

WILHELM SANDERMANN und WERNER SCHWEERS

(Mitbearb. von O. BEINHOFF)

Biogenetische Studien, V¹⁾Über die Biogenese von n-Heptan in *Pinus jeffreyi* Murr.¹⁾

Aus der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft,
Institut für Holzchemie und Chemische Technologie des Holzes, Reinbek, Bez. Hamburg
(Eingegangen am 2. Juni 1960)

Die flüchtigen Anteile des Terpentins von *Pinus jeffreyi* Murr. und *P. sabiniana* enthalten nicht wie die anderer Kiefernarten Terpene, sondern bis 98 % n-Heptan. Die Biogenese dieser Verbindung wurde geprüft. Sie entsteht nicht durch Abbau einer Terpenverbindung, da Einführung von Mevalonsäure-[2-¹⁴C] in *P. jeffreyi* inaktives n-Heptan gibt. Einführung von Natriumacetat-[1-¹⁴C] erzeugt hingegen aktives n-Heptan, in dem die C-Atome 2, 4 und 6 radioaktiv sind.

Danach ist n-Heptan ein Produkt des Acetatstoffwechsels.

Die Terpentinöle aus *Pinus*-Harzen enthalten fast durchweg Terpene und Terpen-derivate. Nur die flüchtigen Terpentinantteile von *Pinus jeffreyi* Murr. und *P. sabiniana* Dougl. (Digger pine) machen insofern eine bemerkenswerte Ausnahme, als sie zu 95–98 % aus n-Heptan bestehen²⁾. Seitdem wurde dieser Kohlenwasserstoff in geringer Menge neben Terpenen noch im Terpentinöl folgender Kiefernarten gefunden: *Pinus coulteri* D. Don. (Coulter pine) (5%)³⁾, *P. torreyana* Parry⁴⁾ und *P. pseudostrobus* (21%)⁵⁾.

Die Tatsache, daß Vertreter einer Pflanzenfamilie mit typischem „terpenoiden“ Stoffwechsel statt der Terpene einen aliphatischen Kohlenwasserstoff aufbauen, veranlaßte uns, die Biogenese von n-Heptan zu untersuchen. Da in *Pinus jeffreyi* und *P. sabiniana* Terpene praktisch vollkommen fehlen, ist es denkbar, daß n-Heptan sekundär aus einer Terpenverbindung entstanden ist, etwa durch Demethylierung und anschließende Reduktion. Demethylierungen sind von der Biogenese der Sterine, des Santens, Cryptons, Australols und anderer Verbindungen bekannt. Ein weitverbreitetes, biogenetisch interessantes Abbauprodukt aliphatischer Terpene ist das Methylheptanon (III), das sich meist neben Citral und Linalool im Citronenöl, Verbenaöl, Geraniumöl, Palmarosaöl, in Stoffwechselprodukten der Pilze *Endoconidio-*

¹⁾ III. Mitteil.: W. SANDERMANN und H. STOCKMANN, Chem. Ber. **91**, 933 [1958]; IV. Mitteil.: W. SANDERMANN und H. STOCKMANN, Naturwissenschaften **43**, 581 [1956].

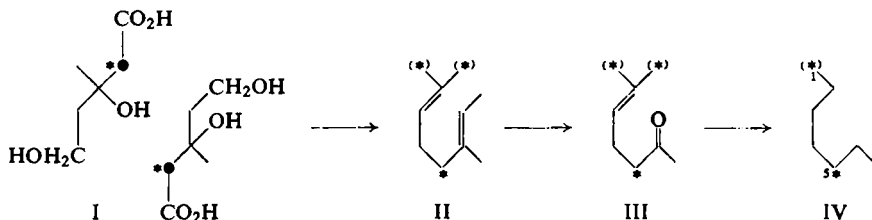
²⁾ T. E. THORPE, Liebigs Ann. Chem. **198**, 364 [1879]; W. C. BLASDALE, J. Amer. chem. Soc. **23**, 162 [1901]; Pharmacol. Rev. **25**, 363 [1907]; S. M. GORDON, Amer. J. Pharmacy Sci. support. publ. Health **100**, 156 [1928]; C. W. SONDERN, J. Amer. pharmac. Assoc. **22**, 214 [1933]; A. W. SCHORGER, Ind. Engng. Chem. **5**, 971 [1913]; U. S. Dept. Agr. Forest Service Bull. Nr. 119 [1913]; P. A. FOOTE, J. Amer. pharmac. Assoc. **18**, 350 [1929]; A. H. UHL, ebenda **24**, 380 [1935]; E. GUENTHER, The Essential Oils, D. Van Nostrand Co., Inc., New York 1952, Vol. VI, S. 256, 280–287; N. T. MIROV, Unasylya **8**, 167 [1954].

