

Zur Biosynthese der Gentisinsäure*

Von

G. Billek** und F. P. Schmook

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 24. Mai 1967)

Die Biosynthese der Gentisinsäure wurde mittels markierter Vorstufen in vier Arten höherer Pflanzen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Gentisinsäure über die Zwischenstufen Zimtsäure, Benzoessäure und Salicylsäure gebildet wird. Die Hydroxylierung erfolgt hier erst auf der Stufe der Benzoessäuren, während andere Hydroxybenzoessäuren (z. B. 4-Hydroxybenzoessäure und Vanillinsäure) durch unmittelbaren Abbau aus den entsprechend substituierten Zimtsäuren entstehen.

Biosynthesis of gentisic acid was investigated by the use of labelled precursors in four species of higher plants. We showed that gentisic acid is formed *via* the intermediates cinnamic, benzoic, and salicylic acid. Thereby hydroxylation occurs at the benzoic acid level, whereas other hydroxybenzoic acids (e.g. 4-hydroxybenzoic and vanillic acid) originate by immediate degradation of correspondingly substituted cinnamic acids.

Die Gentisinsäure galt bis vor kurzem als ein seltener Inhaltsstoff höherer Pflanzen¹. Ihre weite Verbreitung erkannte erst *Griffiths*², der sie in fast allen untersuchten Arten aus 80 Pflanzenfamilien fand. In der Familie *Saxifragaceae* wurde Gentisinsäure in 19 Arten aus 9 Gattungen nachgewiesen³.

* Unserem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. *F. Wessely*, zum 70. Geburtstag in Dankbarkeit gewidmet.

** Derzeitige Anschrift: Unilever Forschungslaboratorium Hamburg, D-2 Hamburg 50, Behringstraße 154.

¹ *W. Karrer*, Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe (exklusive Alkaloide). Basel—Stuttgart: Birkhäuser Verlag 1958.

² *L. A. Griffiths*, *Nature* [London] **182**, 733 (1958); *J. Exper. Bot.* **10**, 437 (1959).

³ *G. Billek* und *H. Kindl*, *Mh. Chem.* **93**, 85 (1962).

Gentisinsäure tritt auch als Stoffwechselprodukt niederer Organismen auf, und hier wurde die Biosynthese dieser Verbindung zuerst untersucht. Nach *Gatenbeck* und *Lönnroth*⁴ wird Gentisinsäure in *Penicillium urticae* aus Acetateinheiten aufgebaut. 6-Methylsalicylsäure stellt eine Zwischenstufe dar, die in einer recht komplizierten Reaktionsfolge — Oxydation der Methylgruppe, Einführung einer zweiten Hydroxylgruppe und Decarboxylierung — in Gentisinsäure umgewandelt wird.

In höheren Pflanzen hingegen wird die Gentisinsäure über den Shikimisäureweg gebildet. Nach einer Hypothese von *Geissman* und *Hinreiner*⁵ sollen C₆—C₁-Verbindungen allgemein durch Abbau von Phenylpropankörpern entstehen. Der experimentelle Beweis für diese Ansicht wurde von *Kindl* und *Billek*⁶ erbracht, als in *Hydrangea macrophylla* und *Astilbe chinensis* der Abbau von Zimtsäure zu Gentisinsäure und von Ferulasäure zu Vanillinsäure nachgewiesen werden konnte. *Ibrahim*⁷ stellte fest, daß auch *Gaultheria procumbens* und *Primula acaulis* L-Phenylalanin und Zimtsäure zu Gentisinsäure abbauen können. In *Primula acaulis* ist die Bildung der Gentisinsäure besonders ausgeprägt⁸. Zur selben Zeit fanden *Grisebach* und *Vollmer*⁹, daß bei *Gaultheria procumbens* alle in dieser Pflanzenart nachgewiesenen Benzoesäuren, darunter auch Gentisinsäure, aus Zimtsäure entstehen können. Bei diesen Untersuchungen wurden stets radiokohlenstoff-markierte Phenylpropankörper eingesetzt, deren aromatischer Ring nicht substituiert war, so daß die Frage offenblieb, ob die Einführung der Hydroxylgruppen in den aromatischen Kern vor oder nach dem Abbau der Seitenkette stattfand. Für eine Umwandlung der Zimtsäure in Gentisinsäure kann man formal 12 Reaktionsschritte anschreiben (s. Formelschema). Einige hiervon wurden bereits experimentell nachgewiesen. So führt der Einsatz von o-Cumarsäure-3-¹⁴C bei *Gaultheria procumbens* zur Bildung markierter Salicylsäure und Gentisinsäure (I → VI → VIII)¹⁰. Man könnte für die Biosynthese der Gentisinsäure aber auch eine Hydroxylierung ausschließlich auf der Ebene der Zimtsäuren, und eine 2,5-Dihydroxyzimtsäure als unmittelbare Vorstufe annehmen (IV → VIII). Eine 2,5-Dihydroxyzimtsäure ist aber als Naturstoff unbekannt.

Hydroxylierungsreaktionen treten auch bei Benzoesäuren auf, da Gentisinsäure aus Salicylsäure entstehen kann^{7, 11}. Der Einsatz von

⁴ S. *Gatenbeck* und I. *Lönnroth*, Acta chem. Scand. **16**, 2298 (1962).

⁵ T. A. *Geissman* und E. *Hinreiner*, Bot. Rev. **18**, 165 (1952).

