toluene for 4 hr. The product (0.7 g.) was isolated after partial evaporation of the toluene, and was recrystallized from the same solvent. M.p. 235°.

Anal. Calc. for $[\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{P}=\text{N}]_n$:
C 72.4 H 5.1 N 7.0 P 15.5,

Found:
C 72.2 H 4.8 N 6.7 P 15.0.

The analysis confirms the presence of two phenyl groups per phosphorus. Melting point and IR spectrum (comparison to authentic material¹¹) unequivocally identified the product as hexaphenyl-cyclotriphosphazene¹¹, i. e. $n=3$.

¹¹ H. BODE and H. BACH, Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 215 [1942].

Biosyntheseversuche mit Gentianaceen I

Biosynthese des Gentisins

Von HEINZ-GÜNTER FLOSS und ACHIM RETTIG *

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Z. Naturforschg. **19 b**, 1103—1105 [1964]; eingegangen am 28. September 1964)

The biosynthesis of gentisine (I) in *Gentiana lutea* involves condensation of a C_6-C_1 acid with three acetate units, which form the phloroglucinol ring. Nature and origin of the C_6-C_1 acid are discussed.

Xanthon-Derivate werden im Pflanzenreich hauptsächlich in der Familie der Gentianaceen angetroffen. Daneben wurden einige Xanthone aus Mikroorganismen isoliert¹. Ein Charakteristikum der Xanthone der höheren Pflanzen besteht darin, daß einer der beiden Benzolringe die Hydroxylgruppen-Anordnung des Phloroglucins bzw. Resorcins aufweist. Dieser Ring wird im folgenden als Ring B bezeichnet. Die Xanthone der höheren Pflanze enthalten im Gegensatz zu denen aus Mikroorganismen nur freie oder verätherte Hydroxylgruppen, dagegen keine Kohlenstoffsubstituenten am Ringsystem. Die wichtigste und am längsten bekannte Verbindung dieser Gruppe ist das in zahlreichen *Gentiana*-Spezies vorkommende Gentisin (I).

Die Biosynthese der Xanthone der höheren Pflanze könnte prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen. Das Ringsystem könnte vollständig auf dem Polyacetatwege gebildet werden, wobei Malonylcoenzym A sowohl als Starter als auch als Kettenverlängerer dienen müßte. Danach sollten 12 der 13 Ring-C-Atome aus Acetat und entweder C-4a oder C-10a aus CO_2 stammen. Die Alternative wäre, in Analogie zur Biosynthese der Flavonoide², die Bildung aus einer C_6-C_1 -Carbonsäure als Starter, an die drei Acetat-einheiten angefügt werden. In diesem Falle würden

nur die 6 C-Atome des Ringes B direkt aus Acetat stammen.

In der vorliegenden Arbeit soll über Untersuchungen zur Biosynthese des Gentisins in *Gentiana lutea* mit Hilfe von Acetat-[1-¹⁴C] berichtet werden.

Methodik

Einbauversuch

Eine Seitenwurzel einer jungen Pflanze von *Gentiana lutea* wurde unter Wasser abgeschnitten, auf die Schnittfläche wurde 0,1 mC = $2,2 \cdot 10^8$ dpm Natriumacetat-[1-¹⁴C] (spez. Akt. 2,8 mC/mMol), gelöst in 60 μl Wasser, aufgetropft. Dann wurde mit 20, 25, 55 und 45 μl Wasser nachgespült. Die Wurzel wurde in feuchte Watte gewickelt und die Pflanze 20 Tage im Freien aufbewahrt. Danach wurde die Wurzel abgetrennt, zerkleinert und getrocknet. Die getrocknete Wurzel (24,6 g) enthielt 95% der applizierten Aktivität.

Isolierung von Gentisin

Da außer dem Gentisin auch das Alkaloid Gentianin isoliert werden sollte³, wurde eine für beide Verbindungen geeignete Aufarbeitungsart gewählt. Das Trockenmaterial wurde mit konz. Ammoniak durchfeuchtet, nach 2 Tagen bei 50–55° getrocknet, mit halbkonz. HCl durchfeuchtet, wieder getrocknet, mit konz. Ammoniak durchfeuchtet und mit 250 ml Äthylenchlorid

* Auszug aus der Staatsexamensarbeit von A. RETTIG, TH München, 1964.

¹ W. KARRER, „Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe“. Birkhäuser Verlag, Basel 1958.

² H. GRISEBACH u. W. OLLIS, Experientia [Basel] **17**, 4 [1961].

³ II. Mitt., nachstehend.

