

Neoglucobrassicin, ein zweiter SCN^- -Precursor vom Indoltyp in *Brassica*-Arten

ROLF GMELIN und ARTTURI I. VIRTANEN

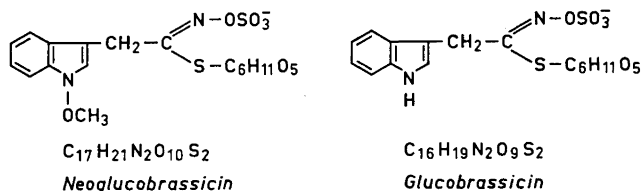
Biochemisches Forschungsinstitut der Stiftung für chemische Forschung, Helsinki, Finnland

Besides glucobrassicin, isolated from *Brassica* and *Raphanus* species a year ago in this laboratory, another thioglucoside with an indole group in the molecule was found in some *Brassica* species. This glucoside, called neoglucobrassicin by the authors, was isolated as a crystalline brucine salt from the rind of rutabaga (*Brassica napus* var. *napobrassica*). On the basis of the products formed in enzymic cleavage, acid hydrolysis, and hydrogenolysis with Raney nickel, neoglucobrassicin should be N_1 -methoxyglucobrassicin. The products were characterized by "Dünnschicht-Chromatographie" and paper chromatography. When the new glucoside was heated, a cleavage product with mass 186 could be found by mass spectrography. Under the same experimental conditions a cleavage product with mass 156 (3-indoleacetonitrile) was formed from glucobrassicin. The mass difference 30 is in accordance with the formula proposed for neoglucobrassicin.

Vor kurzem haben wir über Glucobrassicin¹⁻³, ein neues Thioglucosid, berichtet, das bisher in Frischpflanzen der Gattungen *Brassica* und *Raphanus* gefunden wurde und als glucosidische Vorstufe von physiologisch bedeutenden Substanzen wie SCN^- , 3-Indolylacetonitril und Ascorbigen von besonderem Interesse ist. Wie wir bereits mitgeteilt haben^{3,4}, findet sich in einigen Arten, z.B. *Brassica oleracea* var. *acephala* DC, *gongyloides* L., *botrytis* L., *Brassica napus* L. und *Brassica rapa* L. ein zweites, anscheinend nahe verwandtes Thioglucosid. Wegen seiner chemischen Beziehung zu Glucobrassicin bezeichnen wir es als Neoglucobrassicin.

Neoglucobrassicin wurde aus der Wurzelrinde der Kohlrübe* (*Brassica napus* L. var. *napobrassica*(L.) Peterm. in etwa 0,01 % Ausbeute isoliert. Die Darstellung erfolgte im wesentlichen nach der früheren, für Glucobrassicin angegebenen Vorschrift³:

* Die Wurzelrinde der Kohlrübe war als Ausgangsmaterial besonders geeignet, da das Verhältnis des neuen Glucosids zu Glucobrassicin etwa 4:1 war, während in den übrigen *Brassica*-Arten Glucobrassicin mengenmässig stark überwiegt.



- (a) Extraktion der frischen Wurzelrinde mit kochendem Methanol,
 (b) Anreicherung der Gesamtglucoside durch Ionenaustausch an anionotropem Al_2O_3 ,
 (c) Separierung der Glucoside durch präparative Chromatographie auf Zellulose-Pulver,
 (d) Überführung in eine kristallisationsfähige Salzform.

Bei der präparativen Chromatographie auf Zellulosepulver erschien Neoglucobrassicin in den Fraktionen 20—38 vor Glucobrassicin, das in den Fraktionen 45—55 auftrat (Fraktionen zu 20 ml, Säulengröße wie bei der Separierung von Glucobrassicin³). Nach verschiedenen Versuchen wurde Neoglucobrassicin schliesslich als schwerlösliches Brucin-Salz in langen und sehr dünnen Nadeln erhalten, die sich oberhalb 175°C unter Bräunung zersetzten. Papierchromatographisch trennt sich das Salz in das langsamer wandernde Neoglucobrassicin-Anion und das rascher wandernde Brucin-Kation auf. Das Neoglucobrassicin-Anion weist in verschiedenen Lösungsmittelsystemen gleiche R_F -Werte wie Gluconasturtiin⁵ auf, wandert also etwas rascher als Glucobrassicin, das sich papierchromatographisch wie Glucotropaeolin⁵ verhält. Es lässt sich auf dem Papierchromatogramm durch verschiedene Sprühreagentien nachweisen: mit Ehrlichs Reagenz oder Zimtaldehyd-Salzsäure entsteht ein orangefarbener Fleck, mit ammoniakalischer $AgNO_3$ -Lösung beim Erhitzen ein graubrauner Fleck,

