

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 NaHCO₃-Lösung entsäuert, der Äther nach Trocknen über Na₂SO₄ 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 üblich¹¹⁾ 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.

¹¹⁾ 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, III¹⁾

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)

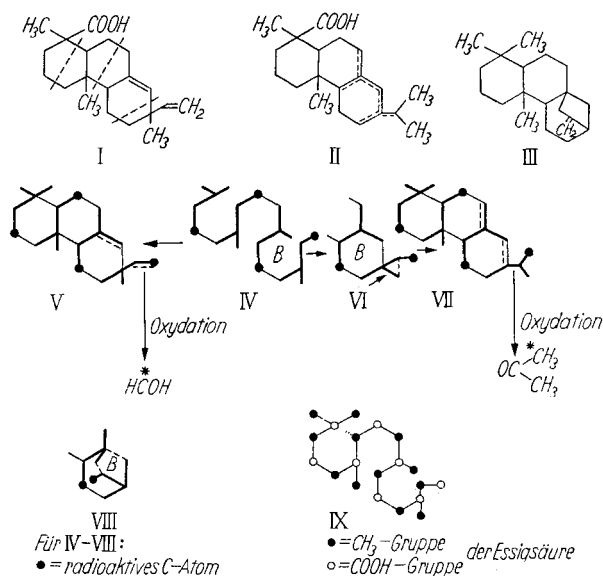
Radioaktive β,β -Dimethyl-acrylsäure, welche in der Carboxylgruppe markiert ist, wird einer Kiefer zugeführt. Die gebildeten aktiven Harzsäuren liefern bei der milden Oxydation aktiven Formaldehyd und aktives Aceton. Dieses Ergebnis kann nur so gedeutet werden, daß Dextropimarsäure und Abietinsäure biogenetisch 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.

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

Hinokiol, Sugiol, Fichtelit und in etwas anderer Form im Phyllocladen (III)²⁾, Dihydroviatchin und dem natürlichen Süßstoff Steviosid. Das gleichzeitige Vorkommen von Harzsäuren mit den Gerüsten I und II in der Kiefer ließ schon den einen von uns vermuten, daß die Biogenese der unterschiedlichen Harzsäuren möglicherweise von einer gemeinsamen Muttersubstanz aus erfolgt³⁾. T. HASSELSTRÖM übernahm diese Hypothese und glied ihre Formulierung der inzwischen geänderten, endgültigen Struktur der Dextropimarsäure an⁴⁾. Nach dieser Hypothese soll sich eine Zwischenverbindung mit dem Kohlenstoffgerüst IV mit regelmäßigem Aufbau durch Ringschluß in das Gerüst der Dextropimarsäure (V) umwandeln und durch eine WAGNER-MEERWEINSche Umlagerung in das Kohlenstoffgerüst der Abietinsäure (VII). Diese Anschauungen wurden neuerdings auch von L. RUZICKA⁵⁾ und E. WENKERT⁶⁾ vertreten und vertieft. Die Umwandlung von IV in VII könnte auch über ein Zwischenprodukt VIII führen, das in stabilisierter Form im Ring B des Phyllocladens (III) vorliegt.



Die geschilderte Theorie der Biogenese läßt sich leicht auf ihre Gültigkeit prüfen. Trifft sie nämlich zu, so muß sich die Isopropylgruppe in II sekundär gebildet haben.

Zur Entscheidung dieser Frage würde sich prinzipiell auch markierte Essigsäure eignen; Methyl- und Carboxylgruppen müßten dann — unter Berücksichtigung der Anschauungen von BONNER und ARREGUIN — die in IX angegebenen Stellen einnehmen. Die Prüfung würde auf die Feststellung hinauslaufen, ob die Methylgruppen des durch Aboxydation der Isopropylgruppe von II erhaltenen Acetons z. T. von der Carboxylgruppe der Essigsäure stammen oder nicht. Im ersteren Falle hätte sich die Isopropylgruppe sekundär unter Umlagerung

²⁾ C. W. BRANDT, *New Zealand J. Sci. Technol.*, Sect. B **34**, 46 [1952].

