Untersuchungen zur Biosynthese des Salicylsäuremethylesters in *Gaultheria procumbens* L

VON HANS GRISEBACH UND KARL-OTTO VOLLMER

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforschg. **18 b**, 753—756 [1963]; eingegangen am 21. Juni 1963)

Acetate-[1-¹⁴C] and cinnamic acid-[3-¹⁴C] were administered to young leaves of *Gaultheria procumbens* L. The methylsalicylate isolated from the essential oil was radioactive only with cinnamic acid-[3-¹⁴C] as the precursor. Decarboxylation of the salicylic acid showed that the total radioactivity was located in the carboxyl group. Salicylic acid must therefore be regarded as a metabolite of cinnamic acid.

Über die Biosynthese der Benzoesäuren in höheren Pflanzen ist bisher wenig bekannt. Nach unseren Kenntnissen über die Bildung von Aromaten wären drei verschiedene Biosynthesewege für Benzoesäuren möglich: 1. Bildung aus Acetat und Malonat, 2. Bildung aus Shikimisäure und 3. Bildung aus Phenylpropanverbindungen unter Verlust zweier C-Atome der Seitenkette. In der Tat sprechen die bisherigen Ergebnisse dafür, daß zumindest bei niederen Pflanzen alle drei Wege verwirklicht sind. In ihren Untersuchungen zur Biosynthese der 6-Methylsalicylsäure (I) bei *Penicillium griseofulvum* konnten BIRCH und Mitarbb.¹ den Aufbau dieser Verbindung aus Acetat und Malonat beweisen. Auch andere Benzoesäuren werden in Pilzen aus Acetat gebildet². In *P. urticae* kann I zu Gentisinsäure (II) umgewandelt werden, wobei die Methyl- zur Carboxylgruppe oxydiert wird³.

Protocatechusäure dagegen wird bei *Neurospora crassa* durch Dehydratisierung von 5-Dehydroshikimisäure gebildet⁴ und bei *Phycomyces blakesleeanus* kann wahrscheinlich eine Dehydrierung dieser

Verbindung zu Gallussäure führen⁵. Auch für die Bildung der Gallussäure in höheren Pflanzen wird dieser Weg angenommen⁵. So ist in *Geranium pyrenaicum* Glucose eine weitaus bessere Vorstufe der Gallussäure als Acetat oder Phenylalanin⁶. Andererseits läßt sich bei *Phycomyces blakesleeanus* die Gallussäurebildung durch Zugabe von Tyrosin stark stimulieren, so daß für ihre Bildung die β -Oxydation eines Trihydroxyphenylalanins vorgeschlagen wurde⁷.

Bei Untersuchungen zur Biosynthese des Cocains stellten GROSS und SCHÜTTE⁸ fest, daß nach Gabe von Phenylalanin-[3-¹⁴C] beide Esterkomponenten, Tropasäure und Benzoesäure, radioaktiv waren. Obwohl keine Bestimmung der Aktivitätsverteilung in der Benzoesäure durchgeführt wurde, ist diese sehr wahrscheinlich durch einen Abbau der Seitenkette des Phenylalanins entstanden.

Für die Biosynthese der Salicylsäure ließe sich ein Weg über Acetat $\rightarrow$ 6-Methylsalicylsäure formulieren, wobei die Methylgruppe durch Oxydation zur Carboxylgruppe — analog der Gentisinsäurebildung — und Decarboxylierung eliminiert werden könnte. Da jedoch 6-Methylsalicylsäure bisher nur in einer höheren Pflanze gefunden wurde (*Eriodictyon angustifolium*⁹), erscheint eine Bildung über den Weg 2 oder 3 wahrscheinlicher.

Salicylsäure kommt — besonders in Form des Methylesters — in den ätherischen Ölen zahlreicher

¹ A. J. BIRCH, R. A. MASSY-WESTROPP u. C. J. MOYE, Austral. J. Chem. **8**, 539 [1955]; A. J. BIRCH, A. CASSERA u. R. W. RICKARDS, Chem. u. Ind. **1961**, 792; vgl. F. LYNEN u. M. TADA, Angew. Chem. **73**, 519 [1961].

² R. BENTLEY, Annu. Rev. Biochem. **31**, 589 [1962].

³ S. GATENBECK u. I. LÖNNROTH, Acta chem. scand. **16**, 2298 [1962].