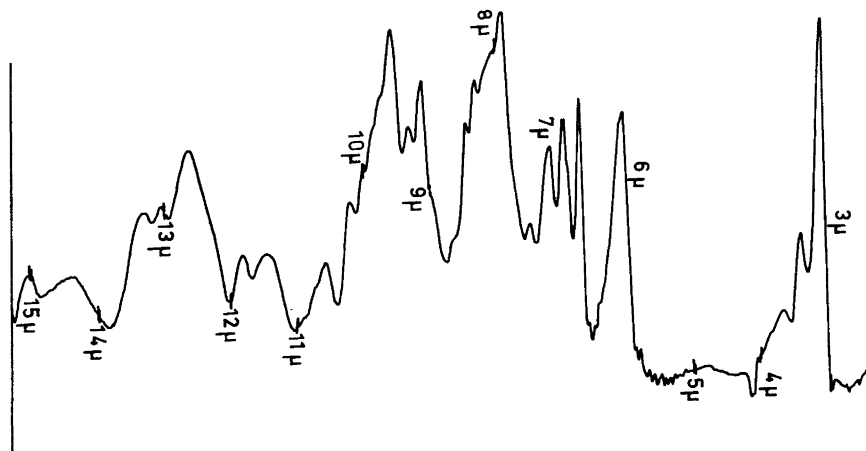


Abb. 1. IR-Spektrum von Neoglucobrassicin-Brucin-Salz (1 mg gepresst in 400 mg KBr).

mit Myrosinase-Ferrinitrat-Reagenz³ erhält man durch freigesetztes SCN⁻ einen rotbraunen Fleck. Durch das Ferrinitrat-Reagenz³ lässt sich Neoglucobrassicin (unspezifisch bräunlicher Fleck) deutlich von Glucobrassicin (intensiv blauvioletter Fleck) unterscheiden. Aus der Elementaranalyse liess sich die Bruttoformel C₄₀H₅₁N₄O₁₆S₂ errechnen, die sich aus dem Brucin-Kation C₂₃H₂₆N₂O₄, dem Neoglucobrassicin-Anion C₁₇H₂₁N₂O₁₀S₂ und 2 Mol Kristallwasser zusammensetzt. (Gefunden: C 52,87; H 5,98; N 6,21; S 7,31. Berechnet für C₄₀H₅₁N₄O₁₆S₂ (908,0): C 52,85; H 5,67; N 6,18; S 7,06. Gefunden 2,77 % H₂O bei 12 stdg. Trocknung im Hochvakuum bei 90°C. Berechnet für 2 H₂O: 3,95 %).

Zur Dokumentation wurde das IR-Spektrum von Neoglucobrassicin (als Brucin Salz) aufgenommen (Abb. 1). UV-Spektrum des papierchromatographisch abgetrennten Neoglucobrassicin-Anions (in Wasser): λ_{max} 288, 276 und 220 mμ (Schulter bei 293–297 mμ) (ε = 5450, 5450 und 4050). λ_{min} 282 und 253 mμ (ε = 5360 und 3550). Das UV-Spektrum von Neoglucobrassicin-Anion weist somit auffallende Ähnlichkeit mit dem eines 1,3-disubstituierten Indols⁶ auf.

Da für alle Untersuchungen insgesamt nur etwa 100 mg Substanz zur Verfügung standen, muss sich vorläufig unser Strukturvorschlag für Neoglucobrassicin ausschliesslich auf chromatographische und spektroskopische Analysen und Interpretierung der enzymatische, hydrolytisch, hydrogenolytisch und thermisch gebildeten Spaltprodukte stützen. Hierbei leisteten die bei Glucobrassicin gesammelten Erfahrungen grosse Dienste, denn ein grosser Teil der dort beobachteten Reaktionstypen³ galt analog auch für Neoglucobrassicin. — Auf Grund des vorliegenden Tatsachenmaterials schlagen wir für Neoglucobrassicin die Formel (I) vor und begründen sie wie folgt:

