise nur ein Antipode vorliegt.

Hemmstoffe aus Fraktion A₂

Die Aufarbeitung der Fraktion A₂ erfolgte analog zu der von Fraktion A₁. Zunächst wurden die Hemmstoffe mit Diazomethan methyliert und durch Kurzwegdestillation vorgereinigt. Bei der anschließenden Säulenchromatographie an Kieselgel ergab sich ein anderes Elutionsverhalten als bei Fraktion A₁: Während sich der Dihydrohämatinsäureester **11 b** mit einem Gemisch von 25–30% Ethylacetat/70–75% *n*-Hexan eluieren ließ, fand man bei Fraktion A₂ zwei Hemmbereiche: einen kleineren bei 30% (um Fraktion 23) und einen größeren bei 35% Ethylacetat in Hexan (um Fraktionen 27–29) (Abb. 8). Durch Kombination des Biotests mit der gaschromatographischen Analyse der einzelnen Fraktionen der Säulenchromatographie konnten zwei Peaks mit der Hemmaktivität der Fraktionen 27–29 in Zusam-

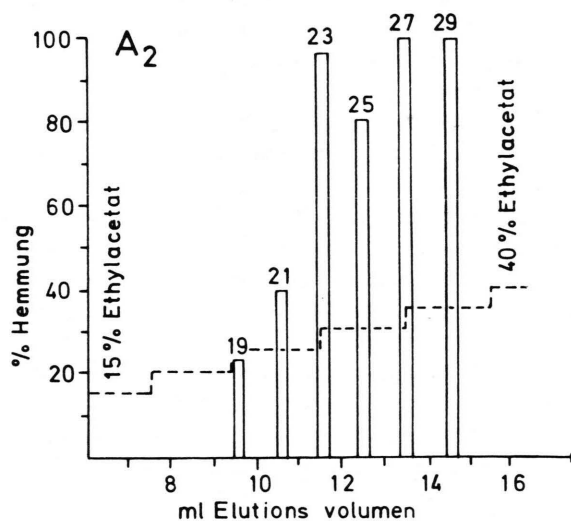


Abb. 8. Nachweis von Hemmstoffen in Fraktionen der Säulenchromatographie an Kieselgel mittels Biotest mit *Amaranthus caudatus*. Fraktion A₂ wurde methyliert, destilliert und an Kieselgel chromatographiert. (---) Stufengradient Ethylacetat/*n*-Hexan. Die Nummern über dem Balken sind die Fraktionsnummern der Säulenchromatographie.

Tab. IV. Hemmaktivität einiger aromatischer Verbindungen beim Keimtest mit *Amaranthus caudatus*

Verbindung	Konzentration [M]	% Hemmung
natürliches Butyl-dimethoxybenzol	1×10^{-4} 2×10^{-5}	100 100
1'-Methyl-propyl-2.5-dimethoxybenzol	1×10^{-4} 1×10^{-5}	100 0
tert-Butyl-3.4-dimethoxybenzol	1×10^{-4} 5×10^{-5} 1×10^{-5}	72–100 25 0
tert.-Butyl-3-methoxy-4-hydroxybenzol	1×10^{-4} 5×10^{-5} 1×10^{-5}	40 0 0
3.5-Dimethoxyacetophenon	1×10^{-4} 5×10^{-5} 1×10^{-5}	90 30 0
3.5-Dihydroxyacetophenon	1×10^{-4}	25
Resorcindimethylether	1×10^{-4}	0
Hydrochinondimethylether	1×10^{-4}	0
sec-Butylbenzol	1×10^{-4}	0

menhang gebracht werden. Die Korrelation war relativ einfach herzustellen, da A_2 erheblich weniger Komponenten enthält als A_1 . In den hemmenden Fraktionen 25–30 (vgl. Abb. 8) tritt ein Peak mit der Retentionszeit 27,3 min auf, dessen Intensität proportional zur beobachteten Hemmwirkung ansteigt. Dieser Peak ist die Hauptkomponente in Fraktion 28. Daneben kommt in den hemmenden Fraktionen eine Nebenkompone mit der Retentionszeit 26,7 min vor.

Die Massenspektren der beiden Verbindungen (Abb. 9a und b) zeigen eine für aromatische Verbindungen charakteristische Fragmentierung. Die Nebenkompone (RT 26,7 min) zeigt ein Molekülion bei m/e 180, das eine Methylgruppe ($\rightarrow m/e$ 165) und eine Acetylgruppe ($\rightarrow m/e$ 137) abspaltet. Diese Fragmentierung weist auf das Vorliegen eines substituierten Acetophenons hin, was durch ein Ion bei m/e 43 bestätigt wird. Die weitere Fragmentierung des Ions m/e 137 entspricht derjenigen von Dimethoxybenzolen. Durch Vergleich mit authentischen Substanzen wird der Hemmstoff als 3.4-Dimethoxyacetophenon (**12**) identifiziert. Verschiedene Strukturisomere können wie folgt unterschieden werden: Während 3.4-Dimethoxyacetophenon und 3.5-Dimethoxyacetophenon das gleiche Massenspektrum besitzen, zeigen die ortho-Methoxyacetophenone ein andersartiges Fragmentierungsverhalten. Die 3.4- und 3.5-Dimethoxyverbindungen lassen

sich gaschromatographisch voneinander trennen. **12** wurde bereits früher als Naturstoff beschrieben [16].

