

## WILHELM SANDERMANN und HANS STOCKMANN

Untersuchungen über die Biogenese von Terpenen und Terpenoiden  
mit markierten Verbindungen, II<sup>1)</sup>

### Über die Biogenese von Pulegon\*)

Aus der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft,  
Institut für Holzchemie und chemische Technologie des Holzes, Reinbek, Bez. Hamburg  
(Eingegangen am 6. Februar 1957)

Radioaktive  $\beta,\beta$ -Dimethyl-acrylsäure wurde in *Mentha pulegium* L. eingeführt und radioaktives Pulegon sowie radioaktives Phytol isoliert. Durch Abbau des Pulegons wurde gezeigt, daß die  $\beta,\beta$ -Dimethyl-acrylsäure ohne vorherige Aufspaltung zu kleineren Bausteinen zur Biogenese herangezogen wurde. Geraniumsäure konnte wegen ihrer Giftigkeit gegenüber *Mentha pulegium* nicht geprüft werden.

Die Funktion der  $\beta,\beta$ -Dimethyl-acrylsäure (I) als Zwischenprodukt war bei der Biogenese von Kautschuk vermutet<sup>2)</sup> und bei der Bildung von Carotinoiden<sup>3)</sup> und Cholesterin<sup>4-7)</sup> nachgewiesen worden. Wenn die Sterine sich auch nicht vollkommen in  $C_5$ -Bausteine gliedern lassen, so stehen sie doch über ihre biologische Vorstufe, das Squalen, in naher Verbindung mit den Terpenoiden. Neuerdings konnten die für die Bildung von I aus dem universellen Baustein Essigsäure erforderlichen Enzyme gefaßt werden<sup>8)</sup>. Da im Bereich der Mono- und Diterpene Versuche mit radioaktiver  $\beta,\beta$ -Dimethyl-acrylsäure noch ausstanden, wählten wir als Vertreter der Terpene in der vorliegenden Arbeit das Pulegon aus. Diese Verbindung läßt sich leicht isolieren und übersichtlich und in guter Ausbeute abbauen. Zu 80–90 % bildet es den Hauptbestandteil des Poleiöles von *Mentha pulegium* L. Diese Tatsache ist insofern von Bedeutung, als die eingebrachte Aktivität vornehmlich in eine Verbindung gelangt.

Für den Nachweis, daß die eingeführte radioaktive Substanz tatsächlich Zwischenprodukt der Biosynthese ist, genügt nicht die Feststellung der Radioaktivität des Endproduktes, da dieses Ergebnis auch erhalten wird, wenn vorher eine Spaltung zu kleineren und für die Biosynthese geeigneten Bruchstücken stattgefunden hat. Notwendig ist die Bestimmung des Verhältnisses der spezifischen Aktivitäten einzelner Atome zu der des Gesamtmoleküls. Nimmt man z. B. an, daß sich aus I

\*) Auszug aus der Dissertat. H. STOCKMANN, Univ. Hamburg 1957.

1) I. Mitteil.: W. SANDERMANN und H. STOCKMANN, Chem. Ber. **91**, 924 [1958], vorstehend.

2) J. BONNER und B. ARREGUIN, Arch. Biochemistry **21**, 109 [1949].

3) T. W. GOODWIN und V. V. MODI, Congr. intern. biochim. Résumés communs., 3e Congr., Bruxelles 1955, S. 87.

4) K. BLOCH, L. C. CLARK und I. HARARY, J. biol. Chemistry **211**, 687 [1954].

5) H. RUDNEY, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2595 [1954]; **77**, 1698 [1955].

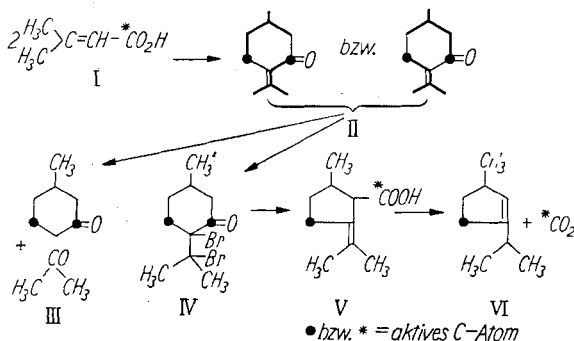
6) J. L. RABINOWITZ, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3037 [1954].

7) W. SANDERMANN und H. STOCKMANN, IV. Mitteil., im Druck.

8) J. A. JOHNSTON, D. W. RACUSEN und J. BONNER, Proc. nat. Acad. Sci. USA **40**, 1031 [1954].

Pulegon (II) bildet, so müssen die radioaktiven C-Atome die in II angegebene Stellung einnehmen. Das aktive Kohlenstoffatom der Ketogruppe ist gemäß der aufgezeichneten Reaktionsfolge als Kohlendioxyd abspaltbar. Dessen spezif. Aktivität muß dann neunmal so groß sein wie die des Pulegens (VI), da dessen radioaktives Kohlenstoffatom durch acht inaktive verdünnt wird. Findet hingegen bei der Biogenese primär ein Abbau von I z. B. zu Essigsäure statt, so verteilt sich die Aktivität auf jedes zweite Kohlenstoffatom, und das Verhältnis der spezif. Aktivitäten muß dann  $9/3 : 1$  sein.

