

Zur Biosynthese pflanzlicher Stilbene, 3. Mitt.:

Die Biosynthese des Pinosylvin-monomethyläthers

Von

G. Billek und W. Ziegler

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 2. Oktober 1962)

Nach Gabe von Acetat-1-¹⁴C und Glucose-(G)-¹⁴C an zweijährige Pflanzen von *Pinus silvestris* wurde jeweils aktiver Pinosylvin-monomethyläther isoliert. Die Lokalisierung der Aktivität ergab, daß die C-Atome 2—6 des Ringes A aus Acetateinheiten gebildet werden. Die restlichen C-Atome des Moleküls stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einer intakten Phenylpropan-einheit.

Wir kennen heute etwa 15 verschiedene Derivate des Stilbens, die in sehr unterschiedlichen Familien und Gattungen des Pflanzenreiches auftreten. Unter diesen sind Pinosylvin (I) und dessen Monomethyläther (II), insbesondere durch die Arbeiten von Erdtman¹, am besten bekannt. Beide wurden in fast allen Arten der Gattung *Pinus* gefunden und besitzen wegen ihrer fungiciden und insekticiden Eigenschaften² sowie infolge der Tatsache, daß ihre Anwesenheit den sauren Sulfitaufschluß des Kiefern-kernholzes hemmt, auch technologische Bedeutung³. Erdtman⁴ war es auch, der diese einfachen Stilbenderivate erstmals aus dem Kernholz der Kiefer isolierte und deren Konstitution aufklärte.

Über die Biogenese dieser Stilbenderivate wurden bisher nur widersprechende Hypothesen aufgestellt. Von Robinson⁵ stammt der Vorschlag, daß lediglich Acetat über die Stufe einer Polyketosäure zum Auf-

¹ H. Erdtman, in: K. Kratzl und G. Billek, „Biochemistry of Wood“, S. 1. London: Pergamon Press (1959).

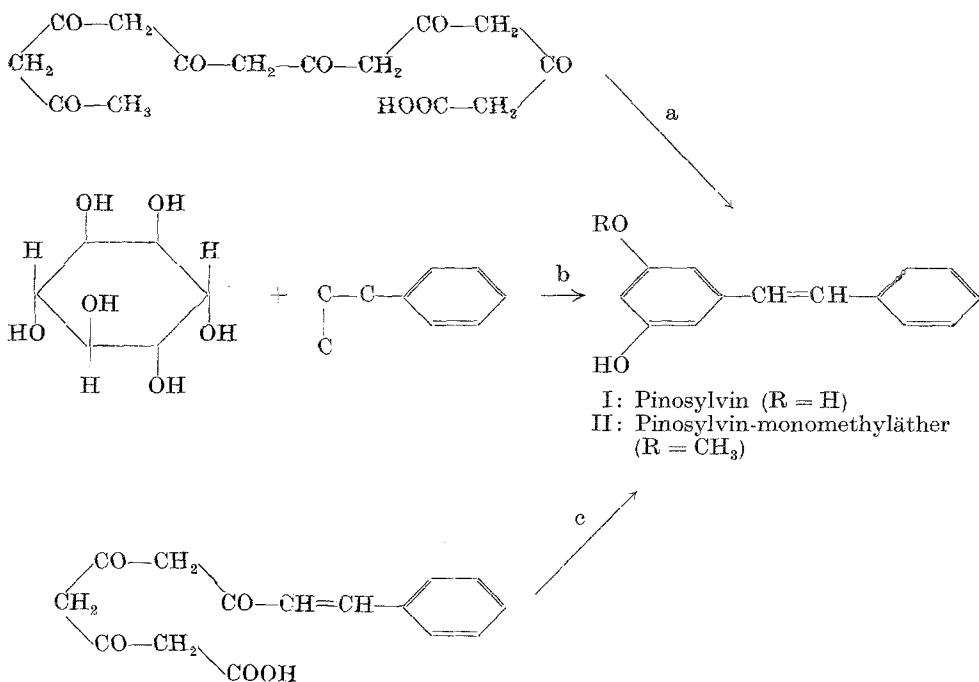
² E. Rennerfeldt, Acta Chem. Scand. **3**, 1343 (1949); G. N. Wolcott, J. Econ. Entomol. **44**, 263 (1951); **46**, 374 (1953); Chem. Abstr. **45**, 8711 (1951); **48**, 4750 (1954).

³ H. Erdtman, Ann. Chem. **539**, 116 (1939).

⁴ H. Erdtman, Naturwiss. **87**, 130 (1939).

