

## Zur Biosynthese pflanzlicher Stilbene, 2. Mitt.:

Die Bildung von Ring A des Hydrangenols

Von

G. Billek und H. Kindl

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 6. Juni 1962)

Nach Gabe von Acetat-1-<sup>14</sup>C wurde aktives Hydrangenol aus den Blättern der Gartenhortensie isoliert und nach zwei verschiedenen Methoden abgebaut. Die Lokalisierung der Aktivität ergab, daß 5 C-Atome des Ringes A und die Carboxylgruppe aus Acetateinheiten gebildet werden, während das 6. C-Atom aus einer Phenylpropaneinheit stammt.

Die Gartenhortensie (*Hydrangea macrophylla*) enthält bis zu 1,5% Hydrangenol (I), ein Isocumarinderivat, und dessen biogenetische Vorstufe, die Hydrangeasäure (II), eine Stilben-carbonsäure. Auffallend ist übrigens, daß dieses Stilbenderivat nur in dieser einen von insgesamt neun untersuchten Arten der Gattung *Hydrangea* gefunden werden konnte<sup>1</sup>. Hingegen findet man in relativ hoher Konzentration ein breites Spektrum weiterer Phenolcarbonsäuren, wie Benzoe-, Phenylessig-, Phenylpropion- und Zimtsäuren, Cumarine und Flavonoide; damit eignet sich diese Art vorzugsweise zum Studium der Verzweigung einzelner Synthesewege.

Wir haben seinerzeit auf Grund von Betrachtungen über die Verteilung der Sauerstofffunktionen am Stilbenskelett<sup>2</sup> und von Ergebnissen vorläufiger Einbauversuche<sup>3</sup> (Acetat-1-<sup>14</sup>C, Glucose-<sup>14</sup>C-(G) und p-Cumarsäure-2-<sup>14</sup>C) für die Biogenese der pflanzlichen Stilbene das Zusammenwirken zweier Synthesewege angenommen, wonach der Ring A vorwiegend aus Acetat- bzw. Malonateinheiten nach dem Schema von Birch und Donovan<sup>4</sup>, der Ring B und die C-Atome 1,  $\alpha$  und  $\beta$  über die

<sup>1</sup> G. Billek und H. Kindl, Mh. Chem. **93**, 85 (1962).

<sup>2</sup> H. Kindl, Österr. Chemiker-Ztg. **63**, 85 (1962).

<sup>3</sup> G. Billek und H. Kindl, Mh. Chem. **92**, 493 (1961).

Shikimisäure aus einer Phenylpropaneinheit analog dem Schema von *Davis* und *Sprinson*<sup>5</sup> entstammen sollen.

Zur gleichen Zeit untersuchten *Ibrahim* und *Towers*<sup>6</sup> die Biogenese des Hydrangenols und kamen auf Grund von Einbauversuchen mit anderen markierten Verbindungen zu denselben Schlußfolgerungen. Diese Versuche wurden auch mit Phenylalanin, welches in Position 1 bzw. 3 markiert war, durchgeführt<sup>7</sup>. Das isolierte Hydrangenol wurde von diesen Autoren durch Erhitzen mit Alkali abgebaut und die Aktivität der Spaltstücke durch Autoradiographie der Papierchromatogramme nachgewiesen. Eine Messung der spezifischen Aktivität war wegen der geringen Ausbeute nicht möglich.

In unseren Arbeiten über die Biogenese der Stilbene haben wir nach Infusion von Acetat-1-<sup>14</sup>C aktives Hydrangenol isoliert und nach zwei verschiedenen Methoden abgebaut, wodurch eine exakte Lokalisierung und Messung der Aktivität möglich war.