Die Hauptkomponente (RT 27,3 min) zeigt das Molekülion bei m/e 194. Das Schlüsselion bei m/e 151 ($M^+ - 43$) spricht für eine Dimethoxybenzylstruktur. Das Ion geringer Intensität bei m/e 43 und die Abwesenheit eines Ions bei $M - 15$ schließt die Anwesenheit einer Acetylgruppe aus, weist vielmehr auf einen C_4H_9 -Rest am Benzolring hin. Wir ordnen diesem Produkt deshalb die vorläufige Struktur eines Dimethoxybutylbenzols zu.

Wie ein Keimtest mit dem natürlichen Dimethoxybutylbenzol und analogen Verbindungen zeigt (Tab. IV), scheint es sich um eine Gruppe von Stoffen mit keimungshemmender Wirkung zu handeln. Essentiell scheint mindestens eine Methoxygruppe zu sein, weiterhin ist eine Alkyl- oder Acetyl-Seitenkette erforderlich. Die Stellung der Substituenten

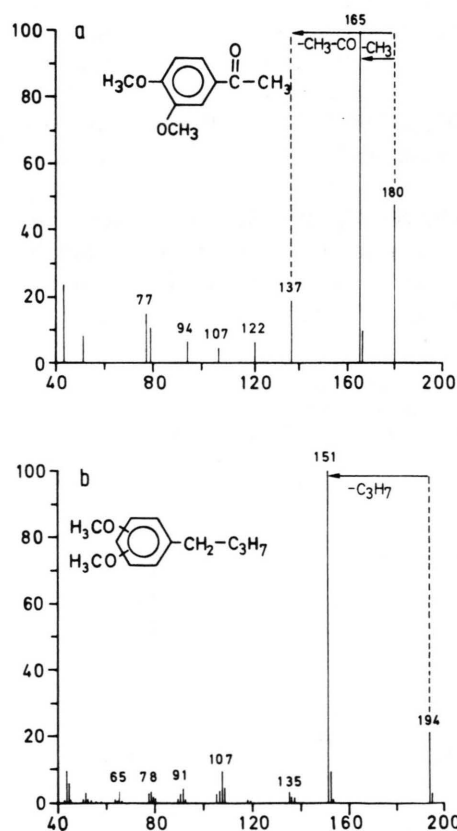


Abb. 9. Massenspektren der Hemmstoffe aus Fraktion 28 der Säulenchromatographie (vgl. Abb. 8), erhalten durch GC/MS-Kopplung. a) Hemmstoff **12** mit Retentionszeit 26,7 min; b) Hemmstoff mit Retentionszeit 27,3 min.

scheint gegenüber diesen Strukturmerkmalen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Während die Nebenkomponte **12** aufgrund ihrer geringen Konzentration bei der Ausbildung der Keimruhe von *A. sativa* wohl keine entscheidende Rolle spielt, dürfen Dihydrohämatinsäure (**11 b**) und Dimethoxybutylbenzol wesentlich zur Keimruhe beitragen. Allerdings läßt sich für diese beiden Hemmstoffe der prozentuale Anteil an der biologischen Gesamtwirkung vorläufig nur schlecht abschätzen.

Dank

Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Schildknecht, Heidelberg, für die Messung des hochauflösenden Massenspektrums. Die BASF AG, Ludwigshafen, hat uns dankenswerterweise Proben authentischer Dihydrohämatinsäure überlassen. Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, und dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt unterstützt.

- [1] R. Karl und W. Rüdiger, *Z. Naturforsch.* **37 c**, 793 (1982).
- [2] K. Hiraga, T. Yokota, N. Murofushi und N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **38**, 2511 (1974).
- [3] T. Hemberg, *Physiol. Plant.* **8**, 418 (1955).
- [4] V. N. Petrova und M. G. Nikolaeva, *Fiziol. Ravt.* **21**, 343 (1974).
- [5] C. L. Tipton, J. A. Klun, R. R. Husted und M. D. Pierson, *Biochemistry* **6**, 2866 (1967).
- [6] F. W. Whitmore, *Plant Physiol.* **53**, 728 (1974).
- [7] H. Schmidlein und K. Herrmann, *J. Chromatogr.* **115**, 123 (1975).
- [8] R. B. Taylorson und S. B. Hendricks, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**, 331 (1977).
- [9] E. Lohaus, Dissertation Universität München (1981).
- [10] H. Fischer und H. Wenderoth, *Liebigs Ann. Chem.* **537**, 170 (1939).
- [11] G. E. Ficken, R. B. Jones und R. P. Linstead, *J. Chem. Soc. (London)* **1956**, 2272.
- [12] H. Brockmann, Jr., *Angew. Chemie* **80**, 233 (1968).
- [13] I. Fleming, *Nature* **216**, 151 (1967).
- [14] C. H. Gray und D. C. Nicholson, *J. Chem. Soc. (London)* **1958**, 3085.
- [15] J. Bode und H. Brockmann, Jr., *Chem. Ber.* **105**, 34 (1972).
- [16] M. Spiteller und G. Spiteller, *J. Chromatogr.* **164**, 253 (1979).