3 Tage ausgeschüttelt. Das Äthylenchlorid wurde abgesaugt und der Rückstand erneut extrahiert. Zu den vereinigten Extrakten wurden 201,0 mg Gentisin und 198,8 mg Gentianin gegeben, dann wurden sie zuerst mit 2-proz. H_2SO_4 , dann mit 2-n. NaOH je 3-mal ausgeschüttelt. Der saure Auszug, der das Gentianin enthielt, wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Äthylenchlorid ausgeschüttelt. Der Äthylenchlorid-Rückstand wurde mit Benzol/Aceton 9 : 1 an Al_2O_3 (Brockmann) chromatographiert⁴; die Gentianinfraktionen wurden aus Petroläther umkristallisiert. 122,4 mg Gentianin, Schmp. 79–80°. Spez. Akt. 4,76 dpm/ μMol $\sim$ 0,0026% Einbau. Der alkalische Auszug wurde mit HCl angesäuert. Das Gentisin wurde durch Filtration und durch Ausschütteln des Filtrats mit CH_2Cl_2 isoliert und aus 80-proz. Äthanol umkristallisiert. 122,4 mg. 52,0 mg davon wurden mit 498,2 mg Trägermaterial verdünnt und zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert. Diese betrug 17,5 dpm/ μMol (verdünntes Material) entsprechend 0,069% Einbaureate. Für den Abbau wurde das gesamte Gentisin aus diesem und einem zweiten Versuch mit Trägermaterial verdünnt und bis zu einer konstanten spez. Aktivität von 47,25 dpm/ μMol aus 80-proz. Äthanol und Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Alkalischemelze des Gentisins⁵

300 mg Gentisin wurden mit je 2 g KOH und NaOH im Mörser gemischt, im Silbertiegel unter Stickstoff langsam auf 280–290° erhitzt und bei dieser Temperatur bis zum Ende der Gasentwicklung (ca. 1 $\frac{1}{4}$ Stdn.) belassen. Nach Erkalten unter Stickstoff wurde der Kuchen aus dem Tiegel herausgekratzt und in überschüssiger 2-n. H_2SO_4 gelöst. Die Lösung wurde mit Kochsalz gesättigt und 10-mal mit Äther ausgeschüttelt. Aus der Ätherlösung wurde die Gentisinsäure mit 2-mal 2 ml ges. NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt, die man sofort in 2-n. H_2SO_4 einfließen ließ. Der Rückstand der Ätherlösung gab nach Umkristallisation aus Essigester/Petroläther und Sublimation bei 170–180°/0,3 Torr 24,2 mg Phloroglucin, Schmp. 208°, Misch-Schmp. 210°. Die schwefelsaure Gentisinsäurelösung wurde mit Kochsalz gesättigt und erschöpfend mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand gab nach 2-maliger Umkristallisation aus Essigester/Petroläther 32 mg Gentisinsäure, Schmp. 185–193°.

Diacetylgentisinsäure

6,8 mg Gentisinsäure wurden mit 1 ml Acetanhydrid und 1 Tropfen konz. H_2SO_4 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von Wasser wurde mit Kochsalz gesättigt und die Diacetylgentisinsäure mit Äther ausgeschüttelt und aus Benzol/Petroläther umkristallisiert. Schmp. 110–116°.

Decarboxylierung von Gentisinsäure

10 mg der Säure wurden in einer evakuierten Glasbombe mit leicht brechbarer Spitze 80 Min. auf 220° erhitzt. Das CO_2 wurde nach der Methode von SIMON et al.⁶ abgefüllt und analysiert. Ausbeute 75 Prozent.

Entmethylierung von Gentisin

100 mg Gentisin und 3 ml Jodwasserstoffsäure wurden in einer evakuierten Glasbombe 2 Stdn. auf 140° erhitzt. Das Entmethylierungsprodukt Gentisein wurde abfiltriert und aus 50-proz. Alkohol umkristallisiert.

Alle Radioaktivitätsanalysen erfolgten nach SIMON et al.⁶ durch Gasphasenmessung im Proportionalzählrohr.

Ergebnisse

Natriumacetat-1- ^{14}C wurde über die Wurzel an eine *Gentiana lutea*-Pflanze verfüttert. Das Gentisin wurde nach 20-tägiger Inkubation unter Zusatz von Trägermaterial isoliert. Seine Radioaktivität entsprach einer Einbaureate von 0,069 Prozent. Es wurde zur Ermittlung der Isotopenverteilung in der im Schema 1 angegebenen Weise abgebaut. Die Zahlen unter den Formeln geben die gemessene Radioaktivität der Verbindungen an.

Schema 1. Abbau von Gentisin.

⁴ S. SHIBATA, M. FUJITA u. H. IGETA, J. pharmac. Soc. Japan [Yakugakuzasshi] **77**, 116 [1957].