⁶ H. *Kindl* und G. *Billek*, Österr. Chemiker-Ztg. **63**, 290 (1962).

⁷ R. K. *Ibrahim*, Flora [Jena] **154**, 481 (1964).

⁸ S. Z. *El-Basyouni*, D. *Chen*, R. K. *Ibrahim*, A. C. *Neish* und G. H. N. *Towers*, Phytochem. **3**, 485 (1964).

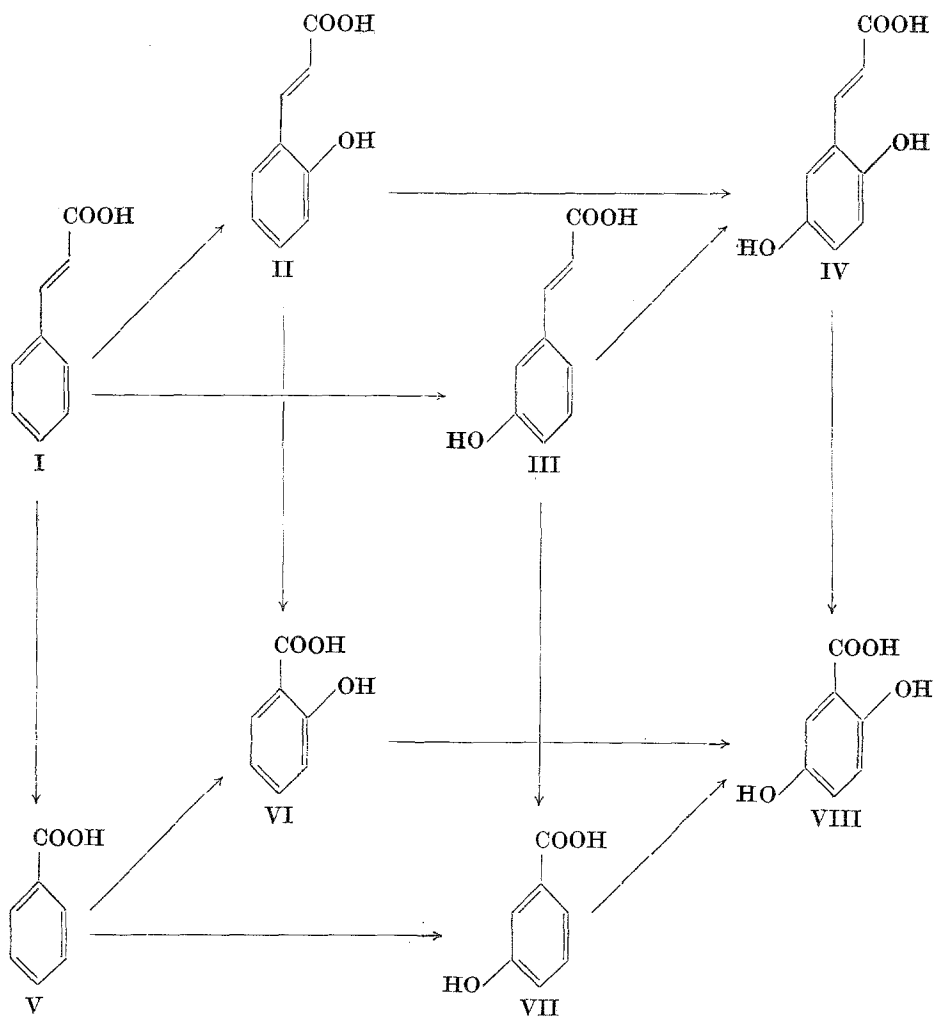
⁹ H. *Grisebach* und K. O. *Vollmer*, Z. Naturforsch. **19 b**, 781 (1964).

¹⁰ K. O. *Vollmer* und H. *Grisebach*, Z. Naturforsch. **21 b**, 435 (1966).

¹¹ R. K. *Ibrahim* und G. H. N. *Towers*, Nature [London] **184**, 1803 (1959).

Benzoessäure-(carboxyl- ^{14}C) führte in fast allen untersuchten Pflanzenarten zur Bildung markierter Salicylsäure und Gentisinsäure^{7, 8, 12}. Die Reaktionsfolge $\text{V} \rightarrow \text{VI} \rightarrow \text{VIII}$ scheint demnach biosynthesemöglich, obgleich die unsubstituierte Benzoessäure in jenen Pflanzenarten, bei denen sie in markierter Form zum Einsatz kam, als regulärer Inhaltsstoff nie nachgewiesen wurde.

Aus den bisher vorliegenden Versuchsergebnissen läßt sich für die natürliche Bildung der Gentisinsäure kein eindeutiger Biosyntheseweg



Formale Übergänge von Zimtsäure (I) in Gentisinsäure (VIII)

¹² H. Kindl und G. Billek, *Mh. Chem.* **95**, 1044 (1964).

ableiten. Wir haben deshalb alle vier in Frage kommenden Zimtsäuren (I–IV) und Benzoessäure (V) in markierter Form als Vorstufen bei verschiedenen Pflanzenarten eingesetzt (s. Formelschema).

Methodik

Pflanzenmaterial

Als Testpflanze wurde *Hydrangea macrophylla* (Gartenhortensie) wegen ihres sehr hohen Gehaltes an phenolischen Zimt- und Benzoessäuren gewählt³, sowie *Astilbe chinensis*, die reichlich Benzoessäuren, aber nur wenig an Zimtsäuren enthält. *Primula obconica* wurde herangezogen, da ein Vertreter diese Gattung in besonderem Maße zur Bildung der Gentisinsäure befähigt ist⁸. Schließlich setzten wir auch *Colchicum autumnale* (Herbstzeitlose) ein. Diese Pflanzenart enthält recht eigenartige Benzoessäuren, wie 2-Hydroxy-6-methoxybenzoessäure¹.