Zur Kontrolle wurde die nach III abspaltbare Isopropylidengruppe auf Radioaktivität geprüft. Das Aceton kann als Dinitrophenylhydrazon papierchromatographisch nach der Methode von D. F. MEIGH<sup>9)</sup> von dem mitentstandenen Methylcyclohexanon sowie nichtumgesetzten II getrennt werden.



Der Abbau von II über IV zu VI wurde erstmalig von O. WALLACH<sup>10)</sup> beschrieben. Die hydrolytische Spaltung zu III konnte durch Arbeiten in homogener Phase (Zusatz von Äthanol) verbessert werden. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten von Kohlendioxyd und VI betrug 8,57 : 1, während das abgespaltene Aceton keine Radioaktivität aufwies. Nicht umgesetzte I war nicht nachweisbar.

Radioaktive Geraniensäure konnte in *Mentha pulegium* nicht eingeführt werden, da auch noch bei einer Verdünnung von 1 : 10 000 die Pflanzen abstarben.

Aus den Versuchen ergibt sich damit eindeutig, daß  $\beta, \beta$ -Dimethyl-acrylsäure ohne Abbau in kleinere Bausteine bei der Biosynthese von Terpenen verwandt und nach dem Prinzip der „Kopf-Schwanz“-Verknüpfung eingebaut wird.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT sind wir für die Unterstützung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

<sup>9)</sup> Nature [London] **170**, 579 [1952].

<sup>10)</sup> Liebigs Ann. Chem. **289**, 340, 349, 353 [1896].

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Pulegon (II) aus  $\beta,\beta$ -Dimethyl-acrylsäure:* 100 ccm der neutralisierten Lösung von 100 mg markierter  $\beta,\beta$ -Dimethyl-acrylsäure (I) mit 0.5 mC wurden mit dem gleichen Volumen Knopscher Lösung versetzt und junge, gut wachsende, etwa 3–4 cm hohe Pflänzchen von *Mentha pulegium* L. 14 Tage in dieser Lösung belassen. Um eine möglichst quantitative Aufnahme von I zu erzielen, wurde im Verh. 1:1 mit Wasser verdünnte Knopsche Lösung nur in dem Maße zugegeben, daß die Pflanzen nicht vertrocknen konnten. So wurde die Radioaktivität der Lösung bis auf 2 % aufgenommen. Das *Pulegon* wurde nach Zerkleinerung der Pflanzen durch Wasserdampfdestillation gewonnen, wobei nach beendeter Operation nochmals 0.25 ccm inaktives *Pulegon* zum Destillationsrückstand gegeben wurden und abermals bis zur Konstanz der übergegangenen Ölmenge destilliert wurde (1.1 ccm). Die organische Phase wurde in Äther aufgenommen und mit Natriumhydrogencarbonatlösung entsäuert. Der wäbr. Rückstand wies eine Gesamtaktivität von 1080 Zerfällen/Min. auf, d. h. weniger als  $1/2\%$  der *Pulegon*aktivität (s. u.).

Aus der ätherischen Lösung wurde das Semicarbazon isoliert, wobei die Ausbeute an Radioaktivität durch zweimalige Zugabe von je 500 mg reinstem inaktivem *Pulegon*-semicarbazon zur Mutterlauge und abermalige Umkristallisation erhöht werden konnte.

Sämtliche benutzten Geräte waren mit einer Lösung von 0.25 ccm *Pulegon* in Methanol gespült worden. Die Gesamtausbeute an *Pulegon*-semicarbazon betrug 1985 mg, die in 500 ccm Ligroin aufgenommen wurden. Davon wurden 2 ccm entnommen und vorsichtig im V2A-Meßschälchen abgedunstet. Aus dem Durchmesser des Rückstandes von 19 mm, entsprechend der Fläche 2.83 qcm, ergibt sich das Flächengewicht 2.80 mg/qcm. Gemessene Zerfälle: 5381/Min. Unter Berücksichtigung der Selbstabsorption (Division durch 0.57) ergaben sich 9440 Zerfälle/Min.; damit waren 7.87 % der ursprünglichen Aktivität im *Pulegon* vorhanden.

Aus der Ligroinlösung wurde durch Einengen reines Semicarbazon gewonnen, Schmp. 172°. Die Ausbeute an Aktivität wurde durch Zusatz von zweimal je 500 mg inaktiven Semicarbazons erhöht, wie oben angegeben. Die Spaltung wurde, wie beim Methylhepton beschrieben<sup>1)</sup>, durchgeführt.

*Abbau von II zu Aceton und Methylcyclohexanon:*  $1/3$  des Rückstandes wurde mit 2 ccm Wasser und soviel Äthanol versetzt, daß eben eine klare Lösung entstand, und im Bombenrohr 5 Stdn. auf 250° erhitzt. Nach Eingießen in schwefelsaure Dinitrophenylhydrazinlösung wurden mit dreimal je 15 ccm Heptan die Dinitrophenylhydrazone extrahiert, die organische Phase entsäuert, auf 10 ccm eingengt und 0.1 ccm für die Papierchromatographie nach MEIGH<sup>9)</sup> eingesetzt.

