

Zur Biosynthese der Benzoesäure in *Gaultheria procumbens* L. II<sup>1</sup>

VON HANS GRISEBACH und KARL-OTTO VOLLMER

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Universität Freiburg i. Br. \*

(Z. Naturforschg. **19 b**, 781—783 [1964]; eingegangen am 29. Mai 1964)

Further investigations on the biosynthesis of benzoic acids in *Gaultheria procumbens* L. have shown that besides salicylic acid all the other benzoic acids (gentisinic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, *o*-pyrocatechuic acid(?), syringic acid and vanillinic acid) can be formed from cinnamic acid. In the case of vanillinic acid it was proved that the total activity is located in the carboxyl group when cinnamic acid-[3-<sup>14</sup>C] is the precursor.

Formiat-<sup>14</sup>C is incorporated into the methylester group of methylsalicylate.

In der vorangehenden Mitt.<sup>1</sup> konnten wir zeigen, daß die Salicylsäure in Wintergrün (*Gaultheria procumbens* L.) durch Abbau der Zimtsäure gebildet wird. Da in dieser Pflanze neben dem Salicylsäuremethylester als Hauptkomponente des ätherischen Öls noch eine Anzahl weiterer Benzoesäuren vorkommen<sup>2</sup>, haben wir die Untersuchungen auch auf diese Säuren ausgedehnt.

Von der Radioaktivität der den Blättern zugeführten Zimtsäure-[3-<sup>14</sup>C] fand sich nach 1 Woche 2,4% in der Atmungskohlensäure. Dieses Ergebnis zeigt die Fähigkeit der Pflanze, die Zimtsäure noch weiter als bis zu den Benzoesäuren abzubauen<sup>3</sup>.

Die Phenolcarbonsäuren wurden nach Vorreinigung durch Dünnschicht- und Papierchromatographie mit verschiedenen Fließmitteln auf Kieselgelplatten getrennt und von den Dünnschichtchromatogrammen Autoradiographien angefertigt. Die nach 4 Wochen entwickelten Autoradiogramme zeigten Radioaktivität in allen vorhandenen Benzoesäuren: Gentisinsäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, *o*-Pyrocatechusäure (?), Salicylsäure, Syringasäure und Vanillinsäure. Daneben fand sich radioaktive Kaffee- und *p*-Cumarsäure und eine Reihe nicht identifizierter radioaktiver Stoffwechselprodukte. Die relativen spezifischen Aktivitäten der einzelnen Säuren ließen sich nach den bisherigen

Versuchen nur abschätzen, doch haben wir inzwischen eine gaschromatographische Trennung der Säuren über ihre Trimethylsilyläther ausgearbeitet, welche kinetische Untersuchungen über den Zusammenhang dieser Säuren ermöglicht<sup>5</sup>.

Die Vanillinsäure wurde nach Trägerzusatz auch präparativ isoliert und nach säulen-, papier- und gaschromatographischer Reinigung in Chinolin decarboxyliert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei der Salicylsäure<sup>1</sup> fand sich auch hier über 97% der Aktivität in der Carboxylgruppe (Vanillinsäure 5030 ipm/mMol; CO<sub>2</sub> 4900 ipm/mMol).

Aus diesen Versuchen kann der Schluß gezogen werden, daß alle Benzoesäuren in *Gaultheria* durch einen Abbau der Zimtsäure entstehen. Nach den schon früher diskutierten Befunden<sup>1</sup> und Versuchen von KINDL und BILLEK<sup>6</sup> gilt dies auch für andere höhere Pflanzen. Allerdings fanden diese Autoren bei den von ihnen untersuchten Pflanzen (*Hydrangea macrophylla* und *Astilbe chinensis*) trotz des Vorhandenseins von anderen phenolischen Benzoesäuren nur die Gentisinsäure radioaktiv. Daraus schließen KINDL und BILLEK, daß die Hydroxylierung bereits auf der Stufe der Zimtsäure erfolgt. Inzwischen konnte ZENK<sup>7</sup> die Bildung der Gallussäure aus Phenylalanin bzw. Tyrosin — wahrscheinlich über *p*-Cumarsäure — in *Rhus typhina* zeigen<sup>7a</sup>.