⁵ R. Robinson, „The Structural Relations of Natural Products“, Oxford: Clarendon Press (1955).

bau von I beitrage, wobei jedoch reduktive Schritte an vier Stellen des Moleküls anzunehmen wären (I a). *Erdtman*⁶ vermutete einen Aufbau aus einer Phenylpropaneinheit und einem Cyclit unter Abspaltung eines C-Atoms (I b) wohl deshalb, da ein Monomethyläther des D-Inosits, der Pinit, als Inhaltsstoff der Kiefer häufig gefunden wurde. Heute weiß man durch Versuche bei anderen Naturstoffklassen, daß Inosit und seine Derivate zum Aufbau des Aromaten wohl kaum in Frage kommen. Von *Birch*⁷ stammt ein dritter Vorschlag (I c), der dann auch von *Erdtman*¹ vertreten wurde, wonach eine Zimtsäure mit drei Acetat-einheiten zusammentreten soll, um sich dann zum Pinosylvin zu cyclisieren.



Das Kernholz verschiedener Kiefernarten enthält — in weiten Grenzen schwankend — maximal 1% an Pinosylvinphenolen, wobei der Monomethyläther (II) meist in höherer Konzentration als I gefunden wird⁸. Man muß annehmen, daß die Inhaltsstoffe des praktisch toten Kernholzes, zumindest deren unmittelbare Vorstufen, in den lebenden Teilen des Organismus, also z. B. im Cambium, gebildet werden. Die Ablagerung größerer Mengen Inhaltsstoffe, wie überhaupt die Ausbildung des Kernholzes, verläuft langsam,

⁶ *H. Erdtman*, Holz als Roh- und Werkstoff **11**, 245 (1953).

⁷ *A. J. Birch* und *F. W. Donovan*, Austral. J. Chem. **6**, 360 (1953).

⁸ *H. Erdtman*, Svensk Kemisk Tidskr. **63**, 43 (1951); *G. Lindstedt*, Acta Chem. Scand. **5**, 129 (1951).

setzt erst nach mehreren Jahren des Wachstums ein und ist von äußeren Faktoren abhängig. Im Splintholz werden fast keine der typischen Inhaltsstoffe des Kernholzes gefunden⁹.

Untersuchungen über die Biosynthese der Kernholzinhaltsstoffe erschienen anfangs wenig aussichtsreich, da sich vieljährige große Organismen für Versuche mit radioaktiv markierten Vorstufen wenig eignen. Über das Vorkommen der Pinosylvine in jungen Pflanzen war bis zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt.

Methodik

Nachweis und Isolierung der Pinosylvine

Zur Isolierung, Trennung und zum Nachweis der Kernholzinhaltsstoffe waren von *Erdtman*³, *Lindstedt*¹⁰ und von *Kondo* und *Kitamura*¹¹ verschiedene Verfahren angegeben worden, die immer von Kernholz, oft von sehr großen Mengen, ausgingen. Diese Vorschriften ließen sich nicht unmittelbar zur Totalanalyse junger, noch nicht verkernter Pflanzen mit deren weitaus größerer Vielfalt an Inhaltsstoffen anwenden. Eine eindeutige Methode zur Abtrennung der reinen Pinosylvine war insbesondere im Hinblick auf die geplanten Versuche mit radioaktiven Vorstufen unbedingt notwendig.

Wir haben schließlich folgenden Weg eingeschlagen: Nach einer kurzen Äthervorextraktion werden die Pflanzenteile erschöpfend mit Methanol extrahiert. Der Rückstand des Extraktes wird mit Essigester eluiert und diese Lösung mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

Zur Analyse des Pflanzenmaterials wurden die den cochromatographierten Testsubstanzen* entsprechenden Zonen vom Kieselgel eluiert. Der Rückstand der beiden Extrakte wurde papierchromatographisch gereinigt. Die Menge von I und II wurde auf Grund der Fleckengröße ermittelt, was in den meisten Fällen hinreichend genau war. Gegebenenfalls wurde auch vom Eluat der Flecke das UV-Spektrum¹² aufgenommen. Bei den Versuchen mit radioaktiven Vorstufen wurden die Zonen des Dünnschichtchromatogramms durch Autoradiographie lokalisiert. II wurde nach Zusatz einer entsprechenden Menge inaktiven Materials durch Hochvakuumsublimation im „liegenden Rohr“^{13, 14} gereinigt.

* Für die Überlassung verschiedener Testsubstanzen sind wir Herrn Prof. Dr. H. Erdtman, Stockholm, zu besonderem Dank verpflichtet.

⁹ H. Erdtman, *Experientia* [Basel], Suppl. II, 156 (1955).

¹⁰ G. Lindstedt, *Acta Chem. Scand.* **4**, 448 (1950).

¹¹ T. Kondo und Y. Kitamura, *J. Japan. Forest Soc.* **36**, 157 (1955).

¹² H. Erdtman, *Svensk Kemisk Tidskr.* **56**, 134 (1944).

¹³ G. Schmidt, *Microchim. Acta* [Wien] **1959**, 406.

¹⁴ G. Billek und H. Kindl, *Mh. Chem.* **93**, 85 (1962).