#### Methodik

Die Infusion von Acetat-1-<sup>14</sup>C wurde an isolierten Blättern durchgeführt, die nach der Aufnahme der markierten Lösung noch längere Zeit in Leitungswasser verblieben. Dies führte zu einer Steigerung der Einbaurate wie auch zu einer Erhöhung der relativen spezifischen Aktivität im Vergleich zu anderen Inhaltsstoffen. Es scheint nicht ausgeschlossen, daß verschiedene, vorerst sehr rasch aus Acetat gebildete lipoidartige Verbindungen (vgl. die Entstehung von  $X_3^3$ , welches bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte) danach einem Abbau unterliegen und ihrerseits zur Hydrangenolsynthese beitragen. Von den oberständigen Teilen der Pflanze sind nur die assimilierenden Organe zur Synthese des Hydrangenols befähigt. An isolierten Blüten, die an sich einen sehr hohen Gehalt an Hydrangenol aufweisen, konnte bisher eine Neubildung nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu den hier angewendeten Methoden haben *Ibrahim* und *Towers* mit Wurzelschnitten<sup>7</sup> gearbeitet.

Die Methoden zur Isolierung und Reindarstellung des Hydrangenols wurden bereits früher beschrieben<sup>1</sup> und konnten ohne weiteres auch auf kleine Substanzmengen übertragen werden, wobei jedoch als letzter Schritt stets noch eine papierchromatographische Reinigung angeschlossen wurde. Der Abbau des Hydrangenols zwecks Lokalisierung der Aktivität bereitete jedoch anfangs beträchtliche Schwierigkeiten.

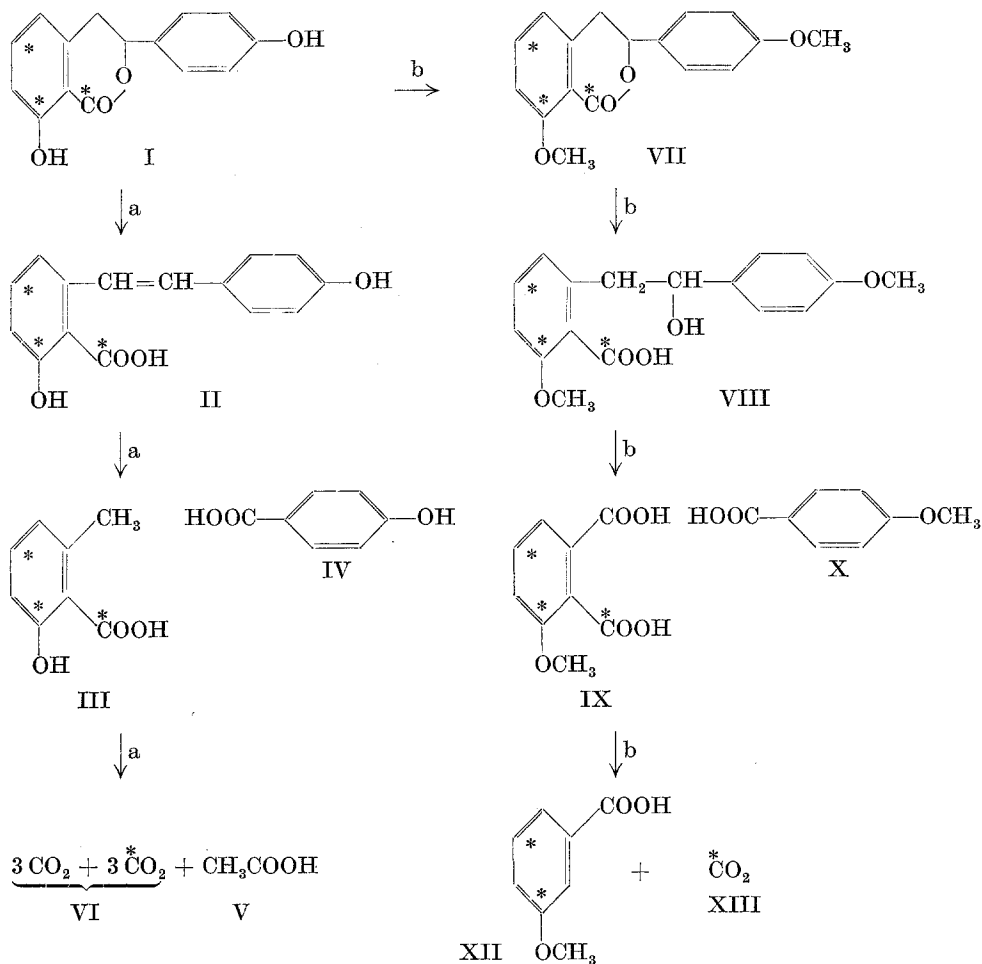
<sup>4</sup> *A. J. Birch*, Fortschr. Chem. org. Naturst. **14**, 186 (1957).