Vorstufen

Die kernnah markierten Zimtsäuren I und III erhielten wir direkt durch Kondensation carbonylmarkierter Benzaldehyde mit Malonsäure^{13, 14}. Ebenfalls in Analogie zu bekannten Verfahren wurde *trans*-o-Cumarsäure-3-¹⁴C (II) über Cumarin-3-carbonsäure-4-¹⁴C¹⁴ und Cumarin-4-¹⁴C hergestellt¹⁵. Auf diesem Weg konnte jedoch die 2,5-Dihydroxyzimtsäure-3-¹⁴C (IV) nicht erhalten werden, da die Ringöffnung des 6-Hydroxycumarins unbefriedigend verlief und die Isomerisierung¹⁵ zur *trans*-Form mit HgO wegen der Oxydationsempfindlichkeit mißlang. Es wurde daher m-Cumarsäure-3-¹⁴C (III) mit K₂S₂O₈ hydroxyliert¹⁶ und die als Nebenprodukt anfallende Kaffeesäure mittels präparativer Papierchromatographie abgetrennt.

Benzaldehyd-(carbonyl-¹⁴C)¹⁷ stellt man am besten nach der *Stevens–McFadyen*-Reaktion aus Benzoessäure-(carboxyl-¹⁴C) her. Zur Synthese carbonylmarkierter Hydroxybenzaldehyde kennt man einige Verbesserungen¹⁹ früherer Verfahren²⁰, die jene bei kleinen Substanzmengen schwierige *Rosenmund*-Reduktion der Säurechloride umgehen. *Backeberg* und *Staskun*²¹ zeigten, daß Arylnitrile mittels *Raney*-Nickel und NaH₂PO₂ zu Benzal-

¹³ S. A. Brown und A. C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol. **33**, 948 (1955).

¹⁴ R. Adams, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 5346 (1952).

¹⁵ T. R. Seshadri und P. Suryaprakasa Rao, Proc. Indian Acad. Sci. **3 A**, 293 (1936); Chem. Abstr. **30**, 5576 (1936).

¹⁶ I. H. Updegraff und H. G. Cassidy, J. Amer. Chem. Soc. **71**, 407 (1949).

¹⁷ T. A. Geissman, Atomic Energy Comm. Report, UCR L–1233; Nuc. Sci. Abstracts **5**, 4722 (1951); zit. in: A. Murray und D. L. Williams, Org. Synth. with Isotopes. S. 627. Interscience, 1958.

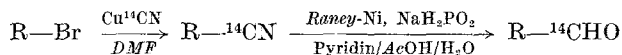
¹⁸ W. G. Dauben, J. C. Reid und P. E. Yankwich, Anal. Chem. **19**, 828 (1947).

¹⁹ G. Billek und E. F. Herrmann, Mh. Chem. **90**, 89 (1959); H. Grisebach und L. Patschke, Chem. Ber. **95**, 2098 (1962).

²⁰ K. Kratzl und G. Billek, Holzforsch. **7**, 66 (1953); Mh. Chem. **85**, 845 (1954); K. Freudenberg und M. Reichert, Naturwiss. **41**, 229 (1954); S. A. Brown und A. C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol. **34**, 769 (1956).

²¹ O. G. Backeberg und B. Staskun, J. Chem. Soc. [London] **1962**, 3961.

dehyden reduziert werden. Wir konnten diese Methode auch zur Synthese von Hydroxybenzaldehyden einsetzen. Ein Schutz der phenolischen Hydroxylgruppe ist nicht notwendig. Nach dem allgemeinen Syntheseweg



konnten zahlreiche carbonylmarkierte Hydroxybenzaldehyde, darunter auch jene, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, dargestellt werden. Diese Methode wird an anderer Stelle veröffentlicht²².

Aufarbeitung und Aktivitätsmessung

Nach der Infusion der markierten Vorstufen (s. exper. Teil) wurde das Pflanzenmaterial extrahiert, Phenol- und Säurefraktion des Extraktes papierchromatographisch getrennt und radioaktive Verbindungen mittels eines Chromatogramm-Scanners lokalisiert. Die so festgestellten radioaktiven Zonen wurden eluiert und rechromatographiert. Mit drei verschiedenen Laufmittelsystemen konnten alle in Frage kommenden Verbindungen hinreichend getrennt werden. Die Eluate der einzelnen Zonen des Chromatogramms wurden mit den fraglichen inaktiven Verbindungen versetzt, die Kristallisate jeweils bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt und die Einbauraten berechnet. Die direkte Messung der Aktivität am Chromatogramm diente lediglich zur Abschätzung der für die Verdünnung geeigneten Menge inaktiver Substanz. Infolge unvermeidlicher Verluste bei der Aufarbeitung stellen die so gefundenen Einbauraten (Tab. 1) Minimalwerte dar.

Ergebnisse

Tab. 1 zeigt die Ergebnisse des Einsatzes markierter Vorstufen. Hier sind nur jene Verbindungen angeführt, bei denen wenigstens einmal der Einbau der vorgegebenen markierten Säure nachgewiesen werden konnte. Tab. 2 hingegen enthält alle Verbindungen, die berücksichtigt wurden und damit auch jene, bei denen zumindest im Rahmen der Erfassungsmöglichkeit der Einbau nicht feststellbar war. Im folgenden sind die Versuchsergebnisse nach den eingesetzten Vorstufen zusammengefaßt.