Vorerst wurden Samen heimischer Kiefernarten (*Pinus silvestris*, *P. nigra* und *P. montana*) zum Keimen gebracht und in einer Nährlösung bis zu einem Alter von 3 Monaten aufgezogen. Bereits in den 6 Wochen alten Pflänzchen war ein sehr geringer Gehalt an II (0,01—0,03%, bezogen auf das Trockengewicht) nachweisbar. Für die Einbauversuche wurden zweijährige Exemplare der Art *P. silvestris* ausgewählt, da diese von den drei untersuchten Arten den höchsten Stilbengehalt (0,04 bis 0,05% II, ca. 0,005% I) neben einer relativ geringen Menge harziger Inhaltsstoffe besaßen.

Obwohl durch diese Analysen bereits in jungen Pflanzen Pinosylvine nachgewiesen werden konnten, war der Gehalt so gering, daß berechtigte Zweifel auftraten, ob innerhalb eines experimentell möglichen Zeitraumes nach Zufuhr aktiver Vorstufen eine hinreichende Neubildung dieser Verbindungen eintritt. Es ist bekannt, daß durch äußere Einflüsse das Auftreten von Kernholz und damit eine gesteigerte Produktion an Kernholzphenolen induziert werden kann. Verwundung des Cambiums kann zur Ausbildung des sog. „Wundkernholzes“ führen, welches entweder das darunterliegende Splintholz umgibt oder zur Ausbildung einer „Kernholzinsel“ im Splintholz führt⁹. *Anderson*¹⁵ fand, daß Verwundung des Cambiums und Behandlung der Wunde mit 40proz. Schwefelsäure eine gesteigerte Pinosylvinproduktion zur Folge hat.

In eigenen Versuchen wurden ähnliche Eingriffe an nur zweijährigen Pflanzen von *P. silvestris* vollzogen. Sie führten hier meist zum Absterben des Organismus. In keinem Fall konnte eine gesteigerte Bildung der Kernholzphenole festgestellt werden. Es mußte folglich auf intakte Pflanzen zurückgegriffen werden.

Infusion der markierten Verbindungen

Da sich das Tauchtriebverfahren nach *Freudenberg*¹⁶ bei einigen Versuchen mit Seitenästen von *P. silvestris* nicht bewährte und bei den etwa 15 cm großen zweijährigen Pflanzen ein Aufsaugen durch die Nadeln nicht in Frage kam, wurden die Nährlösungen durch die gekappte Pfahlwurzel zugeführt. Innerhalb von 48 Stdn. wurden so bis zu 2 ml je Pflanze aufgenommen, später sinkt die Flüssigkeitsaufnahme rasch ab. Die Versuche wurden nach 14 Tagen abgebrochen, da zu diesem Zeitpunkt die Pflanzen bereits etwas verdorrt waren.

In einer jüngst erschienenen Arbeit von *Jörgensen*¹⁷ wurden Vorkommen und Bildung von I und II im Splintholz von *P. resinosa* untersucht. Es ergab sich, daß diese Phenole im ursprünglichen Splintholz dieser Kiefernart

¹⁵ *A. B. Anderson*, TAPPI **39**, 55 (1956); Chem. Abstr. **50**, 6069 (1956).

¹⁶ *K. Freudenberg*, *H. Reznik*, *W. Fuchs* und *M. Reichert*, Naturwiss. **42**, 29 (1955).

¹⁷ *E. Jörgensen*, Canad. J. Botany **39**, 1765 (1961).

nicht vorhanden waren, desgleichen nicht in Zellen, die rasch getötet wurden. Hingegen konnte eine Bildung von I und II beobachtet werden, wenn das Splintholz gewissen äußeren Einflüssen ausgesetzt war. Mechanische Beschädigung von Rinde und Cambium, Pilzbefall (*Fomes annosus*), aber auch langsames Austrocknen der Pflanzen führte zur Neubildung von I und II im Splintholz. Der Autor kommt zu dem Schluß, daß die Bildung der Pinosylvine in den lebenden Zellen des Splintholzes erfolgt und eine Abwehrreaktion gegenüber äußeren Einflüssen darstellt.

Wir konnten beobachten, daß nach Infusion von markierten Verbindungen und der damit verbundenen Austrocknung der Pflanzen jeweils ein höherer Gehalt an II nachweisbar war als es die Analysen an intakten Organismen ergaben. Durch die angewandte Methodik haben wir somit unbeabsichtigt eine gesteigerte Produktion von II erzielt und damit auch die Befunde von *Jørgensen*¹⁷ bestätigt, die uns erst nach Beendigung unserer Arbeiten bekannt wurden*. Ob die Bildung dieser Stilbene in den Zellen des Splintholzes infolge äußerer Einflüsse stattfindet oder ob diese Verbindungen, wie es *Erdtman*⁹ vorschlägt, im Cambium gebildet werden, kann durch vorliegende Untersuchung nicht entschieden werden.