<sup>5</sup> *D. B. Sprinson*, Adv. Carbohydrate Chem. **15**, 235 (1960).

<sup>6</sup> *R. K. Ibrahim* und *G. H. N. Towers*, Canad. J. Biochem. Physiol. **38**, 627 (1960).

<sup>7</sup> *R. K. Ibrahim* und *G. H. N. Towers*, Canad. J. Biochem. Physiol. **40**, 449 (1962).

Eine ursprünglich von *Asahina*<sup>8</sup> angegebene und von *Ibrahim* und *Towers*<sup>7</sup> verbesserte Methode\* beruht auf einem alkalischen Abbau des



Hydrangenols (I), wobei aus Ring A die 6-Methyl-salicylsäure (III) und aus Ring B die 4-Hydroxy-benzoesäure (IV) entsteht. Die Reaktionsprodukte müssen papierchromatographisch isoliert werden, da zahlreiche Nebenprodukte auftreten. Dementsprechend erhält man nur geringe Ausbeuten. Wir haben diese Methode (*Abbau a*) dennoch in etwas veränderter Weise herangezogen, da III durch eine *Kuhn-Roth*-Oxydation selektiv abgebaut werden kann. Hierbei erfaßt man in Form der Essig-

\* Herrn Dr. *R. K. Ibrahim*, Alexandria, Ägypten, danken wir für die Überlassung wertvoller Angaben bezüglich der Durchführung dieser Methode.

<sup>8</sup> *Y. Asahina* und *J. Asano*, Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 429, 2059 (1930).

säure (V) jene zwei C-Atome, die bei Zutreffen obiger Vorstellungen von der Biogenese des Hydrangenols aus einer Phenylpropaneinheit stammen sollten, während die restlichen C-Atome des Kerns als CO<sub>2</sub> (VI) anfallen. Die schlechte und von der eingesetzten Hydrangenolmenge abhängige Reproduzierbarkeit der Alkalischmelze veranlaßte uns, nach besseren Methoden zu suchen, insbesondere im Hinblick auf weitere Einbauversuche mit radioaktiven Vorstufen, die nicht in so hoher spezifischer Aktivität zugänglich sind wie z. B. hier das Acetat-1-<sup>14</sup>C.

Direkte Oxydation des Hydrangenols bzw. dessen Dimethyläthers (VII) führte nicht zum Ziel. Hierbei wird Ring A völlig abgebaut und kann nicht gefaßt werden. Ähnlich verhält sich die Hydrangeasäure (II) bei Oxydation in alkalischer Lösung. Während Hydrangenol bei der Behandlung mit Alkali den Lactonring unter Ausbildung einer Doppelbindung aufspaltet und II liefert, erhält man unter den gleichen Bedingungen aus dem Dimethyläther (VII) eine 3,4'-Dimethoxy-β-hydroxydihydro-stilben-2-carbonsäure (VIII), welche in guten Ausbeuten mit KMnO<sub>4</sub> zu 3-Methoxyphthalsäure (IX) und Anissäure (X) oxydiert werden kann (*Abbau b*). IX wurde in Analogie zu einem von *Gatenbeck*<sup>9</sup> für die 3-Hydroxyphthalsäure angegebenen Verfahren weiter abgebaut.