\* Derzeitige Anschrift: Isotopenabteilung des Chemischen Laboratoriums der Universität, Freiburg i. Br., Albertstraße 21.

<sup>1</sup> I. Mitt.: H. GRISEBACH u. K.-O. VOLLMER, Z. Naturforschg. **18 b**, 753 [1963].

<sup>2</sup> R. K. IBRAHIM u. G. H. N. TOWERS, Arch. Biochem. Biophysics **87**, 125 [1960].

<sup>3</sup> Dagegen findet ZENK<sup>4</sup> nach Gabe von Benzoesäurecarboxyl-<sup>14</sup>C an Erbsenepicotyle unter 0,1% der aufgenommenen Aktivität im CO<sub>2</sub>.

<sup>4</sup> M. H. ZENK, Planta **58**, 668 [1962].

<sup>5</sup> H. GRISEBACH u. K.-O. VOLLMER, unveröffentlichte Versuche.

<sup>6</sup> H. KINDL u. G. BILLEK, Mh. Chem., im Druck [1964].

Herrn Dozent Dr. BILLEK (Wien) danke ich für die vorzeitige Überlassung seines Manuskriptes. — Vgl. H. KINDL u. G. BILLEK, Österr. Chemiker-Ztg. **63**, 290 [1962].

<sup>7</sup> M. H. ZENK, Z. Naturforschg. **19 b**, 83 [1964].

<sup>7a</sup> Anm. b. d. Korrektur: Inzwischen sind 2 weitere Arbeiten zur Biosynthese der Benzoesäuren in höheren Pflanzen erschienen (M. H. ZENK u. G. MÜLLER, Z. Naturforschg. **19 b**, 398 [1964]; S. Z. EL-BASYOUNI, D. CHEN, R. K. IBRAHIM, A. C. NEISH u. G. H. N. TOMERS, Phytochemistry **3**, 485 [1964]). Die hier mitgeteilten Ergebnisse sind im Einklang mit unseren Vorstellungen. Der Hydroxylierungsgrad der Benzoesäuren scheint vorwiegend auf der Stufe der Zimtsäuren festgelegt zu werden.

Weiterhin haben wir die Herkunft der Methyl-esterkomponente des Salicylsäuremethylesters durch Gabe von Formiat- $^{14}\text{C}$  an Wintergrün geprüft. Der radioaktive Ester (Einbaurate 0,02%) wurde als *p*-Nitrobenzoat bis zur konstanten spez. Aktivität umkristallisiert, der Methylester nach Zeisel gespalten und das Methyljodid als Tetramethylammoniumjodid isoliert. In letzterer Verbindung fanden sich 94% der Aktivität des Esters (*p*-Nitrobenzoat des Salicylsäuremethylesters 17 200 ipm/mMol; Tetramethylammoniumjodid 16 100 ipm/mMol). Der Einbau des Formiats in die Methyl-esterkomponente dürfte über „aktives Methionin“ erfolgen, da THAIN und Mitarbb.<sup>8</sup> kürzlich die Herkunft der Methyl-estergruppe der Pyrethrin-säure aus L-Methionin bewiesen.

## Versuche

### Isolierung der Phenolcarbonsäuren

Zur Isolierung der Phenolcarbonsäuren extrahierte man die zerriebenen Blätter (3,9 g Naßgewicht) mit 80-proz. Äthanol unter Rückfluß. Der filtrierte Extrakt wurde zur Trockene eingengt und der Rückstand mit 15 cm<sup>3</sup> 2-n. HCl auf 100° erhitzt. Danach extrahierte man die salzsaure Lösung kontinuierlich mit Äther, schüttelte die eingengte ätherische Lösung 4-mal mit 5-proz. Bicarbonatlösung aus und extrahierte die angesäuerte Lösung wieder kontinuierlich mit Äther. Der Rückstand der ätherischen Lösung (53 mg) wurde in Methanol gelöst und auf einer 2 mm dicken Kieselgelschicht mit Na-formiat/Ameisensäure/Wasser (10:1:200) chromatographiert. Hierbei laufen die Phenolcarbonsäuren in einer breiten Zone zwischen  $R_f$  0,5–1, werden aber gut von vielen anderen Begleitstoffen aus der Pflanze abgetrennt. Nach Extraktion der Säurezone mit peroxidfreiem Äther erhielt man nach Abdampfen des Äthers 24 mg farblose Kristalle.

