

anlaßte uns, das Piperonal, dessen Decarboxylierungsprodukt das Methylendioxybenzol ist, unter den entsprechenden Bedingungen zu behandeln.

Auf diese Weise erhielten wir das Methylendioxybenzol, frei von Nebenprodukten, in 80—90proz. Ausbeute.

### Experimenteller Teil

In einem Zweihalskolben, versehen mit einem CO<sub>2</sub>-Einleitungsrohr, einem mit Raschig-Ringen gefüllten Zwischenstück (von ca. 10 cm Länge) und einem Destillationsaufsatz mit absteigendem Luftkühler und Vorstoß, der in einer 100 ccm-Vorlage mündet, erhitzt man, nachdem man aus der Apparatur durch CO<sub>2</sub> den Luftsauerstoff verdrängt hat, nach Zusatz von 0,5 g Palladiumkohle (10<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Pd) 50 g Piperonal 1 Stde. auf 240° und eine weitere Stde. auf 250° Ölbadtemp. Das sich bei der Reaktion entwickelnde CO leitet man durch eine mit Wasser gefüllte Waschflasche und erhitzt solange, bis kein CO mehr durch Verbrennen oder Auffangen nachweisbar ist (ca. 2 Stdn.). Nach Auswaschen des Reaktionskolbens und der Apparatur mit Äther, Abfiltrieren des Katalysators und Vereinigen mit dem Destillat erhält man nach Vertreiben des Äthers das Methylendioxybenzol vom Sdp. 173—175°, Sdp.<sub>10</sub> 57—58° als farbloses Öl in 80—90<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Ausbeute. IR-Spektren<sup>7,12</sup>.

<sup>12</sup> L. H. Briggs, L. D. Colebrook, H. M. Fales und W. C. Wildman, Anal. Chem. **29**, 904 (1957).

## Zur Biosynthese pflanzlicher Stilbene, I. Mitt.:

### Zur Biosynthese des Hydrangenols (Vorläufige Mitteilung)

Von

G. Billek und H. Kindl

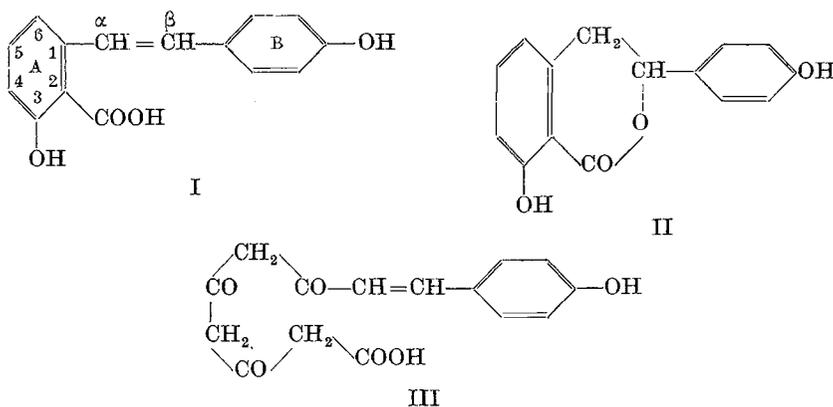
Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 14. März 1961)

Das Stilben Hydrangeasäure (I) und das Hydrangenol (II), ein 3,4-Dihydroisocumarin-derivat, sind Inhaltsstoffe<sup>1</sup> der Gattung *Hydrangea* der Familie der *Saxifragaceae*. Der wichtigste Vertreter dieser Gattung ist die Gartenhortensie (*Hydrangea opuloides*).

<sup>1</sup> Y. Asahina und J. Asano, Ber. dtsh. chem. Ges. **63**, 429 (1930).