Zur Ausarbeitung des zweiten Abbauweges war eine größere Menge Hydrangenol-dimethyläther nötig, dessen Herstellung aus dem Naturprodukt mühsam erschien. Durch Kondensation von 3-Methoxyhomophthalsäuredimethylester mit Anisaldehyd und Verseifung des entstehenden Esters wird 3,4'-Dimethoxy-stilben-α,2-dicarbonsäure erhalten, die sich selektiv decarboxylieren läßt. Durch Sublimation der 3,4'-Dimethoxy-stilben-2-carbonsäure entsteht Hydrangenoldimethyläther<sup>10</sup>. Die bisher nicht bekannte 3-Methoxy-homophthalsäure konnte durch eine *Beckmann*-Umlagerung 2. Art aus 7-Methoxy-isonitroso-indanon-(1) unschwer dargestellt werden<sup>10</sup>.

### Ergebnisse

Tab. 1 zeigt die Meßwerte der Aktivität von zwei Hydrangenolproben sowie von den Abbauprodukten, die wir auf den zwei verschiedenen Wegen (*a* und *b*) erhielten. Sowohl 4-Hydroxy-benzoessäure (IV) als auch Anissäure (X) waren praktisch inaktiv. Acetat-1-<sup>14</sup>C hat demnach ausschließlich zum Aufbau von Ring A beigetragen. Da die Essigsäure nach der *Kuhn-Roth*-Oxydation (V) inaktiv war und sich die Aktivität der 3-Methoxybenzoessäure (XII) zu jener des CO<sub>2</sub> aus der Decarboxylierung (XIII) wie 2:1 verhielt, ist ein Einbau von drei Acetateinheiten anzunehmen. Die entsprechende Verteilung der aktiven C-Atome im Hydrangenol und in den Abbauprodukten ist bereits in Abb. 1 angedeutet (\*); die Zahl dieser markierten Atome ist in der vorletzten Spalte der Tab. 1 wiedergegeben. Unter der Voraussetzung, daß die drei C-Atome des

<sup>9</sup> S. *Gatenbeck*, Acta Chem. Scand. **12**, 1985 (1958).

<sup>10</sup> H. *Kindl*, Dissertation, Universität Wien, 1962.

Hydrangenols mit gleicher spezifischer Aktivität markiert worden waren, kann man auf Grund der gemessenen Aktivität der Spaltstücke deren Gehalt an aktiven C-Atomen finden. Die Übereinstimmung der gefundenen mit der berechneten Anzahl der markierten C-Atome beweist die Richtigkeit der ursprünglichen Annahme, wonach zur Biosynthese des Hydrangenols eine intakte Phenylpropaneinheit mit drei Acetateinheiten kondensiert wird.

Tabelle 1

	Ausbeute μMol	Aktivität dpm/mM	Aktive C-Atome	
			ber.	gef.
<i>Abbau a</i>				
I. Hydrangenol .....	5,6	17 900 000	3	3,00
IV. 4-Hydroxybenzoesäure .....	1,2	< 20 000	0	< 0,03
III. 6-Methylsalicylsäure .....	0,3	16 700 000	3	2,80
III. 6-Methylsalicylsäure (verdünnt) ...	169	29 600	3	2,80
V. Essigsäure .....	135	< 200	0	< 0,02
VI. Bariumcarbonat .....	945	5 300	3	3,0
<i>Abbau b</i>				
I. Hydrangenol .....	510	123 000	3	3,00
X. Anissäure .....	158	2 720	0	0,07
IX. 3-Methoxy-phthalsäure .....	127	131 000	3	3,19
IX. 3-Methoxy-phthalsäure (verdünnt)	800	20 750	3	3,19
XII. 3-Methoxybenzoesäure .....	450	13 130	2	2,04
XIII. Bariumcarbonat .....	640	5 840	1	0,91