$\frac{1}{5}$  der vorgereinigten Säuren wurde im Streifen auf Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) mit der organischen Phase von Benzol/Eisessig/Wasser (6 : 7 : 3) ohne Kammersättigung chromatographiert. Hierbei wird eine Gruppentrennung der Säuren erreicht.  $R_f$ -Werte: Zimtsäure 0,88, Salicylsäure 0,78, Vanillin- + Syringasäure 0,63, *p*-Cumarsäure 0,42, *p*-Hydroxybenzoessäure + *o*-Pyrocatechusäure 0,36, Gentisinsäure 0,16, Protocatechusäure + Kaffeesäure 0,10. Das Chro-

matogramm wurde in 5 Zonen zerschnitten und nach Extraktion mit peroxidfreiem Äther die einzelnen Zonen nochmals auf Dünnschichtplatten chromatographiert. Hierfür wurden folgende Adsorbentien und Fließmittel verwendet: Kieselgel G (a), Kieselgel G mit 0,1-n. Borsäure angerührt (b), Cellulose (c), Organische Phase des Gemisches von Benzol/Eisessig/Wasser (6 : 7 : 3) (d), Na-formiat/Ameisensäure/Wasser (10 : 1 : 200) (e), Toluol/Ameisensäureäthylester/Ameisensäure (5 : 4 : 1) (f).

Trennung von Zone I mit System b + d: Zimtsäure 0,58, Salicylsäure 0,1. Zone II mit System a + d: Salicylsäure 0,53, Vanillinsäure 0,47, Syringasäure 0,38. Zone III mit System c + e: *p*-Hydroxybenzoessäure + *o*-Pyrocatechusäure (?) 0,56, *p*-Cumarsäure 0,3. Zone IV mit System a + f: Gentisinsäure 0,5, Protocatechusäure 0,45. Zone V mit System c + e: Protocatechusäure 0,5, Kaffeesäure 0,22.

Die Dünnschichtchromatogramme wurden auf Agfa-Sino Röntgenfilm gelegt und die Filme nach 4–6 Wochen entwickelt.

### Präparative Isolierung der Vanillinsäure

$\frac{4}{5}$  der vorgereinigten Säuren (s. oben) chromatographierte man nach Zusatz von 1 mg Vanillinsäure als Träger auf einer Silicagelsäule<sup>9</sup>, wobei folgende Fraktionen aufgefangen wurden:

10 cm <sup>3</sup> Benzol/Äther (9:1)	} höhere Fettsäuren + Salicylsäure (I) Salicylsäure + wenig Vanillinsäure (II)
10 cm <sup>3</sup> Benzol/Äther (8:2)	
10 cm <sup>3</sup> Benzol/Äther (1:1)	
5 cm <sup>3</sup> Äther	} alle Phenolcarbonsäure mit wenig Salicylsäure (III)
5 cm <sup>3</sup> Äther/Methanol (9:1)	
5 cm <sup>3</sup> Äther/Methanol (8:2)	
5 cm <sup>3</sup> Äther/Methanol (1:1)	
20 cm <sup>3</sup> Methanol	} Verunreinigungen (IV)
20 cm <sup>3</sup> Methanol	

Die Fraktionen II + III chromatographierte man auf Papier mit Benzol/Eisessig/Wasser. Zum Eluat der Vanillinsäurezone wurde nochmals 10 mg Vanillinsäure zugesetzt. Da die Vanillinsäure noch mit etwas Salicyl- und Syringasäure verunreinigt war, wurden die Säuren in die Trimethylsilyläther überführt durch Zugabe von 5 Tropfen Pyridin, 3 Tropfen Hexamethyldisilazan und 4 Tropfen Trimethylchlorosilan<sup>10</sup>. Nach beendeter Umsetzung injizierte man das Gemisch in einen Gaschromatographen. Für die Trennung wurden folgende Bedingungen eingehalten: Säulenlänge 2 m, Füllung 6,4% Silicongummi auf säuregewaschenem und silani-

<sup>8</sup> P. J. GODIN, H. S. INGLIS, M. SNAREY U. E. M. THAIN, J. chem. Soc. [London] 1963, 5878.