⁴ S. R. GROSS, J. biol. Chemistry **233**, 1146 [1958].

⁵ E. HASLAM, R. D. HAWORTH u. P. F. KNOWLES, J. chem. Soc. [London] **1961**, 1854.

⁶ E. E. CONN u. T. SWAIN, Chem. u. Ind. **1961**, 592.

⁷ W. BRUCKER, Planta **48**, 627 [1957].

⁸ D. GROSS u. H. R. SCHÜTTE, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. **296**, 1 [1963].

Pflanzen vor¹⁰. Für unsere Versuche wählten wir Wintergrün, *Gaultheria procumbens* L. (Ericaceae), in welcher der Salicylsäuremethylester hauptsächlich als Primverosid (Gaultherin) vorkommt¹⁰.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß in dieser Pflanze die Salicylsäure nicht aus Acetat, sondern aus Zimtsäure durch Abbau der Seitenkette gebildet werden kann.

Versuche

Zuführung von Zimtsäure-[3-¹⁴C] oder Acetat-[1-¹⁴C] an Blätter von *Gaultheria procumbens*

Von mehrjährigen Pflanzen wurden unter Wasser 20 junge Blätter am unteren Ende der Blattstiele abgeschnitten und in kleine Gläschen gestellt, welche je 0,75 cm³ einer Lösung von 7,6 mg Zimtsäure-[3-¹⁴C] (100 µC) in 15 cm³ Wasser plus 8,8 mg NaHCO₃ enthielten. Die Blätter blieben 8 Tage lang in einer feuchten Kammer unter Belichtung mit 4 Leuchtrohren (Osram, je 2 HNT und HNI) im Abstand von 50 cm; Leitungswasser wurde nach Bedarf nachgefüllt.

In gleicher Weise erhielten 20 Blätter eine Lösung von 9,6 µMol Na-acetat-[1-¹⁴C] (88 µC) und 48 µMol Glucose in 15 cm³ Wasser.

Isolierung des Salicylsäuremethylesters

Die Blätter wurden in einem Mörser mit Quarzsand zerrieben, mit 40 cm³ Wasser in den Kolben für die Wasserdampfdestillation übergespült und zunächst 12 Stdn. bei Zimmertemperatur belassen. Dann destillierte man mit Wasserdampf in eine mit Eiswasser gekühlte Vorlage. Nach Sättigung des Destillates (etwa 100 cm³) mit Kochsalz wurde 6-mal mit je 20 cm³ Äther ausgeschüttelt und nach Trocknen mit Na₂SO₄ der Äther am Rotationsverdampfer bei 0° abgezogen, wobei 34 mg Öl hinterblieben. Zur Reinigung chromatographierte man auf Kieselgelplatten mit Petroläther (60–70°)/Essigester (10 : 1). Das in 1 cm³ Äther gelöste Öl wurde auf zwei Platten (20·20 cm) aufgetragen. Die Zone des Esters (*R_f* 0,4–0,5, UV hellblau) eluierte man mit Äther und chromatographierte nochmals in der gleichen Weise. Die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung bei 239 und 307 mµ nach der zweiten Chromatographie ergab 10,7 mg Ester beim Zimtsäureversuch und 11,4 mg beim Acetatversuch. Für die weiteren Reaktionen wurde jeweils mit der zehnfachen Menge inaktiven Esters verdünnt.

Verseifung der Salicylsäuremethylesters

Zu 110 mg Ester wurden 8 cm³ 15-proz. methanolische KOH zugefügt und 6 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die Hauptmenge des Methanols entfernte man im Rotationsverdampfer, gab zu dem fast festen Rückstand 10 cm³ konz. Kochsalzlösung und schüttelte nach Ansäuern mit 10-proz. HCl sechsmal mit je 5 cm³ Äther aus. Der ätherischen Lösung entzog man die Säure mit Bicarbonat. Nach Ansäuern und Erwärmen dieser Lösung kristallisierte die Salicylsäure beim Abkühlen aus. Die Säure wurde aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute 82 Milligramm.