Abbau des Pinosylvin-monomethyläthers

Nach entsprechender Verdünnung mit inaktivem Material wurde II methyliert und Pinosylvin-dimethyläther (III) mit KMnO_4 oxydiert³. Die Trennung der Benzoesäure (IV) von der 3,5-Dimethoxybenzoesäure (V) erfolgte durch fraktionierte Sublimation im „liegenden Rohr“. V wurde decarboxyliert (VI), der Resorcindimethyläther (VII) nitriert und einem Brompikrinaabbau (IX und X) unterworfen. Die Aktivität der Methoxygruppe (XI) wurde nach *Bjerrum* und Mitarb.¹⁸ bestimmt.

Ein derartiger Abbau erfaßt die C-Atome des Ringes B samt dem C-Atom β (IV), das C-Atom α (VI) und die Methoxygruppe (XI) und trennt schließlich im Ring A die C-Atome 2, 4, 6 von den Atomen 1, 3, 5 (IX und X).

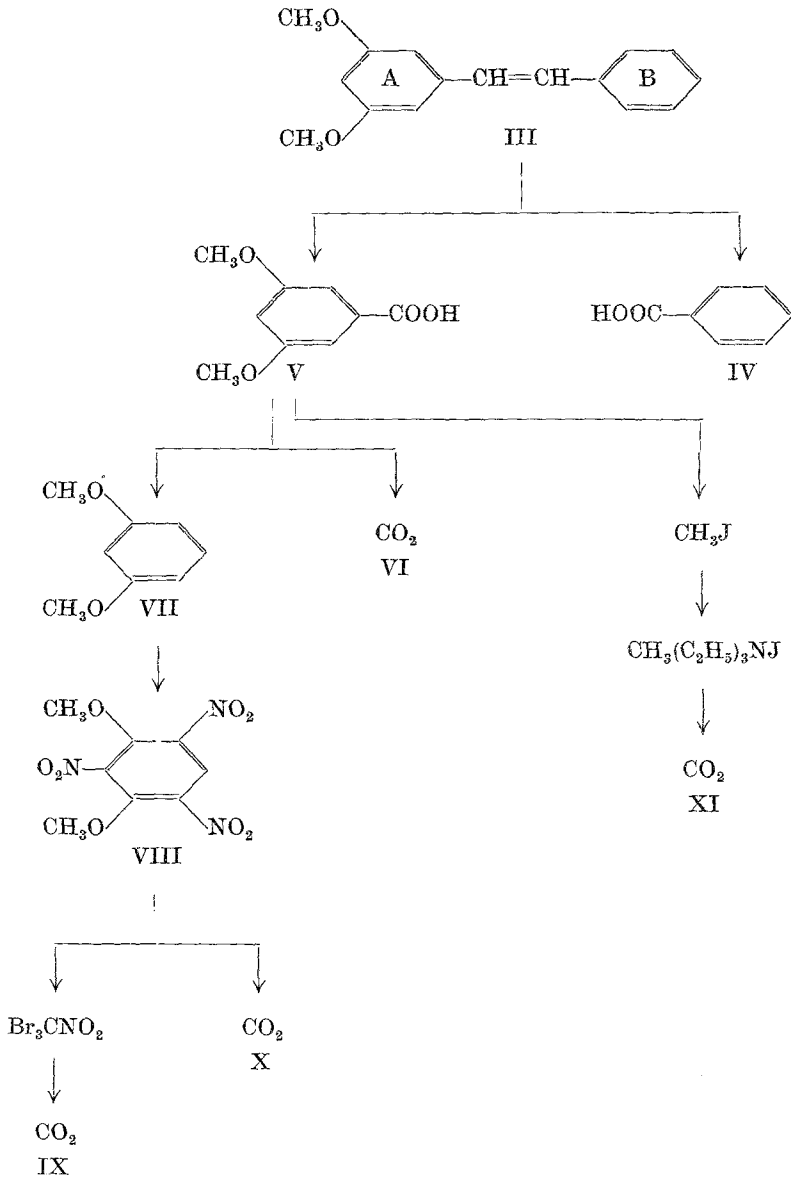
Ergebnisse

A. Versuche mit Acetat-1-¹⁴C

Nach einer Gabe von Acetat-1-¹⁴C (1,4 mC) an 10 2jährige Kiefern und einer Versuchsdauer von 14 Tagen enthielt II 0,005% der eingesetzten Aktivität; die Einbaurrate in I war noch um eine Zehnerpotenz geringer, so daß an dieser Verbindung kein Abbau durchgeführt werden konnte. Die Meßwerte der Aktivität der Abbauprodukte von II sind in

* Herrn Prof. Dr. *E. Jørgensen*, Saskatoon, Kanada, danken wir für die Überlassung des Manuskriptes seiner Arbeit.

¹⁸ *R. U. Bjerrum, J. H. Flockstra, L. J. Dewey und C. D. Ball, J. Biol. Chem.* **210**, 633 (1954).



Tab. 1 zusammengefaßt, wobei die prozentuellen Angaben sich auf die Aktivität des bereits mit inaktivem Material verdünnten II beziehen; die weitere Verdünnung auf der Stufe von V ist entsprechend berücksichtigt.