Die Substitution des Ringes A (Carboxylgruppe in 2, Hydroxylgruppe in 3) läßt einen Aufbau aus Acetat-einheiten entsprechend dem Schema von *Birch* und *Donovan*<sup>2</sup> vermuten. Ring B und die C Atome 1,  $\alpha$



und  $\beta$  könnten nach der von *Davis* und *Sprinson*<sup>3</sup> angegebenen Reaktionsfolge aus dem Pentosephosphat- bzw. Photosynthese-cyclus über die Shikimisäure einer Phenylpropaneinheit entstammen. Somit wäre auch für diese Stilbene ein Zusammentreffen von zwei Synthesewegen anzunehmen, ähnlich wie es für die Biosynthese der Flavonoide bewiesen wurde<sup>4</sup>. Die Aggregation der einzelnen Bausteine kann durch die formale Vorstufe III wiedergegeben werden, die deutlich erkennen läßt, daß zur Bildung der Hydrangeasäure bzw. des Hydrangenols ein reduktiver Schritt notwendig ist, da die entsprechende Sauerstofffunktion in Stellung 5 fehlt.

Als Versuchsobjekte haben wir einzelne isolierte Organe der Gartenhortensie sowie Pflanzen verschiedener Entwicklungsstufen herangezogen. Als markierte Vorstufen dienten vorerst Natriumacetat-1-<sup>14</sup>C und eine mittels Photosynthese dargestellte Glucose-<sup>14</sup>C. Beide Verbindungen wurden in Hydrangenol eingebaut (Einbaurrate 0,2 — 1,5%), sofern am Versuchsobjekt photoassimilierende Organe (gesamte Pflanze bzw. einzelne Blätter) vorhanden waren. Traf diese Voraussetzung nicht zu (Blüte, Wurzeln), dann wurde kein aktives Hydrangenol gebildet, sondern es fand sich in der Phenolfraction in beträchtlicher Ausbeute und fast ausschließlich eine neue, noch unbekannte Ver-

<sup>2</sup> *A. J. Birch*, Fortschr. Chem. org. Naturst. **14**, 186 (1957).

<sup>3</sup> *B. D. Davis*, Adv. Enzymology **16**, 247 (1955).

<sup>4</sup> *E. W. Underhill*, *J. E. Walkin* und *A. C. Neish*. Canad. J. Biochem. Physiol. **35**, 219 229 (1957); *H. Grisebach*, Z. Naturforsch. **12b**, 227, 597 (1957), **13b**, 335 (1958).

bindung ( $X_3$ ), die auch in allen anderen Versuchen als ständiger Begleiter des Hydrangenols aufgefunden werden konnte.

Eine jüngst erschienene Arbeit über die Biosynthese des Hydrangenols von *Ibrahim* und *Towers*<sup>5</sup> veranlaßt uns, über die bisherigen Ergebnisse unserer Arbeiten in dieser vorläufigen Mitteilung zu berichten. Obwohl diese beiden Autoren u. a. ebenfalls markiertes Acetat und Stecklinge von *Hydrangea* verwenden, fanden sie keine radioaktiven Nebenprodukte. Das aus der Phenolfraction der Extrakte isolierte Hydrangenol wurde vor der Aktivitätsmessung lediglich umkristallisiert und keiner papierchromatographischen Reinheitsprüfung unterzogen. Die angegebenen Meßwerte der Aktivität sind demnach zumindest in quantitativer Hinsicht zu bezweifeln. Die Prüfung auf radiochemische Reinheit eines Endproduktes ist insbesondere dann notwendig, wenn von allen angewendeten radioaktiven Vorstufen ein Einbau erwartet werden konnte und auch tatsächlich gefunden wurde.