⁵ H. HLASIWETZ u. J. HABERMANN, Liebigs Ann. Chem. **175**, 62 [1875].

⁶ H. SIMON, H. DANIEL u. J. F. KLEBE, Angew. Chem. **71**, 303 [1959]; H. SIMON u. F. BERTHOLD, Atomwirtschaft **7**, 498 [1962].

Schwierigkeiten bereitete die Trennung von Gentisinsäure und Phloroglucin nach der Alkalischmelze, die durch Ausschütteln der Ätherlösung beider Verbindungen mit Bicarbonatlösung erfolgte. Da Phloroglucin in Wasser beträchtlich löslich ist, kann man nur sehr wenig Bicarbonatlösung verwenden. Die Extraktion der Gentisinsäure ist dann noch nicht vollständig, während sich bereits ein Teil des Phloroglucins in der Gentisinsäure-Fraktion befindet. Die Gentisinsäure wurde daher in das Diacetylderivat übergeführt, das praktisch kaum noch Aktivität enthält. Da auch die *o*-Methylgruppe frei von Radioaktivität war und das Gentisin eine konstante spez. Aktivität aufwies, muß das Phloroglucin mindestens 95% des gesamten ^{14}C enthalten. Der demgegenüber zu niedrige Meßwert beruht offensichtlich auf der Verunreinigung mit Gentisinsäure. Es war weiterhin wichtig festzustellen, ob das Phloroglucin die nach der Polyacetatregel zu fordernde alternierende Isotopenverteilung aufweist. Dazu wurde es mit Trägermaterial verdünnt, nach FREUDENBERG⁷ in das Trinitrophloroglucin überführt und dieses der Brompikrinspaltung unterworfen. Nach der spez. Radioaktivität des isolierten Brompikrins ist das ^{14}C im Phloroglucin in Übereinstimmung mit der Polyacetatregel zu mindestens 80% in den 3 die Hydroxylgruppen tragenden C-Atomen lokalisiert.

Diskussion

Die Versuchsergebnisse zeigen eindeutig, daß nur der Phloroglucinring des Gentisins in *Gentiana lutea*

unmittelbar aus Acetat nach dem Schema einer Polyacetat-Biosynthese aufgebaut wird. Es ist daher anzunehmen, daß die Biosynthese des Gentisins ausgehend von einer $\text{C}_6\text{-C}_1$ -Carbonsäure als Starter durch Anfügung von 3 Acetateinheiten erfolgt. Über die Natur dieser $\text{C}_6\text{-C}_1$ -Carbonsäure können wir noch keine Aussagen machen. Wir halten es für wahrscheinlich, daß Gentisinsäure als Starter dient, jedoch muß man auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß Benzoesäure oder eine einfach hydroxylierte Benzoesäure diese Funktion ausübt. Desgleichen können wir noch keine eindeutige Aussage über die Herkunft dieser Carbonsäure machen. GATENBECK und LÖNNROTH⁸ zeigten, daß *Penicillium urticae* Gentisinsäure aus Acetat bildet. Auf Grund unserer Daten glauben wir diesen Weg bei *Gentiana lutea* ausschließen zu können. Nach den jüngsten Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen⁹⁻¹² ist es vielmehr wahrscheinlich, daß die $\text{C}_6\text{-C}_1$ -Carbonsäure hier wie bei anderen höheren Pflanzen durch Kettenverkürzung aus einer Zimtsäure gebildet wird. Versuche mit markierter Zimtsäure und verschiedenen markierten Benzoesäuren sind gegenwärtig im Gange, um diese Fragen zu klären.

Herrn Prof. Dr. F. WEYGAND danken wir für die großzügige Förderung dieser Arbeit, desgleichen der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Mitteln. Unser Dank gilt ferner Fr. H. PFLAUMER für die Ausführung der Radioaktivitäts-Analysen.

⁷ K. FREUDENBERG, H. FIKENTSCHER u. W. WENNER, Liebigs Ann. Chem. **442**, 309 [1925].

⁸ S. GATENBECK u. I. LÖNNROTH, Acta chem. scand. **16**, 2298 [1962].

⁹ D. GROSS u. H. R. SCHÜTTE, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. **296**, 1 [1963].

¹⁰ H. GRISEBACH u. K.-O. VOLLMER, Z. Naturforschg. **18b**, 753 [1963].

¹¹ M. H. ZENK u. G. MÜLLER, Z. Naturforschg. **19b**, 398 [1964].

¹² S. Z. EL BASYOUNI, D. CHEN, R. K. IBRAHIM, A. C. NEISH u. G. H. N. TOWERS, Phytochemistry **3**, 485 [1964].