Der Ring A des Hydrangenols bzw. der Hydrangeasäure besitzt die gleiche Substitution wie die 6-Methylsalicylsäure, die auch als Naturstoff bekannt ist und von einem Schimmelpilz gebildet wird. An dieser Verbindung konnte *Birch*<sup>11</sup> erstmalig die Gültigkeit der „Polyacetat“-Regel durch den Einsatz von markiertem Acetat beweisen. Über die einzelnen Schritte der Biosynthese dieser Verbindung sind wir insbesondere durch die Arbeiten von *Lynen*<sup>12</sup> informiert: Acetyl-Coenzym A fungiert als Starter und kondensiert sich sukzessive mit zwei Molekülen Malonyl-CoA unter Decarboxylierung und Abspaltung von Coenzym A. Nach Reduktion der intermediären Ketosäure und Wasserabspaltung reagiert das dritte Molekül Malonyl-CoA analog und bildet nach intramolekularer Kondensation die 6-Methylsalicylsäure, die sich schließlich vom „Multienzymkomplex“ ablöst, an dem alle diese Schritte stattfinden. Die Annahme eines derartigen Komplexes erklärt auch die Tatsache, daß bisher keine Zwischenprodukte dieser Reaktionsfolge isoliert werden konnten. *Lynen*<sup>12</sup> wies darauf hin, daß an Stelle des Acetyl-CoA auch

<sup>11</sup> A. J. Birch, R. A. Massy-Westropp und C. J. Moye, Austral. J. Chem. 8, 539 (1955).

<sup>12</sup> F. Lynen, und M. Tada Angew. Chem. 73, 513 (1961).

andere Ester als Starter fungieren und — allerdings ohne reduktiven Schritt — zum Aufbau der Flavonole, Anthocyane und verwandter Naturstoffe beitragen könnten.

Auf Grund obiger experimenteller Befunde scheint es nicht ausgeschlossen, daß Cinnamoyl-CoA oder sogar p-Cumaryl-CoA als Starter für die Synthese der Hydrangeasäure fungieren und die weiteren Schritte völlig analog der Biogenese der 6-Methylsalicylsäure verlaufen. Für die Lactonisierung der Hydrangeasäure zum Hydrangenol wäre schließlich ein weiterer enzymatisch gesteuerter Schritt anzunehmen, da das natürliche Hydrangenol optisch aktiv ist<sup>13</sup>.

Nach der Infusion von Acetat-1-<sup>14</sup>C wurde das Pflanzenmaterial nicht nur zur Gewinnung des aktiven Hydrangenols aufgearbeitet, sondern es wurden auch die anderen phenolischen und sauren Inhaltsstoffe isoliert, papierchromatographisch gereinigt und gegebenenfalls die Aktivität gemessen. Bisher wurden für *Hydrangea macrophylla*, neben dem Hydrangenol, noch folgende Inhaltsstoffe nachgewiesen:

*Benzoensäuren:* Salicyl-, 4-Hydroxybenzoe-, 2,3-Dihydroxybenzoe-, 2-Hydroxy-3-methoxybenzoe-, Gentisin-, Protocatechu-, Vanillin- und Isovanillinsäure.

*Phenyllessigsäuren:* 4-Hydroxy-phenyllessigsäure.

*Phenylpropionsäuren:* Melilotsäure.

*Zimtsäuren:* o-Cumar-, p-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure.

*Cumarine:* Umbelliferon, 7-Hydroxy-8-methoxy-cumarin.

*Flavonoide:* vor allem Kämpferol.

Von diesen Verbindungen war nach einer Infusion von Acetat-1-<sup>14</sup>C neben dem Hydrangenol erwartungsgemäß nur das Kämpferol stark aktiv, aber auch die Cumarine besaßen eine geringe Aktivität. Über die Verteilung der Radioaktivität in den Inhaltsstoffen von *H. macrophylla* nach Gabe einer Reihe anderer markierter Verbindungen wird demnächst berichtet werden.