*Messung im Gasdurchflußzähler*

Nullwert: 48 Zerfälle/Min.; Aceton-DNP: 58 Zerfälle/Min.; Methylcyclohexanon-DNP: 5381 Zerfälle/Min.; *Pulegon*-DNP: 2736 Zerfälle/Min.

*Abbau von II zu Pulegen (VI) und CO<sub>2</sub>:* Der Rest von II wurde mit etwa der doppelten Menge Eisessig verdünnt, in Eis/H<sub>2</sub>O gekühlt und Br<sub>2</sub> solange tropfenweise zugefügt, bis die Bromfarbe deutlich bestehen blieb. Nach Neutralisation wurde das rohe *Dibromid* ohne weitere Reinigung mit 0.5 g Na in 5 ccm absol. Methanol 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht, mit Wasserdampf Methanol und Spuren nichtumgesetzten *Pulegons* entfernt, die alkalische Schicht mit Äther extrahiert und nach Ansäuern mit verd. Schwefelsäure V in Freiheit gesetzt. Die Decarboxylierung von V erfolgte im Wasserstoffstrom unter Zusatz einer Spur *p*-Toluolsulfonsäure am Rückflußkühler durch vorsichtiges Erhitzen. Das entweichende CO<sub>2</sub> wurde in 100 ccm

0.2*n* carbonatfreier NaOH aufgefangen und 10 ccm dieser Lösung mit Bariumchlorid gefällt. Erhalten wurden 103.2 mg Bariumcarbonat mit 6073 Zerfällen/Min.

Der Decarboxylierungsrückstand wurde in Äther aufgenommen, mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung entsäuert, der Äther nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgedampft und VI in einer Mikrodestillationsapparatur übergetrieben. Das Destillat wurde nach VAN SLYKE-FOLCH verbrannt, das Kohlendioxyd in 150 ccm 1*n* carbonatfreier NaOH aufgefangen, davon 15 ccm auf 200 ccm verdünnt und 25 ccm dieser Lösung mit Bariumchlorid gefällt. Erhalten wurden 109.7 mg Bariumcarbonat mit 709 Zerfällen/Min.

Die Filterfläche betrug 2.54 qcm, das Verhältnis der spezif. Aktivitäten also 8.57 : 1.

Der trockene Rückstand der Wasserdampfdestillation (63 g) wurde wie üblich<sup>11)</sup> auf *Phytol* verarbeitet. Erhalten wurden 105 mg, die in 25 ccm Äther aufgenommen wurden. Davon wurde 1 ccm im V2A-Meßschälchen abgedunstet. Das Flächengewicht betrug bei einer Gesamtfläche von 2 qcm mithin 2 mg/qcm. Gemessen 23 100 Zerfälle/Min.; Korrekturfaktor für Selbstabsorption: 0.656. 2.93% der Ausgangsaktivität waren in das *Phytol* übergegangen.

<sup>11)</sup> A. TREIBS in G. KLEIN, Handbuch der Pflanzenanalyse 3. Bd., S. 1360, Springer Verlag, Wien 1932.

## WILHELM SANDERMANN und HANS STOCKMANN

Untersuchungen über die Biogenese von Terpenen und Terpenoiden  
mit markierten Verbindungen, III<sup>1)</sup>

### Über die Biogenese der Coniferenharzsäuren \*)

Aus der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft,  
Institut für Holzchemie und chemische Technologie des Holzes, Reinbek, Bez. Hamburg  
(Eingegangen am 6. Februar 1957)

Radioaktive  $\beta,\beta$ -Dimethyl-acrylsäure, welche in der Carboxylgruppe markiert ist, wird einer Kiefer zugeführt. Die gebildeten aktiven Harzsäuren liefern bei der milden Oxydation aktiven Formaldehyd und aktives Aceton. Dieses Ergebnis kann nur so gedeutet werden, daß Dextropimarsäure und Abietinsäure biogenetisch aus einem gemeinsamen Zwischenprodukt entstanden sind und die Isopropylgruppe der Abietinsäure sich sekundär unter Umlagerung gebildet hat.

Die Harzsäuren der Kiefer lassen sich in zwei Klassen mit recht verschiedenen Kohlenstoffgerüsten einteilen. Das der Dextropimarsäure (I) mit regelmäßigem Aufbau aus vier Isopentanbausteinen wird auch in vielen anderen Naturstoffen angetroffen: Vitamin A, Agathendisäure, Manool, Sklareol, Marrubiin, Columbin u. a. Aber auch das unregelmäßig aufgebaute Kohlenstoffgerüst der Harzsäuren vom Typ der Abietinsäure (II) ist weit in der Natur verbreitet. Es findet sich im Ferruginol,

\*) Auszug aus der Dissertat. H. STOCKMANN, Univ. Hamburg 1957.

<sup>1)</sup> II. Mitteil.: W. SANDERMANN und H. STOCKMANN, Chem. Ber. **91**, 930 [1958], vorstehend.