³⁾ W. SANDERMANN, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **71**, 2005 [1938]; *Österr. Chemiker-Ztg.* **45**, 49 [1942].

⁴⁾ Paper Trade J. **128**, 17 [1949].

⁵⁾ *Experientia* [Basel] **9**, 357 [1953].

⁶⁾ *Chem. and Ind.* **1955**, 282.

gebildet. Die experimentelle Schwierigkeit liegt bei der Erfassung des nur in sehr geringer Menge erhältlichen Acetons.

Da außerdem Hinweise auf den spezifischen Baustein der Terpenverbindungen gesucht wurden, setzten wir statt der Essigsäure markierte β,β -Dimethyl-acrylsäure ein.

In der Carboxylgruppe markierte β,β -Dimethyl-acrylsäure müßte, falls keine Umlagerung stattfindet, eine Isopropylgruppe in II ergeben, die der der Ausgangssubstanz entspricht, die also keine Radioaktivität aufweisen würde*). Erweist sich das abgespaltene Aceton als radioaktiv, so hat mit großer Wahrscheinlichkeit während der Cyclisierung von IV eine Umlagerung im o. a. Sinne stattgefunden.

Die β,β -Dimethyl-acrylsäure wurde als Kaliumsalz einer etwa 1 m hohen Kiefer durch die Wurzeln zugeführt und das pflanzliche Material nach 6 Wochen aufgearbeitet. Die hölzernen Anteile wurden mit Wasser, dann mit Benzol/Äthanol (1:1) extrahiert und aus den Nadeln durch Wasserdampfdestillation das Terpentinöl abgetrennt. Zur Weiterverarbeitung gelangte nur die Benzol/Äthanol-Fraktion, die wäßrige Phase enthielt keine Radioaktivität. Der Extrakt wurde auf bekannte Weise in saure Anteile (Harz- und Fettsäuren) und Unverseifbares (Terpentinöl, Sterine usw.) getrennt. Die Trennung der Harzsäuren von den Fettsäuren gelang leicht auf Grund der Tatsache, daß nur letztere mit Alkoholen in Gegenwart von Säuren verestert werden.

Da die oxydative Abspaltung von Formaldehyd aus Dextropimarsäure und die von Aceton aus Abietinsäure für die Untersuchung von grundlegender Bedeutung war, wurde die quantitative und schonende Trennung beider Harzsäuregruppen angestrebt. Alle Verfahren setzen aber größere Substanzmengen voraus und eigneten sich daher nicht für die vorliegenden geringen Mengen aktiver Substanz, die möglichst nicht mit inaktivem Material verdünnt werden sollte.

Eine solche Trennung kann prinzipiell durch fraktionierte Kristallisation der Amin- bzw. Hydroxyaminsalze erreicht werden⁷⁾. Auch kann man die Harzsäuren vom Abietinsäuretyp in das Maleinsäureanhydrid-Addukt überführen, das sich leicht von den nicht reagierenden Dextropimarsäuren abtrennen läßt⁸⁾. Das zuletzt angeführte Verfahren liefert also nicht die freie Abietinsäure, sondern deren Maleinaddukt. Zwar läßt sich dieses durch Pyrolyse teilweise wieder in Abietinsäure zurückverwandeln, doch verringert sich wegen gleichzeitig mit entstehender Dehydroabietinsäure die Ausbeute. Diese Schwierigkeit konnten wir umgehen, da sich aus dem Maleinaddukt durch „Umdienierung“ mit α -Phellandren leicht Abietinsäure zurückgewinnen läßt.