2,5-Dihydroxyzimtsäure (IV)

2,5-Dihydroxyzimtsäure ist als Naturstoff unbekannt, wurde aber als mögliche Vorstufe der Gentisinsäure angesehen¹². Deshalb setzten wir die markierte 2,5-Dihydroxyzimtsäure bei *Hydrangea macrophylla* und *Astilbe chinensis* ein. Beide Pflanzen verhielten sich weitgehend ähnlich (Tab. 1). Ein merklicher Abbau zur Gentisinsäure (IV → VIII) fand nicht statt, wohl aber die Bildung einiger Umwandlungsprodukte, von denen nur 6-Hydroxycumarin identifiziert werden konnte. Möglicherweise entstand dieses Cumarin erst während der Aufarbeitung, vielleicht während der Glucosidspaltung im sauren Medium. In beträchtlichem

²² G. Billek, H. Kindl, A. Schimpl und F. P. Schmook, unveröffentlicht.

Tabelle 1

Vorstufe Pflanzenart *	2,5-Dihydroxy- zimtsäure-3- ¹⁴ C		m-Cumarsäure-3- ¹⁴ C	
	A	H	A	H
Benzoessäuren				
Benzoessäure	—	—	—	—
Salicylsäure	—	—	—	—
3-Hydroxybenzoessäure	—	—	0,11	0,11
4-Hydroxybenzoessäure	—	—	—	—
2,3-Dihydroxybenzoessäure	—	—	—	—
Gentisinsäure	—	—	—	—
Vanillinsäure	—	—	—	—
Zimtsäuren				
Zimtsäure	—	—	—	—
o-Cumarsäure	—	—	—	—
m-Cumarsäure	—	—	+	+
p-Cumarsäure	—	—	—	—
Kaffeesäure	—	—	—	—
Ferulasäure	—	—	—	—
Phenylpropionsäuren				
Phenylpropionsäure	—	—	—	—
2-Hydroxyphenylpropionsäure	—	—	—	—
4-Hydroxyphenylpropionsäure	—	—	—	—
Cumarine				
Cumin	—	—	—	—
6-Hydroxycumin	+	+	—	—
Umbelliferon	—	—	—	—
7-Hydroxy-8-methoxycumin	—	—	—	—

* Pflanzenart: A = *Astilbe chinensis*, H = *Hydrangea macrophylla*, P = *Primula obconica*, C = *Colchicum autumnale*.

Umfang bildeten sich auch polymere Substanzen. Es ist bekannt²³, daß der Pflanze künstlich eingeschleuste Verbindungen bisweilen durch Nebenreaktionen blockiert und so dem natürlichen Stoffwechsel entzogen werden. Aus dem Verhalten der 2,5-Dihydroxymimtsäure wurde daher im Hinblick auf die Biosynthese der Gentisinsäure kein endgültiger Schluß gezogen.

m-Cumarsäure (III)

In *Astilbe chinensis* und *Hydrangea macrophylla* wurde m-Cumarsäure zu 3-Hydroxybenzoessäure abgebaut, aber keine Gentisinsäure gebildet.

²³ M. H. Zenk und G. Müller, Z. Naturforsch. **19 b**, 398. (1964); M. H. Zenk, in G. Billek, Biosynth. of Aromat. Cpds., S. 45. Oxford: Pergamon Press 1966.

<i>trans</i> -o-Cumarsäure-3- ¹⁴ C				Zimtsäure-3- ¹⁴ C			Benzoessäure- (carboxyl- ¹⁴ C)
A	H	P	C	A	H	C	A
—	—	—	—	0,06	+	—	+
0,03	0,07	—	0,27	0,25	0,03	0,12	2,35
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	0,03	—	—	0,04
—	—	—	—	—	—	—	0,02
—	—	—	—	1,50	0,27	0,17	17,1
—	—	—	—	0,07	—	—	—
—	—	—	—	+	+	+	—
+	+	+	+	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	0,04	0,04	—	—
—	—	—	—	0,08	0,05	—	—
—	—	—	—	—	0,04	—	—
—	—	—	—	0,20	+	—	—
0,45	0,35	0,80	—	—	—	—	—
—	—	—	—	0,03	0,07	—	—
+	+	+	+	+	+	—	—
0,05	—	—	—	—	—	—	—
0,06	0,03	—	—	—	1,10	—	—
—	—	—	—	—	0,38	—	—

Dieser Übergang (III → VII) muß als eine unspezifische Abbaureaktion angesehen werden, da beide Verbindungen als Inhaltsstoffe dieser Pflanzenarten nie gefunden wurden. Nach Harborne und Corner²⁴ bildet m-Cumarsäure in *Solanum lycopersicum* (Tomate) Kaffeesäure und Ferulasäure. Diese Übergänge wurden bei den von uns untersuchten Pflanzenarten nicht beobachtet. Hingegen entstanden aus der m-Cumarsäure neben 3-Hydroxybenzoessäure auch einige andere Verbindungen, in Laufmittel A (s. exper. Teil) mit den *R_f*-Werten 0,15, 0,56, 0,70, 0,77, 0,83 und 0,89, die nicht identifiziert werden konnten. Die Verbindung mit *R_f* 0,70 entstand mit einer Einbaurate von über 1%. Rechromatographie in anderen Laufmitteln ließ vermuten, daß ein Flavonoid vorlag, zumal Alkalischmelze dieser Verbindung 3-Hydroxybenzoessäure als einziges radioaktives Spaltstück gab.