Der eine von uns (H. K.) dankt dem „Theodor-Körner-Stiftungsfonds“ für die ihm gewährte Förderung. Das Pflanzenmaterial stammte aus der Großgärtnerei *Adolf Böse*, Wien-Strebersdorf.

## Experimenteller Teil

### Infusion

Eine Lösung von 20 mg Natriumacetat-1-<sup>14</sup>C (0,4 mC) in 10 ml Wasser wurde auf pH 6 eingestellt und auf 20 Glasnäpfe verteilt, in die je ein mit frischer Schnittfläche versehenes Blatt von *H. macrophylla* gestellt wurde. Knapp vor Beendigung der Infusion (nach 2—5 Stdn.) wurde Leitungswasser zugegeben und dieses laufend ergänzt. Während der gesamten Versuchsdauer (1—3 Tage) waren die Blätter dem Licht von zwei Leuchtröhren (*Philips* TL-E 32 W/32 und 40 W/34) ausgesetzt.

<sup>13</sup> V. Plowier, C. R. Seances Acad. Sci. **252**, 312 (1961).

*Isolierung des Hydrangenols*

Die Blätter wurden mit siedendem Äthanol dreimal je 4 Stdn. extrahiert und die vereinigten Lösungen abgedampft. Der sirupöse Rückstand wurde zwischen je 50 ml 2proz. NaOH und Äther verteilt, die klare wäßrige Phase auf einen Gehalt von 5% HCl eingestellt und 1 Stde. auf siedendem Wasserbad erhitzt. Nach dieser Glucosidspaltung wurde ebenfalls mit Äther extrahiert. Der Rückstand der Ätherlösungen wurde im liegenden Rohr<sup>1</sup> bei 0,001 Torr und 180° sublimiert. Die Zone des relativ schwer flüchtigen Hydrangenols liegt in unmittelbarer Nähe des Schiffchens und ist deutlich erkennbar.

Zur Reinigung wurde das Hydrangenol mit Benzol—Essigsäure—Wasser (4:2:1, Gemisch A)<sup>1</sup> absteigend chromatographiert ( $R_f$  0,74 auf Schleicher & Schüll 2043b;  $+NH_3$ : im UV hellblau) und nach Elution mit Methanol das UV-Absorptionsspektrum ( $\lambda_{max}$  315 m $\mu$ ,  $\log \epsilon$  3,98);  $\lambda_{min}$  266 m $\mu$ ) aufgenommen.

Ausbeute 6—10 mg.

*Abbau a*

*6-Methylsalicylsäure* und *4-Hydroxybenzoesäure*: 1,5 mg Hydrangenol wurden mit 2 ml 20proz. NaOH in einem Platinfingertiegel 2 Tage auf 105 bis 110° und dann 4 Tage auf 135° im Trockenschrank erhitzt. Danach wurde das Gemisch in wenig Wasser gelöst, angesäuert und mit Äther extrahiert. Nach chromatographischer Trennung (als Strich von 10 cm absteigend in Gemisch A) und Sprühen der Randstreifen mit diazot. Sulfanilsäure wurden die Zonen der 6-Methylsalicylsäure ( $R_f$  0,84) und 4-Hydroxybenzoesäure ( $R_f$  0,20) mit Methanol eluiert. Konzentrationsbestimmung durch Messung der UV-Absorption. 6-Methylsalicylsäure:  $\lambda_{max}$  309 m $\mu$ ,  $\log \epsilon$  3,51; 4-Hydroxybenzoesäure:  $\lambda_{max}$  255 m $\mu$ ,  $\log \epsilon$  4,12.