<sup>9</sup> Das verwendete Silicagel (Davison, 200 mesh) mußte zunächst vom Eisen befreit werden, da sich sonst Fe-Komplexe bilden. Hierzu wurde mit halbkonz. HCl einige Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt und anschließend in einer Säule

mit halbkonz. HCl, mit Methanol und mit Äther gewaschen. Nach Trocknung bei 60° reaktivierte man über Nacht bei 140°.

<sup>10</sup> C. C. SWEETLEY, R. BENTLEY, M. MAKITA U. W. W. WELLS, J. Amer. chem. Soc. 85, 2497 [1963].

siertem Kieselgur (Merck 0,25–0,2 mm; um die Kapazität der Säule zu erhöhen, wurde auch mit 20% Silicongummi gearbeitet). Säulentemperatur 140 bis 240°, Programmierung 4,7°/Minute. Detektor-temperatur (Wärmeleitfähigkeitsdetektor) 300°, Einspritztemperatur 320°.

Die Durchbruchtemperaturen der Säuren waren: Salicylsäure 166°, Vanillinsäure 187° und Syringasäure 200°. Die Vanillinsäure wurde in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten U-förmigen Glasröhrchen aufgefangen. Man verdünnte nochmals mit 45 mg Vanillinsäure und behandelte mit 10 cm<sup>3</sup> Eisessig und 1 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O, um etwa noch vorhandenen Trimethylsilyläther zu zersetzen. Die Säure wurde aus Toluol bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert.

Zur Decarboxylierung wurden 22 mg Vanillinsäure und 41 mg Chinolin in einem Supremaxrohr mit Brechsiegel i. Vak. eingeschmolzen und 2 Stdn. auf 260° erhitzt. Das Öffnen der Bombe erfolgte in dem Vakuumrechen, in dem auch die Überführung in das Proportionalzählrohr vorgenommen wurde<sup>11</sup>. Ausbeute an CO<sub>2</sub> 92 Prozent.

<sup>11</sup> H. SIMON, H. DANIEL u. J. F. KLEBE, *Angew. Chem.* **71**, 303 [1959].

<sup>12</sup> In der Literatur<sup>13</sup> ist ein Schmp. von 128° angegeben, doch muß es sich hierbei um einen Irrtum handeln.

#### Versuch mit Formiat-[<sup>14</sup>C]

20 junge Blätter erhielten eine Lösung von 0,254 mg Na-formiat-[<sup>14</sup>C] (spez. Aktivität 13,4 mC/mMol = 50 μC) in 15 cm<sup>3</sup> Wasser. Die Versuchsdauer betrug 8 Tage, die sonstigen Bedingungen waren wie früher angegeben<sup>1</sup>. Es wurden 11,8 mg (UV-Spektrum) Salicylsäuremethylester isoliert<sup>1</sup>. Nach Verdünnung mit 118 mg Ester stellte man in üblicher Weise das *p*-Nitrobenzoat dar. Ausbeute 80–90 Prozent. Schmp. 96 bis 96,5°<sup>12</sup> (aus Alkohol bzw. Petroläther 90–100°).

C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>6</sub> (301)

Ber. C 59,8 H 3,68 N 4,65 OCH<sub>3</sub> 10,28,

Gef. C 60,13 H 3,92 N 4,74 OCH<sub>3</sub> 10,05.

Die Abspaltung der Methylestergruppe erfolgte nach Z e i s e l in der üblichen Apparatur mit Trimethylamin in Nitrobenzol als Auffangreagens<sup>14</sup>.

Die Arbeit wurde in dankenswerter Weise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. Ebenfalls danken wir dem Fonds der Chemie für seine Unterstützung.

<sup>13</sup> McELVAIN, *The Characterization of Organic Compounds*, Second Edition, Macmillan Co., New York 1945, S. 267.

<sup>14</sup> R. F. MAKENS, R. L. LOTHINGER u. R. A. DONIA, *Analytic. Chem.* **31**, 1265 [1959].