²⁴ J. B. Harborne und J. J. Corner, Biochem. J. **80**, 7 P (1961); **81**, 242 (1961).

Aus der m-Cumarsäure entstanden keine Cumarine; strukturell wären 6- und 8-Hydroxycumarin möglich. Auch eine Hydrierung der Seitenkette zur 3-Hydroxyphenylpropionsäure fand nicht statt.

trans-o-Cumarsäure (II)

Der Abbau zur Salicylsäure (II $\rightarrow$ VI) war mit geringen Einbau-raten wenig ausgeprägt, aber eindeutig nachweisbar. *Grisebach* und *Vollmer*¹⁰ fanden bei *Gaultheria procumbens* höhere Umwandlungsraten von o-Cumarsäure zu Salicylsäure.

Bei allen vier Pflanzenarten trat in besonderem Umfang die Bildung von Cumarin ein, was dem von *Brown*²⁵ vorgeschlagenen Biosyntheseweg entspricht. Es ist aber nicht auszuschließen, daß Cumarin erst während der Aufarbeitung entstand. Bemerkenswert ist das Auftreten von 6-Hydroxycumarin, da es doch 2,5-Dihydroxyzimtsäure als Zwischenstufe erfordert, denn eine direkte Hydroxylierung von Cumarin in Position 6 wurde nie beobachtet. Die Biosynthese des Umbelliferons (7-Hydroxycumarin) soll über die p-Cumarsäure verlaufen²⁶, aber auch o-Cumarsäure kann als Vorstufe dieses weit verbreiteten Cumarins dienen. Im Gegensatz zu anderen Hydroxyzimtsäuren wurde o-Cumarsäure auch hydriert, denn 2-Hydroxyphenylpropionsäure (Melilotsäure) entstand mit Einbau-raten bis zu 0,8%.

Zimtsäure (I)

In bezug auf die Biosynthese der Gentisinsäure übertraf Zimtsäure alle bisher als Vorstufen eingesetzten Verbindungen. In den drei unter-suchten Pflanzenarten entstand Gentisinsäure in Ausbeuten von 0,17 bis 1,50%. Benzoessäure und Salicylsäure wurden als Folgeprodukte der Zimtsäure nachgewiesen. Es ist demnach anzunehmen, daß die Gentisin-säure auf dem Weg Zimtsäure $\rightarrow$ Benzoessäure $\rightarrow$ Salicylsäure $\rightarrow$ Gentisin-säure (I $\rightarrow$ V $\rightarrow$ VI $\rightarrow$ VIII) gebildet wird. In einem früheren Versuch¹² gaben wir ebenfalls Zimtsäure-3-¹⁴C bei *Astilbe chinensis*, konnten aber Benzoessäure und Salicylsäure als Zwischenstufen nicht nach-weisen. Damals war die Versuchsdauer viel länger. Dies erklärt das Fehlen markierter Zwischenprodukte und läßt ferner annehmen, daß die Gentisinsäure in obiger Reaktionsfolge eine Endstufe darstellt.

Das Auftreten von p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure ent-spricht dem bekannten Stoffwechsel der unsubstituierten Zimtsäure²⁷.

²⁵ S. A. Brown, Canad. J. Biochem. Physiol. **40**, 607 (1962).

²⁶ S. A. Brown, G. H. N. Towers und D. Chen, Phytochem. **3**, 469 (1964); S. A. Brown, in: G. Billek, Biosynth. of Aromat. Cpds., S. 15. Oxford: Pergamon Press 1966.

²⁷ D. R. McCalla und A. C. Neish, Canad. J. Biochem. Physiol. **37**, 537 (1959); A. C. Neish, Ann. Rev. Plant Physiol. **11**, 55 (1960).

Tabelle 2

Substanz	Laufmittel		
	A	B	C
Benzoessäuren			
unsubstituiert	0,86	0,51	0,69
2-Hydroxy-	0,74	0,70	0,57
3-Hydroxy-	0,20	0,34	0,59
4-Hydroxy-	0,25	0,15	0,57
2,3-Dihydroxy-	0,29	0,39	0,55
2-Hydroxy-3-methoxy-	0,58	0,62	0,62
2,4-Dihydroxy-	0,16	0,22	0,43
2-Hydroxy-4-methoxy-	0,80	0,66	0,45
2,5-Dihydroxy-	0,11	0,47	0,55
2-Hydroxy-5-methoxy-	0,72	0,68	0,61
2,6-Dihydroxy-	0,19	0,70	0,65
2-Hydroxy-6-methoxy-	0,83	0,58	0,66
3,4-Dihydroxy-	0,02	0,07	0,46
3-Hydroxy-4-methoxy-	0,42	0,22	0,52
3-Methoxy-4-hydroxy-	0,58	0,15	0,54
3,5-Dihydroxy-	0,01	0,17	0,45
3,4,5-Trihydroxy-	0,00	zers.	0,34
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-	0,54	0,13	0,44
Phenyllessigsäuren			
2-Hydroxy-	0,34	0,67	0,74
3-Hydroxy-	0,20	0,40	0,81
4-Hydroxy-	0,20	0,37	0,70
2,5-Dihydroxy-	0,34 (<i>l</i>)	zers.	0,58 (<i>l</i>)
3-Methoxy-4-hydroxy-	0,44	0,32	0,77
Zimtsäuren			
unsubstituiert	0,89	0,60	0,52
2-Hydroxy-	0,39	0,42	0,43
3-Hydroxy-	0,30	0,41	0,41
4-Hydroxy-	0,29	0,32	0,36
2,3-Dihydroxy-	0,07	(0,15)	0,40
2-Hydroxy-3-methoxy-	0,67	0,36	0,40
2,4-Dihydroxy-	0,01	(0,04)	0,26
2-Hydroxy-4-methoxy-	0,43	0,30	0,27
2,5-Dihydroxy-	0,02	zers.	0,33
2-Hydroxy-5-methoxy-	0,38	0,35	0,40
3,4-Dihydroxy-	0,04	zers.	0,26
3-Hydroxy-4-methoxy-	0,53	0,33	0,27
3-Methoxy-4-hydroxy-	0,60	0,28	0,34
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-	0,48	0,14	0,27