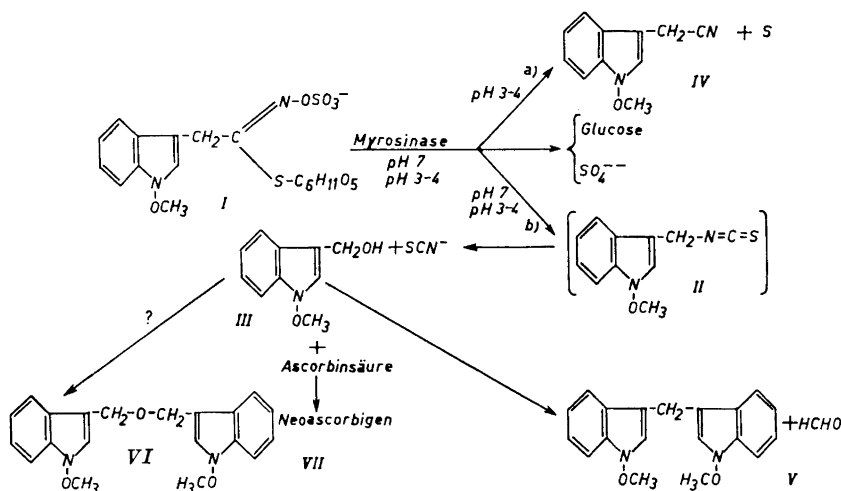


Abb. 2. Enzymatische Spaltung von Neoglucobrassicin und dabei gebildete verschiedene Produkte.

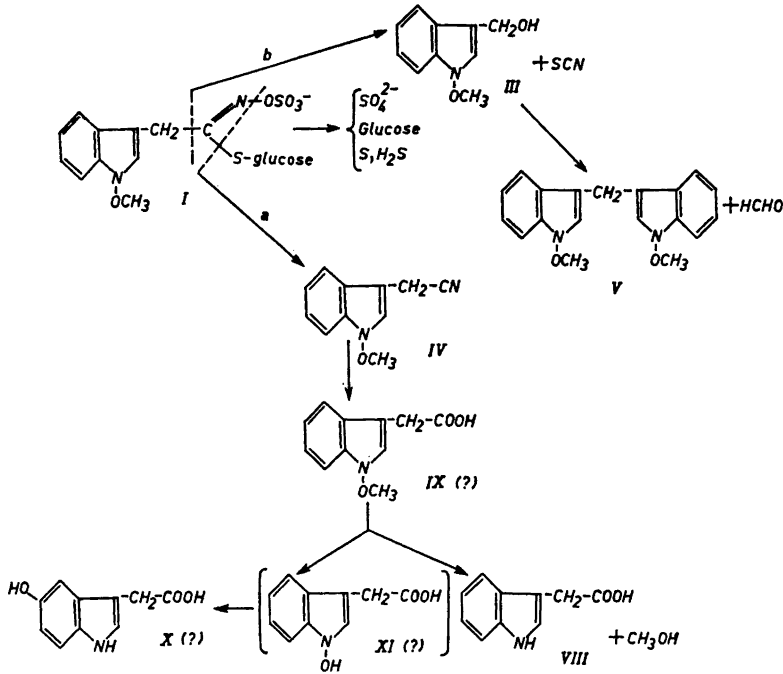


Abb. 3. Hydrolytische Spaltung von Neoglucobrassicin.

Durch Myrosinase wird Neoglucobrassicin analog zu Glucobrassicin gespalten. Nach Abspaltung von Glucose und Sulfat entsteht wahrscheinlich labiles Isothiocyanat, das rasch in SCN^- und ein 1-substituiertes 3-Hydroxymethylindol (III) zerfällt. Diese Verbindung dimerisiert sich nach und nach unter Formaldehyd-Abspaltung zu einem 1,1'-disubstituierten 3,3'-Diindolylmethan

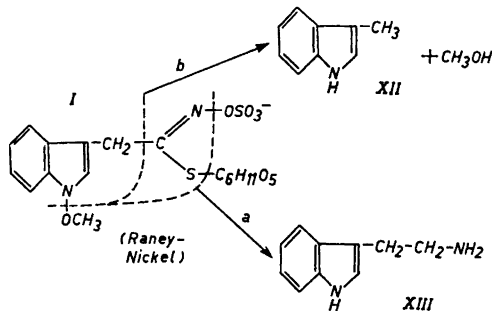


Abb. 4. Hydrogenolytische Spaltung von Neoglucobrassicin.