In vorliegender Arbeit erfolgte die Aufarbeitung des pflanzlichen Materials durch Extraktion mit Äthanol. Der Trockenrückstand des Extraktes wurde bei pH 5 zwischen Wasser und Äther verteilt. Die Säuren der äther. Phase wurden mit  $\text{NaHCO}_3$  entfernt, die Phenole mit NaOH isoliert. Die wäßrige Phase (Glucoside) der Verteilung wurde nach saurer Hydrolyse analog aufgearbeitet. Die Phenole wurden jeweils papierchromatographisch getrennt. Laufmittel: a) Benzol/Essigsäure/Wasser (4:2:1),  $R_F$ -Werte: Hydrangenol 0,74, Hydrangeasäure 0,26,  $X_3$  0,92; b) Benzol/n-Butanol/wäßr. Ammoniak/Äthanol (4:4:2:1),  $R_F$ -Werte: Hydrangeasäure 0,20,  $X_3$  0,86. Die Menge des Hydrangenols wurde aus der Fleckengröße (UV) mittels Eichkurve bestimmt, die Aktivitäten am Papierchromatogramm gemessen. Für die unbekannt Verbindung  $X_3$ , die außerdem im UV kaum sichtbar ist, kann keine Menge bzw. spezifische Aktivität angegeben werden.

Größere Mengen Hydrangenol lassen sich durch fraktionierte Hochvakuumsublimation im liegenden Rohr reinigen, allerdings nur schwer von etwa begleitendem  $X_3$  trennen. Auch durch Umkristallisieren (Äthanol) konnte eine vollständige Trennung nicht erzielt werden.

Tab. 1 faßt Infusionsversuche an isolierten Organen der Hortensie zusammen. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Objekte dem Licht von zwei Leuchtstoffröhren ausgesetzt. Hydrangenol wird demnach nur im grünen Blatt gebildet, u. zw. aus Glucose rascher als aus Acetat. Auch bei dem Versuch mit markierter Glucose wurde eine, hier allerdings nur geringe Menge  $X_3$  gefunden, die aber aus einem Übergang Glucose  $\rightarrow$  Acetat stammen könnte. Bei den nicht photoassimilierenden Organen entstand kein aktives Hydrangenol. Bei Blüte bzw. Wurzel war die gesamte Aktivität der Phenolfraction ausschließlich als  $X_3$  vorhanden. Auch eine p-Cumarsäure-2- $^{14}\text{C}$  wurde

<sup>5</sup> R. K. *Ibrahim* und G. H. N. *Towers*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **38**, 627 (1960).

eingesetzt. Es konnte hierbei ein Einbau in Hydrangenol, nicht hingegen in  $X_3$  festgestellt werden.

Tabelle 1

Vorstufe	Aktivität mC/mM	Menge mg	Objekt	Zeit (Stdn.)	Hydrangenol			$X_3$
					mg	ipm	$\mu\text{C}/\text{mM}$	ipm
Acetat-1- $^{14}\text{C}$	0,8	0,7	Blatt	24	0,1	15	0,87	450
	0,4	3	Blüte	48	0,1	0	0	4000
	0,4	40	Wurzel <sup>a</sup>	200	20,0	0	0	70000
			Wurzel <sup>b</sup>	200	8,0	0	0	9000
Glucose- $^{14}\text{C}$	6,5	0,2	Blatt	24	0,2	1200	34,6	110
	5,0	0,4	Blüte	24	0,15	0	0	6300
p-Cumar- säure-2- $^{14}\text{C}$	0,013	2,5	Blatt	24	0,15	7	0,25	—

a: freie Phenole, b: Phenole der Glucosidfraktion.

Ergänzend sei erwähnt, daß Umbelliferon, welches ebenfalls als Inhaltsstoff der *Hydrangea* auftritt, nur bei Gabe von Glucose aktiv war und nicht aus Acetat gebildet wurde. Dies bestätigt die Befunde von *Weygand* und *Wendt*<sup>6</sup> über die Biosynthese des Cumarins nun auch im Fall des Umbelliferons bei *Hydrangea*.