In den sauren Laufmitteln A und C werden einige o-Hydroxyverbindungen teilweise oder völlig (*l*) lactonisiert. Im alkalischen Laufmittel B tritt bisweilen Zersetzung (zers.) ein; bei geringfügiger Zersetzung und noch erkennbarem *R_f*-Wert ist dieser in Klammern gesetzt.

Fortsetzung (Tabelle 2)

Substanz	Laufmittel		
	A	B	C
Phenylpropionsäuren			
unsubstituiert	0,89		0,58
2-Hydroxy-	0,48	0,63	0,65
3-Hydroxy-	0,30	0,46	0,77
4-Hydroxy-	0,30	0,50	0,72
2,3-Dihydroxy-	0,11	zers.	0,71
2-Hydroxy-3-methoxy-	0,72	0,50	0,77
2,5-Dihydroxy-	0,34 (l)	zers.	0,62 (l)
2-Hydroxy-5-methoxy-	0,43	0,53	0,71
3,4-Dihydroxy-	0,04	zers.	0,65
3-Hydroxy-4-methoxy-	0,58	0,46	0,70
3-Methoxy-4-hydroxy-	0,59	0,46	0,62
Cumarine			
unsubstituiert	0,90	0,87	0,65
6-Hydroxy-	0,18	0,68	0,49
6-Methoxy-	0,84	0,85	0,56
7-Hydroxy-	0,22	0,63	0,49
7-Methoxy-	0,86	0,87	0,56
8-Hydroxy-	0,57	0,59	0,58
8-Methoxy-	0,81	0,87	0,65
6,7-Dihydroxy-	0,02	zers.	0,32
6-Hydroxy-7-methoxy-	0,42	0,55	0,39
6-Methoxy-7-hydroxy-	0,29	0,53	0,37
6,7-Dimethoxy-	0,78		0,45
7,8-Dihydroxy-	0,13	zers.	0,43
7-Hydroxy-8-methoxy-	0,51	0,60	0,63
7-Methoxy-8-hydroxy-	0,40		0,48
7,8-Dimethoxy-	0,83		0,68

4-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure werden vermutlich durch Abbau der analog substituierten Zimtsäuren gebildet^{6, 8, 10, 12, 23}.

In merklichen Mengen entstanden 2- und 4-Hydroxyphenylpropionsäure. Bei *Hydrangea macrophylla* war aktives Umbelliferon und 7-Hydroxy-8-methoxy-cumarin nachweisbar, was frühere Befunde¹² bestätigt.

Benzoessäure (V)

Bei *Astilbe chinensis* wurde auch markierte Benzoessäure eingesetzt. Die Einbauraten (Tab. 1), im besonderen die sehr bevorzugte Bildung der Gentisinsäure, sprechen für den oben angegebenen Biosyntheseweg über Salicylsäure als Zwischenstufe.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man annehmen, daß im Verlauf der Biosynthese der Gentisinsäure, zumindest bei den hier untersuchten

Pflanzenarten, die Hydroxylierung erst auf der Stufe der Benzoesäuren erfolgt, d. h., daß die unsubstituierte Benzoesäure eine echte Zwischenstufe darstellt. Der Abbau der Zimtsäure (I $\rightarrow$ V) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, die Hydroxylierung der Benzoesäure (V $\rightarrow$ VI $\rightarrow$ VIII) scheint rasch zu verlaufen.

Andere Benzoesäuren hingegen, z. B. jene, die wenigstens eine Hydroxylgruppe in Position 4 tragen, entstehen durch direkten Abbau aus den entsprechend substituierten Zimtsäuren²³. Das Substitutionsmuster wird hier bereits auf der Stufe der Zimtsäuren festgelegt²⁸.

Experimenteller Teil

Synthese der markierten Vorstufen

Zimtsäure-3-¹⁴C: 90 mg Benzaldehyd-(carbonyl-¹⁴C) (0,5 mC/mM), hergestellt nach Geissman¹⁷, wurden mit 200 mg Malonsäure, 40 mg wasserfr. Na₂SO₄, 1,2 ml Pyridin und 0,5 ml Piperidin in einer N₂-Atmosphäre 4 Stdn. auf 110° erhitzt, mit 6 ml H₂O versetzt und langsam mit konz. HCl angesäuert¹³. Die ausgefallene Zimtsäure wurde aus 14 ml H₂O (Aktivkohle) umkristallisiert. Ausb. 100 mg (80% d. Th.).

trans-o-Cumarsäure-3-¹⁴C: 240 mg Salicylaldehyd-(carbonyl-¹⁴C) (0,5 mC/mM)²² wurden mit 0,15 ml einer Mischung von Pyridin und frisch destill. Anilin (20 : 1) und 400 mg Malonsäure 3 Stdn. auf 30° erwärmt¹⁴. Die gebildete Kristallmasse wurde zweimal mit einigen ml Äther digeriert, der Äther jeweils abgossen und der Rückstand mit 5 ml 10proz. HCl versetzt. Nach Kühlung wurde die Cumarin-3-carbonsäure-4-¹⁴C abgesaugt und getrocknet. Ausb. 261 mg (70% d. Th.), Schmp. 185—187°.