(V). In geringer Menge wird nebenbei noch ein Produkt, das mit einem Äther der Formel VI identisch sein könnte, gebildet (vgl. Thesing ⁷). In Gegenwart von Ascorbinsäure bildet sich bei der enzymatischen Spaltung von Neoglucobrassicin bei pH 7 ein Kondensationsprodukt aus III und Ascorbinsäure, das wir in Analogie zu dem aus Glucobrassicin gebildeten Ascorbigen Neoascorbigen (VII) nennen. Führt man die enzymatische Spaltung bei pH 4 durch, so findet man ein 1-substituiertes 3-Indolylacetonitril (IV). Gleichzeitig kann man jedoch ein Indolderivat beobachten, bei dem es sich eventuell um 1-substituiertes Indol-3-methylisothiocyanat (II) handeln könnte. Es ist doch fraglich ob das Isothiocyanat wirklich so stabil ist, dass man es chromatographisch

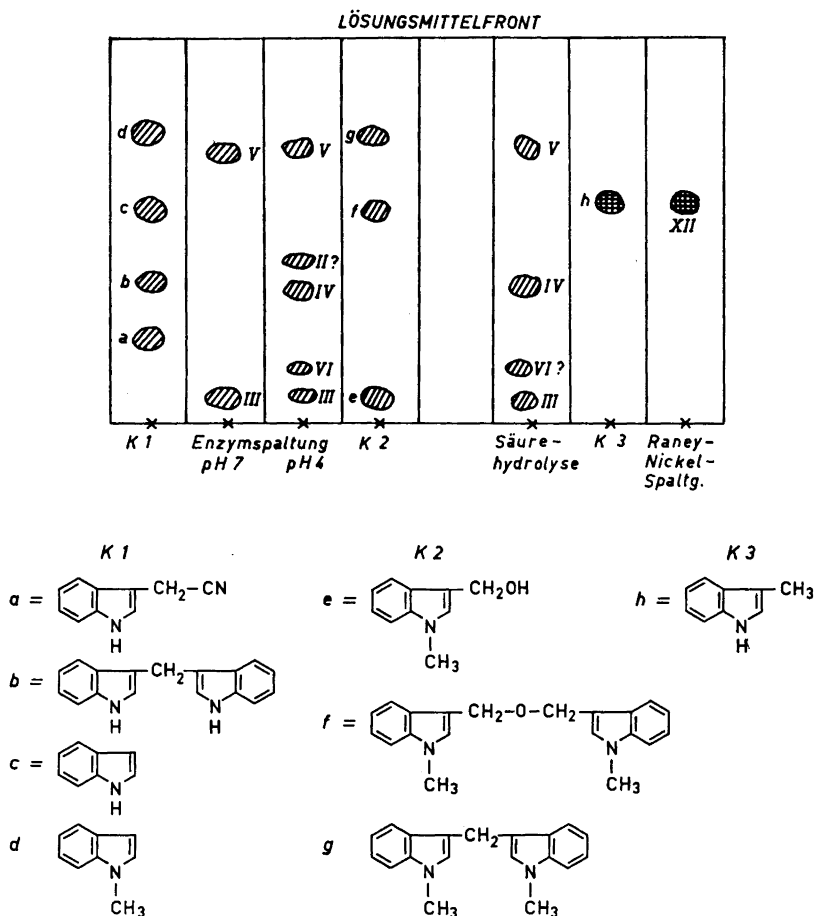


Abb. 5. Dünnschichtchromatogramme von einigen Indolderivaten und Produkten, welche bei der enzymatischen, hydrolytischen und hydrogenolytischen Spaltung von Neoglucobrassicin entstehen. Trägerschicht: Kieselgel G. Fließmittel: Benzol.

nachweisen kann. Die enzymatischen Spaltungsreaktionen von Neoglucobrassicin sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

Bei der sauren Hydrolyse von Neoglucobrassicin werden 3 Säuren gebildet, von denen eine (VIII) papierchromatographisch mit 3-Indolylessigsäure identisch ist. Die beiden anderen werden vorbehaltlich als 1-Methoxyindol-3-essigsäure (IX) und 5-Hydroxyindol-3-essigsäure (X) interpretiert (letztere könnte aus einer intermediär gebildeten 1-Hydroxyindol-3-essigsäure (XI) durch eine Art Phenylhydroxylamin-Umlagerung entstanden sein). Neben dieser normalen Hydrolyse von Neoglucobrassicin als einem Thiohydroxamsäure-Derivat⁸ (Reaktionsweg a³) kann man unter sauren und alkalischen Bedingungen wie beim Glucobrassicin das Auftreten von Spaltprodukten beobachten, die unter Spaltung der C_a-C_b-Bindung (Reaktionsweg b³) entstehen und mit III und V identisch sind. Das Formelschema in Abbildung 3 fasst die hydrolytischen Spaltungsreaktionen zusammen.