Decarboxylierung der Salicylsäure

20 mg Säure und 40 mg Cu-Pulver wurden in einem Supremax-Rohr mit Brechsiegel i. Vak. eingeschmolzen und im Muffelofen 4 Stdn. auf 210–220° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die am Kapillarende kondensierte Substanz mit einer leuchtenden Bunsenflamme in den anderen Teil des Rohres übersublimiert. Das Öffnen der Bombe erfolgte im Vakuumrechen, in dem die Volumenbestimmung des CO₂ und die Überführung in das Gaszählrohr vorgenommen wurde¹¹. Ausbeute an CO₂ etwa 74 Prozent. Die Bombe wurde dann aufgeschnitten, die festen Decarboxylierungsprodukte mit Äther ausgespült und nach Absaugen des Cu-Pulvers und Abdampfen des Äthers zum Rückstand 0,1 cm³ Pyridin und 25 mg *p*-Nitrobenzoylchlorid zugefügt. Nach 10 Min. bei 120° zog man das Pyridin i. Vak. ab, gab 20 cm³ Äther hinzu und schüttelte dreimal mit 5 cm³ halbkonz. Bicarbonatlösung aus. Die ätherische Lösung wurde nach Einengen zur Reinigung des *p*-Nitrobenzoesäurephenylesters auf Kieselgel mit Benzol/Petroläther (1 : 1) chromatographiert (*R_f* ~ 0,17, Sichtbarmachung durch Besprühen mit alkoholischer Fluoresceinlösung. Im UV dunkelviolet). Nach Elution der Esterzone mit Äther reinigte man nochmals in der gleichen Weise. Ausbeute: 5 mg, Schmp. 125° (Lit. 127°).

Ergebnisse

In Parallelversuchen erhielten je 20 Blätter von *Gaultheria* durch die Blattstiele 100 µC Zimtsäure-[3-¹⁴C], bzw. 88 µC Na-acetat-[1-¹⁴C]. Die Blätter blieben 8 Tage in einer feuchten Kammer unter Belichtung. Zur Isolierung des Salicylsäuremethylesters wurden sie zerrieben und 12 Stdn. bei Zimmertemperatur mit Wasser stehengelassen, wobei das Enzym Primverosidase das Glykosid in den Ester und Primverose, bzw. Glucose und Xylose

⁹ W. KARRER, Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser Verlag, Basel 1958, S. 364.

¹⁰ loc. cit. ⁹, S. 354.

¹¹ H. SIMON, H. DANIEL u. J. F. KLEBE, Angew. Chem. **71**, 303 [1959].

spaltet¹². Das anschließend durch Wasserdampfdestillation isolierte ätherische Öl („Wintergrünöl“) wurde zur präparativen Reinigung auf Kieselgelplatten mit Petroläther/Essigester (10 : 1) chromatographiert. Auf dem Chromatogramm waren im UV-Licht neben dem Salicylsäuremethylester noch sechs weitere Verbindungen zu erkennen¹³. Ein Autoradiogramm des Zimtsäureversuchs zeigte starke Aktivität in der Esterzone; daneben fanden sich mindestens vier weitere radioaktive Verbindungen, doch wurde zunächst nur die Esterzone weiter untersucht. Das Autoradiogramm des Acetatversuchs ergab eine kaum sichtbare Schwärzung der Esterzone, daneben aber drei stärker radioaktive Verbindungen.

Nach nochmaliger Chromatographie der Esterzone des Zimtsäureversuchs war auf dem Chromatogramm nur noch diese Zone radioaktiv. Die Konzentration des Esters wurde bei 239 und 307 m μ bestimmt (11,4 mg) und zum weiteren Abbau mit der zehnfachen Menge inaktiven Esters verdünnt. Die durch anschließende Verseifung mit methanolischer Kalilauge erhaltene Salicylsäure wurde nach Reinigung zur konstanten spez. Aktivität im Supremaxrohr unter Zusatz von Cu-Pulver bei 210° decarboxyliert. Das zurückbleibende Phenol isolierte und reinigte man als *p*-Nitrobenzoesäurephenylester. Die Meßergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt. Die gesamte Aktivität der Salicylsäure befindet sich in der Carboxylgruppe.

Verbindung	ipm/mMol	Prozent Aktivität von Salicylsäure
Salicylsäure		
1-mal umkrist.	8600	
3-mal umkrist.	9040	100
CO ₂ aus Salicylsäure	8720	97
<i>p</i> -Nitrobenzoesäurephenylester	0	0

Tab. 1. Aktivitätsverteilung in der Salicylsäure. Versuch mit Zimtsäure-[3-¹⁴C]. Messungen im Proportionalzählrohr nach Verbrennung der Substanzen¹¹.