*Kuhn-Roth-Oxydation*: In einer Apparatur zur Acetylgruppenbestimmung wurden 20 mg der entsprechend verdünnten 6-Methylsalicylsäure mit 6 ml kalter Chromsäurelösung (1,2 g CrO<sub>3</sub>, 15 g Eis, 8 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) vorerst 1 Stde. bei Raumtemp. belassen und dann nach langsamen Anheizen 2 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Das entstehende CO<sub>2</sub> wird mittels N<sub>2</sub>-Strom in ein mit Lauge beschicktes Absorptionsgefäß getrieben und als BaCO<sub>3</sub> gefällt (Ausb. 96%). Nach Kippen des Kühlers wird die Essigsäure abdestilliert, titriert und als Natriumacetat gemessen (Ausb. 80%).

*Abbau b*

*Hydrangenoldimethyläther*: 12 mg Hydrangenol wurden in 2 ml Methanol gelöst und mit 4 ml einer äther. Diazomethanlösung (0,5 m) 4 Stdn. bei Raumtemp. belassen. Nach Abdampfen erhielt man in praktisch quantitativer Ausb. ein hellgelbes Öl.

*3-Methoxyphthalsäure* und *Anissäure*: 13,6 mg Hydrangenoldimethyläther wurden unter Rühren in 6 ml n NaOH durch Erhitzen auf 100° (30 Min.) gelöst und dann auf Raumtemp. abgekühlt. In die stark gerührte Lösung trug man während 5 Min. 91 mg feinst gepulvertes KMnO<sub>4</sub> (= 12 Äquival.) ein und rührte weitere 5 Min. Danach wurde mit 20proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert, mit NaHSO<sub>3</sub> entfärbt und mit Äther extrahiert. Der Rückstand der Ätherlösung wurde als Strich (18 cm) aufsteigend in n-Butanol—wäßr. NH<sub>3</sub>—Äthanol—Benzol (5:3:2:1, Gemisch C)<sup>1</sup> chromatographiert, die Rand-

streifen mit Methylrot gesprüht, die beiden Zonen mit Methanol eluiert und die Konzentration im UV gemessen. 3-Methoxyphthalsäure:  $R_f$  0,15;  $\lambda_{\max}$  295 m $\mu$ ,  $\log \epsilon$  3,49, Ausb. 25%. Anissäure:  $R_f$  0,45;  $\lambda_{\max}$  254 m $\mu$ ,  $\log \epsilon$  4,17, Ausb. 31%.

*3-Methoxybenzoesäure:* Nach entsprechender Verdünnung wurden 100 mg 3-Methoxyphthalsäure in einer Apparatur zur Acetylgruppenbestimmung im N<sub>2</sub>-Strom mit 15 ml 50proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> langsam auf 160° Badtemp. erhitzt und 30 Min. auf dieser Temp. gehalten. Das CO<sub>2</sub> wurde als BaCO<sub>3</sub> gefällt (Ausb. 80%), die 3-Methoxybenzoesäure durch Ausäthern isoliert, aus wenig Wasser umkristallisiert und im liegenden Rohr sublimiert; papierchromatographisch rein (Gemisch C,  $R_f$  0,48) in einer Ausb. von 56%.

#### *Aktivitätsmessungen*

Hydrangenol wurde jeweils naß oxydiert und das CO<sub>2</sub> als BaCO<sub>3</sub> gefällt. Alle BaCO<sub>3</sub>-Proben wurden in „unendlich dicker“ Schichte in Stahlschälchen gepreßt und mit einem Endfenster-Zählrohr gemessen. Die Messung der Säuren hingegen erfolgte an der Substanz selbst, indem man durch Sublimation auf tarierten Al-Plättchen „endlich dicke“ Schichten herstellte. III, IV und X lassen sich bei 140—160° und Normaldruck glatt sublimieren, bei IX entsteht das Anhydrid. Die Substanz befand sich vorerst in Stahlschälchen, die mit dem Al-Plättchen bedeckt waren, das Anheizen erfolgte zweckmäßigerweise auf dem *Kofler*-Heiztisch, als Kühlung diente ein kleines Becherglas mit Wasser.