Wird Neoglucobrassicin unter schonenden Bedingungen mit Raney-Nickel behandelt, so erhält man als Reaktionsprodukte Skatol (XII) und Tryptamin (XIII), deren Bildung eigentlich nur verständlich sein kann, wenn man einen Substituenten am N₁ über eine Sauerstoff-Brücke gebunden annimmt.

Bei der thermischen Zersetzung von Neoglucobrassicin lässt sich massenspektroskopisch ein Spaltprodukt mit einem maximalen Massenwert von 186 nachweisen. Es dürfte mit Verbindung IV identisch sein, denn unter gleichen Bedingungen erhält man aus Glucobrassicin ein Spaltprodukt der maximalen Masse 156, das mit 3-Indolylacetonitril identisch ist. Aus der Differenz (30) dieser beiden thermischen Zersetzungsprodukte errechnet sich die Grösse des Substituenten am N₁ mit einem Mol. gew. von 31. Dieser Wert entspricht einer Methoxy-Gruppe, und tatsächlich lassen sich die obengenannten Reaktionen und Befunde am besten mit Neoglucobrassicin als einem N₁-Methoxy-Glucobrassicin in Einklang bringen. Auch die bei der Elementaranalyse gefundenen Werte für das Neoglucobrassicin-Anion sind in Übereinstimmung damit.

Für die Erfassung der enzymatisch, hydrolytisch und hydrogenolytisch gebildeten Spaltprodukte hat sich wieder die Dünnschicht-Chromatographie besonders bewährt. Da vorläufig N₁-Methoxyindol-Derivate synthetisch nicht zugänglich waren, wurden Indolderivate, die am N₁ entweder durch H oder durch CH₃ substituiert waren, als Vergleichssubstanzen für die Dünnschicht-Chromatographie verwendet. Wie man aus theoretischen Erwägungen erwarten konnte, liegen die N₁-Methoxy-substituierten Spaltprodukte aus Neoglucobrassicin in ihrem polaren und damit auch in ihrem chromatographischen Verhalten zwischen den entsprechenden, am N₁ durch H bzw. CH₃ substituierten Indolderivaten.

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse der dünnschicht-chromatographischen Analyse schematisch wiedergegeben. Die allgemeine Methodik wurde in der letzten Mitteilung³ ausführlich beschrieben. Die Spaltprodukte VIII, IX, X, VII und XIII wurden papierchromatographisch nachgewiesen.

Neoglucobrassicin repräsentiert somit einen interessanten, neuen Strukturtyp. Seine biogenetische Verwandtschaft zu Glucobrassicin ist leicht erkennbar. — Indolderivate mit einer Sauerstoff-Funktion am N₁ wurden unseres Wissens bisher erst einmal in der Natur vorgefunden und beschrieben (Cypridina-Luciferin⁹). Aufgabe künftiger Studien ist es, die hier vorgebrachten Befunde,

durch Isolierung der Abbauprodukte zu bestätigen und die Biogenese von Neoglucobrassicin sowie seine phytochemische und biologische Bedeutung und Wirkung zu klären.

Dr. E. Honkanen danken wir für die Synthese verschiedener Indolderivate, Mag. T. Moisio für die massenspektroskopische Analyse. Diese Arbeit ist ein Teil des Untersuchungsprojekts unter U.S. Public Law Nr. 480, 83rd Congress.

LITERATUR

1. Gmelin, R., Saarivirta, M. und Virtanen, A. I. *Suomen Kemistilehti B* 33 (1960) 172.
2. Gmelin, R. und Virtanen, A. I. *Ibid. B* 34 (1961) 15.
3. Gmelin, R. und Virtanen, A. I. *Ann. Acad. Sci. Fennicæ A II*, 107 (1961).
4. Virtanen, A. I. *Experientia* 17 (241) 1961.
5. Schultz, O. E. und Gmelin, R. *Z. Naturforsch.* 8b (1953) 151.
6. Edwards, B. G. *Arch. Biochem. Biophys.* 21 (1949) 103.
7. Thesing, J. *Chem. Ber.* 87 (1954) 692.
8. Ettlinger, M. G. und Lundeen, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 4172.
9. Hirata, Y., Shimomura, O. und Eguchi, S. *Tetrahedron Letters* 1959 4.

Eingegangen am 2. Januar 1962.