Aus den genannten Gründen schien es uns vorteilhafter, das nach Isomerisierung vorliegende Gemisch von Abietinsäure und Dextropimarsäure direkt im „Eintopf-Verfahren“ zu oxydieren. Das angewandte Oxydationsverfahren mußte so milde und spezifisch sein, daß die Dextropimarsäuren nur Formaldehyd gaben und die Abietinsäure nur Aceton. Eine Möglichkeit bot die Methode von C. E. BRICKER und K. A. ROBERTS⁹⁾. Nach diesen Autoren lassen sich endständige Methylengruppen durch ein

*) Das gilt nur für den Fall, daß kein Abbau der β,β -Dimethyl-acrylsäure zu kleineren Bruchstücken stattfindet. Dafür liegen aber keine Anzeichen vor, wie der Abbau des aus β,β -Dimethyl-acrylsäure biosynthetisch erhaltenen Pulegons ergeben hatte¹⁾.

⁷⁾ G. C. HARRIS und T. F. SANDERSON, J. Amer. chem. Soc. **70**, 334 [1948].

⁸⁾ G. C. HARRIS und T. F. SANDERSON, J. Amer. chem. Soc. **70**, 2079 [1948].

⁹⁾ Analytic. Chem. **21**, 1331 [1949].

Gemisch von Kaliumpermanganat und Überjodsäure in Formaldehyd überführen. Der vorgeschriebene Zusatz von Äthanol soll anscheinend bezwecken, den gebildeten Formaldehyd durch Bildung von Diäthylformal der oxydierenden Wirkung des Kaliumpermanganats zu entziehen. Da bereits D. F. MEIGH¹⁰⁾ gezeigt hatte, daß sich flüchtige Aldehyde und Ketone leicht in Form ihrer 2.4-Dinitro-phenylhydrazone papierchromatographisch trennen lassen, schien diese Methode in Verbindung mit den oben genannten Oxydationsverfahren einen einfachen Weg zur Lösung der Aufgabe zu weisen. In zahlreichen Modellversuchen wurde diese Annahme bestätigt. Das Oxydationsverfahren verlief jedoch weit besser, wenn zusätzlich — zur Homogenisierung des Gemisches — noch Tetrahydrofuran zugefügt wurde. Da handelsübliches Tetrahydrofuran allein jedoch schon geringe Mengen an Formaldehyd gab, mußte es zuvor zur Reinigung mit wäßriger Kaliumpermanganat- sowie Überjodsäurelösung gekocht werden. Danach zeigten die Oxydationsversuche, daß Dextropimarsäure mit einer Ausbeute von 60 % Formaldehyd und kein Aceton, Abietinsäure andererseits Aceton und keinen Formaldehyd gab. Gemische beider Säuren lieferten entsprechende Mengen Formaldehyd und Aceton. Die papierchromatographische Trennung der 2.4-Dinitro-phenylhydrazone bot keine Schwierigkeiten.

Nachdem damit die Eignung der Methode erwiesen war, wurde sie auf das radioaktive Harzsäuregemisch angewandt. Es zeigte sich, daß sowohl Formaldehyd als auch Aceton aktiv waren. Dieser Befund zeigt, daß die Vinylgruppe der Dextropimarsäure ursprünglich ist, die Isopropylgruppe der Abietinsäure hingegen erst durch eine Folgereaktion entstanden ist. Damit erhält die alte Hypothese von einem gemeinsamen biogenetischen Zwischenprodukt der Harzsäuren eine starke Stütze.

Versuche, jeweils in der Carboxylgruppe markierte Geraniumsäure, Farnesyssäure und ω -Geranyl-geraniumsäure als Salze durch die Wurzel in die Kiefer einzuführen, schlugen fehl. Gewiß waren sie im sauren Wurzelgebiet in die freien, nicht aufnahmefähigen Säuren gespalten worden.