Wie die ersten Spalten der Tab. 1 zeigen, wurde die carboxylmarkierte Essigsäure in II derart eingebaut, daß der überwiegende Anteil

der Aktivität in den C-Atomen 1, 3 und 5 des Ringes A gefunden wurde. Damit ist jene Hypothese eindeutig widerlegt worden, wonach das gesamte Molekül des Stilbens aus Acetateinheiten entstehen soll.

Tabelle 1

	Acetat-1- ¹⁴ C		Glucose-(G)- ¹⁴ C	
	dpm/mM	%	dpm/mM	%
II Pinosylvin-monomethyläther	426 000	= 100,0	2 200 000	= 100,0
IV Benzoesäure	2 500	0,6	615 000	28,0
V 3,5-Dimethoxybenzoesäure	418 000	98,2	1 545 000	70,2
V 3,5-Dimethoxybenzoesäure (verdünnt)	110 000	= 98,2	59 900	= 70,2
VI BaCO ₃ (C-Atom α)	225	0,2	3 150	3,7
VIII Trinitroresoreindimethyläther	114 000	101,8		
IX Brompikrin (C-Atome 2,4,6)	790	0,7		
X BaCO ₃ (C-Atome 1,3,5)	—	97,2		
XI Methoxyl	340	0,3	510	0,6

Es muß jedoch erwähnt werden, daß die Lokalisierung der Aktivität im Ring A nicht eindeutig ist, da der Brompikrinabbau nur die Summe der Aktivitäten der Atome 1,3 und 5 erfaßt. Würde im Sinne der Hypothese von *Birch*⁷ (I c) eine Zimtsäure bzw. eine Phenylpropaneinheit als Baustein in Reaktion treten, dann müßte bei einer Gabe von markiertem Acetat das C-Atom 1 des Ringes A inaktiv sein. Ein spezifisches Erfassen dieses einzelnen C-Atomes war aber experimentell nicht möglich.

Wir versuchten nun den intakten Einbau einer Phenylpropaneinheit nachzuweisen. Diesbezügliche Versuche brachten keinen Erfolg, da die Vorstufen mit einer geeignet hohen spezifischen Aktivität nicht zur Verfügung standen. Die sehr geringe Flüssigkeitsaufnahme der Versuchspflanzen begrenzt die einsetzbare Substanzmenge, die kleine Einbaurrate hingegen erfordert eine hohe Gesamtaktivität.

B. Versuche mit Glucose-(G)-¹⁴C

Durch Photosynthese ließ sich eine vollständig mit Radiokohlenstoff markierte Glucose herstellen¹⁹, deren sehr hohe spezifische Aktivität den experimentellen Anforderungen genügte. Bei einem Einsatz von 0,8 mC Glucose-(G)-¹⁴C auf vier 2jährige Pflanzen von *P. silvestris* wurde aktiver II mit einer Einbaurrate von 0,012% erhalten. Ein analog durchgeführter Abbau lieferte die in Tab. 1 wiedergegebenen Meßwerte mit dem etwas überraschenden Ergebnis, daß der überwiegende Teil der Aktivität des II im Ring A gefunden wurde, während Ring B und das C-Atom β nur 28% der Aktivität besaßen. Der Anteil der Methoxylgruppe an der Gesamtaktivität war auch hier gering.

¹⁹ G. Billek und H. Kindl, Atompraxis 8, 167 (1962).

Entsprechend den Erwartungen sollte nach Gabe einer vollständig markierten Glucose auf dem Weg über die Shikimi- und Prephensäure eine homogen markierte Phenylpropaneinheit gebildet werden und damit auch in II eine gleichverteilte Aktivität bevorzugt im Ring B, den C-Atomen α und β und im C-Atom 1 des Ringes A aufscheinen. Andererseits mußte man annehmen, daß die Glucose über das *Embden-Meyerhof*-Schema und die oxydative Decarboxylierung der Brenztraubensäure auch Acetat liefern und damit zum Aufbau von Ring A beitragen kann.

Die Versuchsreihe A ergab, daß Acetat ausschließlich in Ring A eingebaut wird. Die hohe Aktivität in demselben Ring nach einer Gabe von markierter Glucose zeigt, daß die Glucose relativ rasch in Acetat umgewandelt wird, während die Bildung des Ringes B aus der Glucose langsam und mit stärkerer Verdünnung durch inaktives Material zu erfolgen scheint. Im C-Atom α (VI), welches durch Decarboxylierung von V einer gesonderten Aktivitätsmessung zugänglich war, fand sich 3,7% der Aktivität von II. Dies ist praktisch $1/7$ der Aktivität der aus 7 C-Atomen bestehenden Molekülhälfte mit dem Ring B. Würde andererseits dieses C-Atom einer Acetateinheit entstammen, dann wäre hier eine weitaus höhere Aktivität (ca. 10%) zu erwarten. Damit ist, wenn auch indirekt, der Einbau einer Phenylpropaneinheit anzunehmen.