Ohne weitere Reinigung wurden 261 mg Cumarin-3-carbonsäure-4-¹⁴C in einem Glasschiffchen mit 500 mg Cu-pulver vermischt und in einem waagrecht angeordneten Sublimationsrohr (1 $\times$ 40 cm) 2 Stdn. bei Normaldruck auf 220° erhitzt. Das gebildete Cumarin-4-¹⁴C destilliert ab und erstarrt nach kurzer Zeit; Ausb. 120 mg (60% d. Th.).

Zur Lactonringöffnung¹⁵ wurden 120 mg Cumarin-4-¹⁴C mit 30 mg gelbem HgO und 5 ml 2*n*-NaOH 3 Stdn. auf 50° erwärmt. Die dunkelgelbe Lösung wurde vom HgO filtriert, mit H₂O nachgewaschen und mit 10proz. HCl angesäuert. Nach Kühlen, Absaugen und Trocknen über NaOH/P₂O₅ erhielt man 121 mg (90% d. Th.) *trans-o*-Cumarsäure-3-¹⁴C vom Schmp. 213—215°.

m-Cumarsäure-3-¹⁴C: 122 mg 3-Hydroxybenzaldehyd-(carbonyl-¹⁴C) (1 mC/mM)²² wurden mit 1 ml einer Mischung von Pyridin und frisch destill. Anilin (20 : 1) und 400 mg Malonsäure 16 Stdn. auf 55° erwärmt¹⁴. Nach Ansäuern mit 4 ml 10proz. HCl wurde mehrmals ausgeäthert, der Ätherextrakt dreimal mit 2 ml 5proz. NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt, die vereinigten wäßrigen Lösungen angesäuert und kontinuierlich mit Äther extrahiert.

²⁸ Übersichtsreferat: G. Billek und F. P. Schmook, Österr. Chemiker-Ztg. **67**, 401 (1966).

Der Rückstand des Ätherextrakts wurde bei 160° und 0,01 Torr im „liegenden Rohr“²⁹ sublimiert. Ausb. 116 mg (71% d. Th.), Schmp. 187—190°.

2,5-Dihydroxyzimtsäure-3-¹⁴C: 41 mg m-Cumarsäure-3-¹⁴C (1 mC/mM, 0,25 mM) wurden in 1,75 ml n-NaOH gelöst, mit 75 mg K₂S₂O₈ (0,275 mM) versetzt und 24 Stdn. bei Zimmertemp. belassen¹⁶. Danach wurde durch Zusatz eines Puffers (z. B. NaH₂PO₄ und verd. HCl) auf pH 3 eingestellt und die nicht umgesetzte m-Cumarsäure (etwa 40%) durch kontinuierliche Extraktion mit Äther entfernt. Die wäßrige Phase wurde mit 1 ml konz. HCl versetzt und nach langsamem Aufheizen 1 Stde. auf 70° belassen, um die gebildeten Schwefelsäureester zu zersetzen. Dies wurde vorzugsweise im Extraktor selbst durchgeführt. Durch Ätherextraktion (24 Stdn.) erhielt man ein Gemisch aus 2,5-Dihydroxyzimtsäure-3-¹⁴C und Kaffeesäure-3-¹⁴C. Extraktion und Abdampfen erfolgte bei möglichst tiefer Temperatur und im N₂-Strom, um Verharzungen zu vermeiden.

Das Reaktionsprodukt wurde strichförmig (50 cm) auf Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) aufgetragen und absteigend in CHCl₃—CH₃OH—H₂O—HCOOH (250 : 50 : 48 : 2)³⁰ chromatographiert. Im langwelligen UV (350 nm) ist die Trennung der Kaffeesäure (höherer R_f-Wert, dunkelblaue Fluoreszenz) von der 2,5-Dihydroxyzimtsäure (gelbgrüne Fluoreszenz) leicht zu verfolgen. Zur weiteren Reinigung wurde die Zone der 2,5-Dihydroxyzimtsäure mit Aceton eluiert und im Laufmittel A (Tab. 2) rechromatographiert. Die Eluate wurden stets unter N₂ abgedampft und Rückstände unter Lichtausschluß aufbewahrt. Ausb. an chromatographisch reiner 2,5-Dihydroxyzimtsäure-3-¹⁴C etwa 20% d. Th. (23% in einem inaktiven 100 g-Ansatz¹⁶).

Benzoessäure-(carboxyl-¹⁴C): Aus Phenylmagnesiumbromid und Ba¹⁴CO₃ konnte nach *Dauben*¹⁸ auch im Millimol-Maßstab Benzoessäure-(carboxyl-¹⁴C) (1 mC/mM) in einer Ausb. von 85% erhalten werden.