¹² E. GILDEMEISTER, Die ätherischen Oele, Verlag der Schimmel u. Co. AG., Miltiz bei Leipzig 1928, Bd. I, S. 634 ff.; Bd. VI, Akademie-Verlag, Berlin 1961, S. 543.

¹³ Das Wintergrünöl enthält nach Angaben der Literatur über 98% Salicylsäuremethylester^{14, 15}. Als weitere Bestandteile werden angegeben: 1. Ein Paraffin, das als Triacontan C₃₀H₆₂ angesehen wird, 2. ein Aldehyd oder Keton, 3. ein Alkohol C₈H₁₆O der 2. entspricht, 4. ein Ester C₁₄H₂₄O₂, der beim Verseifen in den Alkohol C₈H₁₆O und eine Säure zerfällt, die auch durch Permanganat-Oxydation von 2. entsteht¹⁵.

¹⁴ M. I. BLAKE, Analytic. Chem. **30**, 400 [1958].

Der Salicylsäureester des Acetat-Versuchs wurde nach zweimaliger Dünnschichtchromatographie und Verdünnung mit inaktivem Ester mit *p*-Nitrobenzoylchlorid zum entsprechenden *p*-Nitrobenzoat umgesetzt. Die Verbindung zeigte unter dem Methandurchflußzählrohr keine nachweisbare Radioaktivität.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Salicylsäure in *Gaultheria* aus Zimtsäure gebildet werden kann, wobei das β -C-Atom der Zimtsäure zur Carboxylgruppe der Salicylsäure wird. Dieser Weg dürfte auch der physiologische Bildungsweg in der Pflanze sein, da Acetat nicht in die Salicylsäure eingebaut wird und ein Weg über Shikimisäure sich nur über mehrere Dehydratisierungen, Hydrierungen und Dehydrierungen formulieren läßt.

Zimtsäure kann sich in Pflanzen unter direkter Abspaltung von Ammoniak mit Hilfe des Enzyms Phenylalanase bilden¹⁶. Diese Reaktion ist nicht reversibel. Der Einbau der Zimtsäure zeigt daher, daß der Abbau der Seitenkette von der Stufe der Zimtsäure aus erfolgen muß. Wahrscheinlich verläuft auch der Übergang Phenylalanin $\rightarrow$ Benzoesäure⁸ über die Stufe der Zimtsäure. Bei der Biosynthese der Amaryllidaceen-Alkaloide wird nach den bisherigen Befunden der als Zwischenstufe angenommene Protocatechualdehyd ebenfalls aus Zimtsäure gebildet¹⁷. Die besten Vorstufen für das Arbutin (Hydrochinon- β -D-glucosid) in Birnenblättern sind Zimtsäure und Phenylalanin¹⁸. Hierbei tritt also ein vollständiger Abbau der Seitenkette ein, wobei Gentisinsäure eine Zwischenstufe sein könnte. Analog kann Phenylalanin in Ratten in den Benzochinonring des Coenzym Q umgewandelt werden¹⁹.

Der Abbau einer β -Arylacrylseitenkette ist auch bei Abbaureaktionen durch Mikroorganismen gefunden worden. So verläuft der mikrobielle Abbau des

¹⁵ E. GILDEMEISTER, Bd. III, S. 581, und Bd. VI, S. 542.

¹⁶ A. C. NEISH, Phytochem. **1**, 1 [1961].

¹⁷ R. J. SUHADOLNIK, A. G. FISCHER u. J. ZULALIAN, Proc. chem. Soc. **1963**, 132; J. ZULALIAN, A. G. FISCHER u. R. J. SUHADOLNIK, Abs. Meeting Amer. Chem. Soc., Los Angeles, Calif., **1963**, S. 30-L.

¹⁸ S. K. GRISDALE u. G. H. N. TOWERS, Nature [London] **188**, 1130 [1960].

¹⁹ R. BENTLEY, V. G. RAMSAY, G. M. SPRINGER, G. H. DIALLAMEH u. R. E. OLSON, Biochem. biophysic. Res. Commun. **5**, 443 [1961].