Zusammenfassung

Für die Biosynthese des Pinosylvin-monomethyläthers kann man das Zusammenwirken zweier Reaktionswege annehmen: Die C-Atome 2—6 des Ringes A werden aus drei Acetateinheiten gebildet, wobei eine Carboxylgruppe abgespalten wird. Der Aromat B und die C-Atome α und β sowie das C-Atom 1 des Ringes A stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einer intakten Phenylpropaneinheit²⁰.

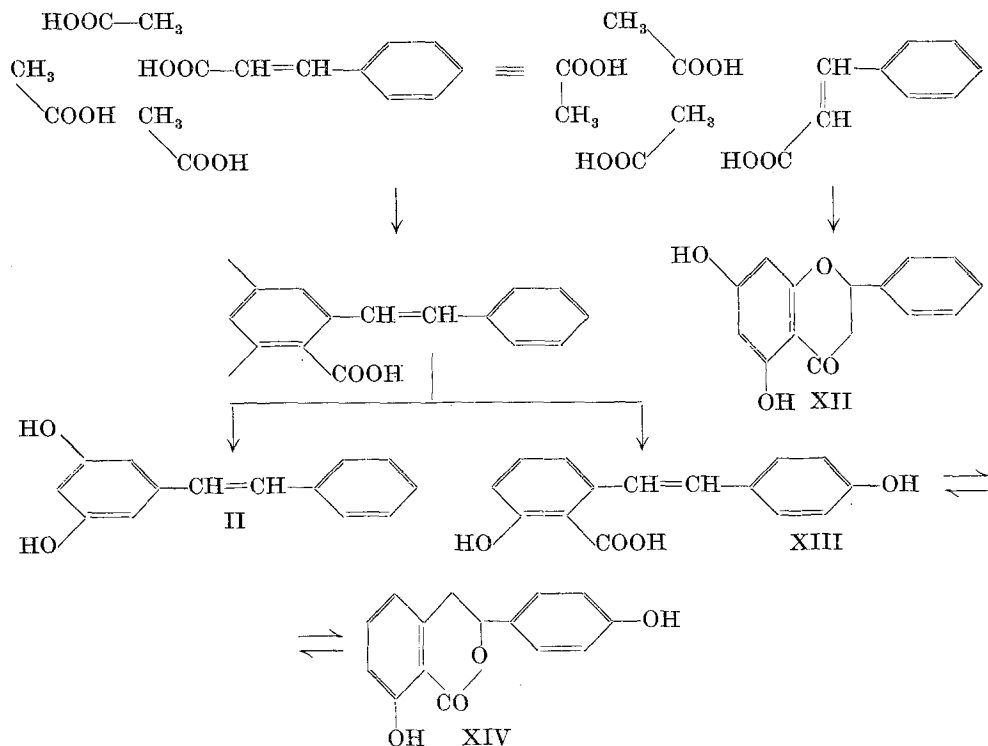
Wie das folgende Schema zeigt, werden aus denselben Einheiten, allerdings in einer anderen Aggregation, die Flavonoide gebildet, wie dies insbesondere durch die Arbeiten von *Grisebach*²¹ und *Neish*²² bekannt wurde. Eine derartige Parallele zwischen der Biogenese der Flavonoide und jener der Stilbene, auf die übrigens schon *Birch*⁷ hingewiesen hat, ist neben den vorliegenden experimentellen Befunden auch aus anderen Gründen glaubhaft. Ein Flavanonderivat mit einer Substitution, die völlig I entspricht, das Pinoembrin (XII), tritt als Begleiter von I und II im Kernholz vieler Kiefernarten auf¹. Weiters sind Stilbenderivate in der Natur gefunden worden, die noch jene Carboxylgruppe in Stellung 2 tragen, deren Abspaltung man zur Bildung der Pinosylvine annehmen muß, wie z. B. Hydrangeasäure (XIII) und Hydrangenol (XIV).

²⁰ G. Billek und W. Ziegler, Österr. Chemiker-Ztg. **62**, 310 (1961); G. Billek, H. Kindl und W. Ziegler, Ind. Chim. Belge **27**, 552 (1962) (Vortragsref.); G. Billek und H. Kindl, Österr. Chemiker-Ztg. **63**, 273 (1962).

²¹ H. Grisebach und W. D. Ollis, Experientia [Basel] **17**, 4 (1961).

²² A. C. Neish, Ann. Rev. Plant Physiol. **11**, 55 (1960).

Die Biosynthese des Hydrangenols (XIV), eines Inhaltsstoffs der Gartenhortensie, haben wir in anderen Arbeiten²³ untersucht. Durch die weitaus raschere Bildung dieser Verbindung konnten hierbei viel höhere Einbau-raten erzielt werden; damit war neben Acetat-1-¹⁴C und Glucose-(G)-¹⁴C



auch die Anwendung von Vorstufen geringerer spezifischer Aktivität (Glucose-1-¹⁴C, Zimtsäure-carboxyl-¹⁴C, p-Cumarsäure-2-¹⁴C) möglich, die in jedem Fall Ergebnisse lieferten, welche dem oben für I und II angegebenen Biosyntheschema völlig entsprachen und dieses damit auch stützen. Ergänzend sei bemerkt, daß Glucose-(G)-¹⁴C und Glucose-1-¹⁴C auch bei XIV eine bevorzugte Markierung des Ringes A zur Folge hatte. Damit stellt der bei II gefundene Effekt keine Einzelbeobachtung dar, sondern konnte auch unter anderen experimentellen Bedingungen realisiert werden.