Infusion markierter Verbindungen

Für einen Versuchsansatz verwendeten wir 25—40 g frisches Pflanzenmaterial und 2—8 mg der markierten Vorstufe (0,5 oder 1,0 mC/mM) in 25—50 ml H₂O. Durch Zusatz von einigen mg KH₂PO₄ und NaHCO₃ wurden die Lösungen ungefähr auf den pK-Wert der betreffenden Säure eingestellt³¹. Die Infusion erfolgte durch die Blattstiele an einer schrägen, unmittelbar vor dem Einstellen in die Nährlösung unter Wasser angebrachten Schnittstelle, um Luftembolie zu vermeiden. Während der gesamten Versuchsdauer (4 bis 8 Tage) wurden die Pflanzen dem Licht von zwei Leuchtstoffröhren (Philips TL-E 40 W 32 und 32 W/32) ausgesetzt. Die Flüssigkeitsaufnahme betrug bei *Astilbe* und *Hydrangea* etwa 50 ml, bei *Colchicum* 70 ml und bei *Primula* nur 20 ml pro Tag. Knapp vor Ende der Infusion der Lösung der markierten Vorstufe wurde mit Leitungswasser auf das ursprüngliche Niveau aufgefüllt. Aktivitätsmessungen an den Restlösungen nach Beendigung der Versuche ergaben, daß meist mehr als 99% der vorgegebenen markierten Verbindungen vom Pflanzenmaterial aufgenommen wurden.

²⁹ G. Schmidt, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **229**, 67 (1956); Microchim. Acta [Wien] **1959**, 406; G. Billek, Atompraxis **4**, 371 (1958).

³⁰ L. Reio, J. Chromatogr. **1**, 338 (1958).

³¹ M. H. Zenk, Z. Pflanzenphysiol. **53**, 404 (1965).

Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Nach Beendigung der Infusion wurden die Blattstiele abgespült, die Blätter zerkleinert, sofort in siedendes Äthanol (80%) eingetragen und dreibis viermal mit je 100—150 ml Äthanol (80%) einige Std. zum Sieden erhitzt. Die vereinigten Extrakte wurden unter vermindertem Druck bis fast zur Trockene eingengt, der Rückstand mit 100 ml 0,5*n*-NaOH aufgenommen und dreimal mit je 150—200 ml Äther ausgeschüttelt. Zur Glykosidspaltung wurde die wäßrige Lösung durch Zusatz von 17 ml konz. HCl auf etwa 5% freie HCl eingestellt und 2 Std. im Wasserbad auf 70° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde erschöpfend, mindestens fünfmal ausgeäthert und den vereinigten äther. Lösungen zuerst die Säuren mit 2proz. NaHCO₃-Lösung (dreimal mit je 100 ml) und dann die Phenole mit 0,5*n*-NaOH (dreimal mit je 100 ml) entzogen. Die Lösungen der Phenol- und Säurefraktion wurden mit Celite und Aktivkohle versetzt, kurz geschüttelt, filtriert, der Filterrückstand mit H₂O nachgewaschen und die Filtrate angesäuert. Es wurde wieder fünfmal ausgeäthert, die beiden Extrakte mit Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Aliquote Teile dieser Lösungen setzten wir für die Papierchromatographie ein.

Papierchromatographie

Tab. 2 enthält die *R_f*-Werte (Schleicher & Schüll 2043 b, absteigend) der untersuchten Verbindungen in den Laufmitteln:

A: Benzol—Essigsäure—H₂O (4 : 2 : 1), organische Phase.

B: *n*-Butanol—konz. wäßr. NH₃—Äthanol—Benzol (5 : 3 : 2 : 1), einphasig.

C: 2proz. wäßrige Essigsäure.

Die Pflanzenextrakte wurden grundsätzlich zuerst im Laufmittel A chromatographiert. Aus den *R_f*-Werten ließen sich bisweilen Rückschlüsse auf die Zahl der freien Hydroxylgruppen noch nicht identifizierter Verbindungen ziehen. Laufmittel B diente vorwiegend zur Rechromatographie höher hydroxylierter Verbindungen, insbesondere der Gentisinsäure. Im alkalischen Medium dieses Laufmittels trat bei bestimmten Substitutionstypen jedoch mehr oder minder starke Zersetzung ein. Die *R_f*-Werte im Laufmittel C zeigen starke Abhängigkeit von der Art der Seitenkette, unterscheiden sich aber nur wenig bei Verbindungen mit stellungsisomer substituierten Aromaten.

Messung der Radioaktivität

Die Lokalisierung radioaktiver Zonen auf den Papierchromatogrammen erfolgte mittels Endfenster-GM-Zählrohr (Philips) im Verbindung mit einem „Continuous Chromatogram Scanner“, „Ratemeter“ (Tracerlab Inc.) und Einkanal-Streifenschreiber (Texas Instruments Inc.) mit einer Zählausbeute von 1,5%. Nach Elution radioaktiver Zonen und Anwendung der Verdünnungsmethode wurden Kristallisat und Mutterlauge in „unendlich dünner“ Schicht auf Al-Plättchen unter dem Endfenster-GM-Zählrohr (Zählausbeute 7%) gemessen. Bei sehr geringen Aktivitäten wurde auch ein Flüssig-Szintillationszähler (Liquid-Scintillation Counter 720, Nuclear Chicago Inc.) herangezogen.

Wir danken dem „Österreichischen Forschungsrat“ und der „Ludwig Boltzmann-Gesellschaft“, Wien, für das Überlassen der Meßgeräte.