Tab. 2 gibt Versuche an einer einjährigen Pflanze wieder, die über die Wurzeln 0,8 mC Natriumacetat-1- $^{14}\text{C}$  (in 94 mg) in *Knopscher* Lösung bekam. Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen wurde je ein Blatt zur Analyse verwendet, nach 216 Stdn. die gesamte Pflanze, wie angegeben, aufgearbeitet. Die spezif. Aktivität des Hydrangenols durchläuft ein Maximum am 4. Tag, was mit der Abreicherung der Aktivität

Tabelle 2

	Zeit (Stdn.)	Hydrangenol (Hy)			$X_3$	$\frac{\text{ipm}(\text{Hy})}{\text{ipm}(\overline{X}_3)}$	
		mg	ipm	$\mu\text{C}/\text{mM}$	ipm		
1. Blatt	48	0,18	12	0,38	105	1: 8,7	
2. Blatt	96	0,18	183	5,85	395	1: 2,15	
3. Blatt	144	0,18	35	1,10	166	1: 4,75	
4. Blatt	192	0,18	51	1,60	245	1: 4,8	
Restliche	a	216	7,0	1540	1,26	9200	1: 6
Blätter		b	216	24,5	4000	0,94	1050
Wurzeln	a	216	25,0	0	0	50000	
		b	216	12,5	1500	0,96	55000

a: freie Phenole, b: Phenole der Glucosidfraktion.

<sup>6</sup> *F. Weygand* und *H. Wendt*, *Z. Naturforsch.* **14 b**, 421 (1959).

in der Nährlösung einerseits und dem Abtransport in Stamm und Wurzeln andererseits erklärt werden kann. Die Transportform ist zweifellos das Hydrangenolglucosid, da bei der Aufarbeitung der Wurzeln nur im Hydrangenol der Glucosidfraktion Aktivität gefunden wurde.

Die rasche Bildung von  $X_3$  aus Acetat und die Tatsache, daß diese Verbindung als normaler Inhaltsstoff der *Hydrangea* bisher nicht gefunden werden konnte, ließ das Vorliegen einer Zwischenstufe vermuten. Dies wurde in zwei Richtungen untersucht:

1. Die Verbindung  $X_3$  (ca. 1000 ipm) wurde vom Chromatogramm eluiert und in wäßriger Lösung (pH 7,0) erneut einem isolierten Blatt infundiert. Es konnte keine Bildung von aktivem Hydrangenol festgestellt werden.  $X_3$  selbst scheint keine Zwischenstufe darzustellen.

2. Natriumacetat-1- $^{14}C$  wurde durch 2stdg. Infusion an 5 einzelne Blätter (Tab. 3, Nr. 1—5) verabreicht, die danach verschieden lange in reiner Nährlösung verblieben. Nr. 6 wurde während der gesamten Versuchsdauer (12 Stdn.) mit einer fünffach verdünnten Acetatlösung ernährt. Die Bildung von aktivem Hydrangenol setzt sich auch nach Beendigung der Acetatinfusion, u. zw. in beträchtlichem Umfang und proportional der Zeit, fort; das Verhältnis ipm(Hydrangenol)/ipm( $X_3$ ) sinkt laufend ab. Da aber von  $X_3$  keine spezif. Aktivität bekannt ist und die erhaltenen Impulswerte schwanken, läßt auch dieser Versuch keine eindeutige Aussage zu, ob  $X_3$  das Artefakt aus einer Zwischenstufe darstellt.

Tabelle 3

Nr.	Infusionszeit (Stdn.)		Hydrangenol			$X_3$	$\frac{\text{ipm(Hy)}}{\text{ipm}(X_3)}$
	Natriumacetat-1- $^{14}C$	Knapfsche Lösung	$\mu g$	ipm	C/mM	ipm	
1	2	0	80	2,5	0,18	125	1: 50
2	2	1	120	7	0,34	82	1: 12
3	2	2,5	150	19	0,73	180	1: 9
4	2	5	200	48,5	1,40	118	1: 2,4
5	2	10	250	150	3,45	286	1: 1,9
6	12	—	200	47	1,35	350	1: 7,5

Weitere Untersuchungen über die Biosynthese des Hydrangenols und die Struktur der hier beschriebenen Verbindung  $X_3$  sind im Gange.

Anhangsweise sei erwähnt, daß im Rahmen von Arbeiten über die Biosynthese der Stilbene des Kernholzes von *Pinus sylvestris* ein Einbau von Acetat in Pinosylvin-monomethyläther festgestellt werden konnte<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> G. Billek und W. Ziegler, unveröffentlicht