In einer jüngst erschienenen Arbeit von *Hillis* und *Hasegawa*²⁴ wurde über die Bildung von Piceid (Resveratrol-glucosid) und Rhapontin (Rhaponticin-glucosid) in *Eucalyptus sideroxylon* berichtet. Danach verläuft die Biosynthese dieser Stilbenderivate ebenfalls so, wie dies oben für I und II wiedergegeben ist.

²³ G. Billek und H. Kindl, Mh. Chem. **92**, 493 (1961); **93**, 814 (1962).

²⁴ W. E. Hillis und M. Hasegawa, Chem. and Ind. **1962**, 1330.

Für eine Subvention aus den Mitteln der *Seegen*-Stiftung der Österr. Akademie der Wissenschaften und für eine Unterstützung durch die Österr. Gesellschaft für Holzforschung sei auch an dieser Stelle gedankt. Das Pflanzenmaterial wurde in dankenswerter Weise von der Baum- schule Dr. *J. Stainer*, Wiener Neustadt, zur Verfügung gestellt.

Experimenteller Teil

Infusion

Zweijährige Pflanzen von *P. silvestris* wurden vom anhaftenden Erdreich gesäubert und deren Pfahlwurzeln unter Wasser gekappt. Sie wurden hierauf sofort in Glasröhrchen mit je 2 ml der aktiven Lösung übergeführt, welche nach 48 Stdn. fast völlig aufgenommen waren. Anschließend gaben wir bis zur Beendigung der Versuchsdauer (14 Tage) *Knopsche* Nährlösung. Die Pflanzen waren täglich 8 Stdn. dem Licht von zwei Leuchtstoffröhren (*Philips* TL-E 32 W/32 und 40 W/34) ausgesetzt.

Isolierung des Pinosylvin-monomethyläthers (II)

Nach dem Trocknen der Pflanzen wurden die Nadeln entfernt, Stämme und Wurzeln in ca. 1 cm lange Stückchen geschnitten und 1 Stde. mit Äther extrahiert. Dieser Extrakt enthielt keine wesentlichen Mengen an Pinosylvinphenolen. Nach Trocknen des Materials wurde dieses in einer Schlagkreuzmühle (20 mesh) gemahlen und im *Soxhlet*-Apparat 5 Stdn. mit Methanol eluiert. Die methanol. Lösung wurde zur Trockene gedampft und der Rückstand mit 60 ml Essigester in 6 Anteilen heiß eluiert. Es blieb ein hellbraunes, wasserlösliches Pulver zurück, welches keine Pinosylvinphenole enthielt. Der Rückstand der Essigesterlösung wurde auf 20 Platten (20 × 20 cm, Kieselgel-G, *Merck*) aufgetragen und aufsteigend mit Benzol—Methanol (9:1) chromatographiert. Durchschnittliche R_F -Werte: 0,28, II 0,55.

Die getrockneten (mind. 24 Stdn.) Dünnschichtplatten wurden mit Röntgenfilm (*Kodak Blue Brand*) belegt, mit gleichartigen Glasplatten beschwert und 8 Tage im Dunkeln belassen. Die Autoradiogramme ermöglichten eine eindeutige Lokalisierung der bisweilen etwas gekrümmten Zonen von I und II. Bei Anwendung obigen Verfahrens verblieben zahlreiche andere hochaktive Inhaltsstoffe vorwiegend in der Nähe des Starts und der Front. II wurde mit Essigester (*Soxhlet*-Apparat) vom Kieselgel der entsprechenden Zone eluiert. Für den nachfolgenden Abbau haben wir bei den Versuchen mit Acetat- $1-^{14}\text{C}$ mit 75 mg, nach der Gabe von Glucose-(G)- ^{14}C mit 25 mg inaktivem II verdünnt und im „liegenden Rohr“ (0,001 Torr, 130°) sublimiert.

Alle im Verlauf der Isolierung von II erhaltenen Fraktionen wurden papierchromatographisch mit Benzol—Eisessig—Wasser (4:2:1) (absteigend, *Schleicher & Schüll* 2043b) analysiert¹⁴. R_F -Werte: I 0,46, II 0,91.

Abbau des Pinosylvin-monomethyläthers (II)

Pinosylvin-dimethyläther (III). 73 mg II in 0,5 ml Äthanol wurden mit 75 μl 40proz. NaOH und 75 μl Dimethylsulfat versetzt und 20 Min. bei Zimmertemp. gerührt. Nach neuerlichem Zusatz von Lauge (75 μl) wurde nach weiteren 20 Min. mit 3 ml H_2O verdünnt, angeimpft und gut gekühlt. Ausb.: 73 mg (94% d. Th.) vom Schmp. $56-57^\circ$.