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

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Einführung der markierten β,β -Dimethyl-acrylsäure in die Kiefer und Isolierung der radioaktiven Harzsäuren: Die benötigte radioaktive β,β -Dimethyl-acrylsäure wurde nach dem früher beschriebenen Verfahren¹¹⁾ hergestellt. 100 ccm der neutralisierten Lösung von 100 mg β,β -Dimethyl-acrylsäure wurden einer etwa 1 m hohen Kiefer durch die Wurzeln zugeführt. Pro Wurzel wurden täglich etwa 15 ccm aufgenommen. Bei Verwendung von 3 Wurzeln war die Tränklösung in 2 bis 3 Tagen aufgenommen. In derselben Zeit war auch in den oberirdischen Organen des Baumes Aktivität nachweisbar. Der Baum wurde häufig verwundet und der Harzfluß mit 60-proz. Schwefelsäure gefördert. Nach 6 Wochen wurde die Kiefer aus dem Erdreich entnommen, in eine luftdichte Kammer gebracht und die CO₂-Ausscheidung von 24 Stdn. durch Ausspülen der Kammer mit kohlendioxidfreiem Stick-

¹⁰⁾ Nature [London] 170, 579 [1952].

¹¹⁾ W. SANDERMANN und H. STOCKMANN, Chem. Ber. 91, 924 [1958].

stoff als Bariumcarbonat gefällt. Es wurden 203 mg Bariumcarbonat gefällt und davon 52 mg gemessen. Die Filterfläche betrug 2.54 qcm, die Aktivität 910 Zerfälle/Min. Letztere wurde mit dem Korrekturfaktor 6 multipliziert. Daraus ergab sich, daß nach 6 Wochen in 24 Stdn. 0.07 % der eingebrachten Aktivität veratmet wurden.

Im Blindversuch hatte sich gezeigt, daß das Testbäumchen nicht ständig zur Messung der Kohlendioxydausscheidung im luftdichten Glaskasten aufbewahrt werden konnte. Deshalb wurde auf laufende Messungen verzichtet.

Die holzigen Teile des Baumes wurden zerspält und — da der wasserlösliche Extrakt nicht radioaktiv war — sofort mit Benzol/Äthanol (1:1) unter Stickstoff extrahiert, bis das ablaufende Eluat keine Radioaktivität mehr zeigte. Der Extrakt wurde zur Trockne verdampft und in $n/2$ alkoholischer KOH aufgenommen. Nach Zusatz von Wasser wurden die Neutralteile ausgeäthert und die Extraktion 6—8mal wiederholt. Die von Neutralteilen befreite, eingeengte wäßrig-alkoholische Seifenlösung wurde angesäuert und das Gemisch von Harz- und Fettsäuren ausgeäthert. Der nach Abdestillieren des Äthers verbleibende Rückstand wurde mittels partieller Veresterung durch 10 min. Kochen in Methanol in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure in Fettsäureester und unveresterte Harzsäuren getrennt.

Abspaltung und Bestimmung von Formaldehyd und von Aceton: Etwa 60 mg des von Fettsäureestern befreiten, eingedunsteten Harzsäurerückstandes wurden in einem Mikrodestillationskölbchen mit 3 ccm Äthanol und 2 ccm 20-proz. wäßr. Überjodsäurelösung versetzt, wobei über KMnO_4 und Überjodsäure gereinigtes Tetrahydrofuran zugegeben wurde. Danach wurde tropfenweise 1-proz. Kaliumpermanganatlösung zugegeben, bis die rötliche Färbung 1 Min. bestehen blieb. Anschließend wurden die flüchtigen Oxydationsprodukte in eine schwefelsaure, wäßr. Lösung von 2.4-Dinitro-phenylhydrazin überdestilliert. Danach wurde 3 mal mit je 15 ccm Heptan extrahiert, die obere Schicht mit Wasser ausgewaschen und die Trennung der 2.4-Dinitro-phenylhydrazone papierchromatographisch nach MEIGH¹⁰ vorgenommen. Dazu wurden 0.1 ccm der auf 5 ccm eingeengten Heptanlösung verwandt. Die Messung der *Flecken des Papierchromatogramms im Gasdurchflußzähler* lieferte folgende Ergebnisse: Nullwert: 36 Impulse/Min.; Formaldehyd-2.4-dinitro-phenylhydrazon: 328 Impulse/Min.; Aceton-2.4-dinitro-phenylhydrazon: 413 Impulse/Min.