Benzoessäure (VI) und 3,5-Dimethoxybenzoessäure (V). 72 mg III in 4,5 ml Aceton und 4,5 ml H₂O wurden unter Rühren mit 330 mg gepulvertem KMnO₄ innerhalb von 30 Min. versetzt und anschließend noch 45 Min. gerührt. Nach Entfernung des Acetons durch Einengen im Vak. setzten wir 0,3 ml H₂SO₄ in 1,5 ml H₂O zu und reduzierten den ausgeschiedenen Braunstein mit NaHSO₃. Das Gemisch der beiden Säuren wurde durch kontinuierliche Extraktion mit Äther, Ausschütteln mit 20 ml 2proz. NaHCO₃-Lösung und neuerliche Ätherextraktion der angesäuerten Lösung erhalten. Der Rückstand des äther. Extraktes wurde einer Sublimation im „liegenden Rohr“ (0,001 Torr, 165°) unterworfen, wobei IV (22 mg, 60% d. Th.) und V (20 mg, 36% d. Th.) in deutlich getrennten Zonen anfallen.

Resorcindimethyläther (VII). V wurde jeweils mit inaktivem Material auf 100 mg verdünnt und in einer Apparatur zur Acetylgruppenbestimmung mit 100 mg Kupferpulver und 1 ml Chinolin im N₂-Strom 5 Stdn. auf 235° (Badtemp.) erhitzt. Das entstehende CO₂ wurde in einem nachgeschalteten Absorptionsgefäß in NaOH aufgefangen und als BaCO₃ gefällt. Ausb. 94 mg (87% d. Th.). Der Kolbeninhalt wurde mit 5 ml Äther verdünnt, filtriert, mit verd. HCl und schließlich mit 5proz. NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Durch Destillation des Rückstandes der äther. Lösung im Kugelrohr (15 Torr, 85–95°) erhielten wir 50 mg (65% d. Th.) VII. Aus der NaHCO₃-Lösung kann eine geringe Menge nicht umgesetzter V isoliert werden.

Trinitroresorcindimethyläther (VIII). 50 mg VII wurden bei –50° allmählich mit 1,5 ml einer vorgekühlten Mischung aus 9 Teilen H₂SO₄ und 1 Teil HNO₃ (Dichte 1,5) versetzt, langsam auf Zimmertemp. gebracht und nach 30 Min. mit 15 ml Eiswasser verdünnt. Das Reaktionsgemisch soll stets gelb gefärbt sein, das Auftreten einer Grünfärbung zeigt zu rasches Erwärmen an und führt zu geringeren Ausbeuten. Nach guter Kühlung wurde VIII abgesaugt, mit H₂O gewaschen und aus wenig Äthanol umkristallisiert: 53 mg (54% d. Th.) vom Schmp. 124–125°, bei 0,001 Torr und 150° ohne Zersetzung sublimierbar.

Brompikrinabbau (IX, X). Es wird ein mit absteigendem Kühler, Tropftrichter und N₂-Einleitrohr versehener Kolben verwendet und während der gesamten Reaktion, die heterogen verläuft, stark gerührt. Eine Lösung von Bariumhypobromit (2,7 g Ba(OH)₂ · 8 H₂O und 0,9 ml Brom in 50 ml H₂O) wurde im N₂-Strom in das mit 50 mg VIII beschickte Reaktionsgefäß filtriert. Man erwärmt 1 Stde. auf 80°, setzt 50 ml H₂O zu, erhitzt zum Sieden und destilliert 30 ml ab, wobei das Brompikrin (IX) übergetrieben wird. IX wurde mehrmals mit verd. HCl gewaschen, jeweils durch Zentrifugieren gesammelt (96 mg, 58% d. Th.) und zur Aktivitätsmessung naß oxydiert.

Nach Entfernen der Vorlage wurde ein mit NaOH beschicktes Absorptionsgefäß angeschlossen, der Kolbeninhalt mit 3 ml HCl versetzt, das CO₂ im N₂-Strom übergetrieben und als BaCO₃ (X) gefällt. Ausb. 104 mg, 58% d. Th.

Aktivitätsmessungen

Die Endprodukte wurden jeweils, gegebenenfalls nach einer Na₂Oxydation zu CO₂, als BaCO₃ in „unendlich dicker“ Schichte mit einem Endfenster-Zählrohr gemessen. Die Messungen von II, IV, V und VIII hingegen erfolgten an der Substanz selbst, um Verluste zu vermeiden bzw. um eine bessere Zählausbeute (bei IV) zu erzielen. Von IV und V wurden hierzu durch Sublimation bei 110° bzw. 160° auf Al-plättchen „endlich dicke“ Schichten hergestellt.