³⁾ N. T. MIROV, Ind. Engng. Chem. **38**, 405 [1946].

⁴⁾ A. J. HAAGEN-SMIT, C. T. REDEMAN und N. T. MIROV, J. Amer. chem. Soc. **60**, 2014 [1948].

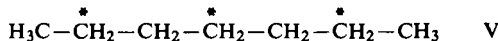
⁵⁾ P. M. ILOFF JR. und N. T. MIROV, J. Amer. pharmac. Assoc. **42**, 46 [1953].

phora coerulescens Münch und *E. virescens* Davidson und anderen ätherischen Ölen findet⁶⁾. Durch Methylgruppenoxydation und Reduktion könnte daraus n-Heptan (IV) entstehen.

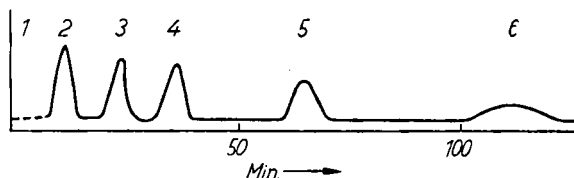


Um diese Hypothese zu prüfen, führten wir Mevalonsäure-[2-¹⁴C](I) durch die Nadeln in *Pinus jeffreyi* ein. Diese Vorstufe geht über Isopentenylpyrophosphat in Terpene und Terpenoide über⁷⁾. Falls n-Heptan aus Mevalonsäure-[2-¹⁴C] über Methylheptanon entsteht, müßten die mit * gekennzeichneten C-Atome in II, III und IV radioaktiv sein, während von den mit (*) markierten Methylgruppen nur eine aktiv sein könnte. Das gaschromatographisch abgetrennte n-Heptan war jedoch inaktiv. Demnach hat es keinen terpenoiden Ursprung.

Um zu prüfen, ob das n-Heptan auf dem gleichen biochemischen Wege wie die Fettsäuren über den Acetatstoffwechsel gebildet wird, führten wir einmal Natriumacetat-[2-¹⁴C] und in einem weiteren Versuch Natriumacetat-[1-¹⁴C] in gleicher Weise wie Mevalonsäure in *Pinus jeffreyi* ein. In jedem Falle wurde aktives Heptan erhalten. Über die Einbaurate des Acetats in das Heptan läßt sich auf Grund der Versuchsdurchführung keine genaue Angabe machen, da bei der Isolierung der geringen Heptanmengen inaktives Heptan zugesetzt wurde und eine genaue Bestimmung des Verdünnungsgrades nicht möglich war. Hingegen konnte durch Abbau des nach Applikation von Natriumacetat-[1-¹⁴C] gewonnenen n-Heptans gezeigt werden, daß die Aktivität im n-Heptan in den C-Atomen 2, 4 und 6 lokalisiert ist (V).



Dieser Nachweis wurde wie folgt geführt: Zunächst wurde durch Bromieren in der Gasphase das Gemisch der isomeren Monobromheptane hergestellt. Hieraus wurde



Abbild. 1. Gaschromatogramm der Fettsäuren (Ausführung s. S. 2270)

1: Ameisensäure*, 2: Essigsäure, 3: Propionsäure, 4: Buttersäure, 5: Capronsäure

* Infolge Abkühlung der Säure bei Aufgabe der Säuremischung blieb der Ameisensäure-Peak im Negativen.

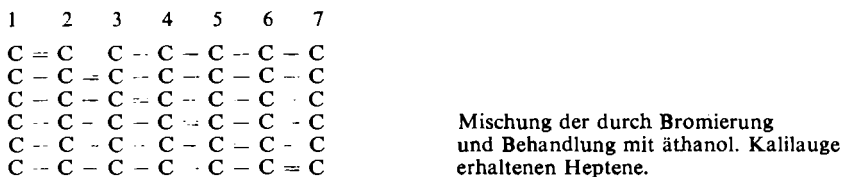
⁶⁾ W. KARRER, Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, Birkhäuser Verlag, Basel 1958, S. 173.

⁷⁾ F. LYNEN, H. EGGERER, U. HENNING und I. KESSEL, Angew. Chem. **70**, 738 [1958]; F. LYNEN, B. W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNING und E. M. MÖSLEIN, ebenda **71**, 657 [1959]; S. CHAYKIN, J. LAW, A. H. PHILLIPS, T. T. TCHEN und K. BLOCH, Proc. nat. Acad. Sci. USA **44**, 998 [1958].

mit alkoholischer Kalilauge das Gemisch der isomeren Heptene gewonnen und daraus durch Ozonisation das Gemisch der entsprechenden Fettsäuren⁸⁾. Letztere wurden gaschromatographisch in die einzelnen Komponenten zerlegt (Abbild. 1).

Der Vorgang des Heptanabbaus ergibt sich aus den Schemata 1 und 2.

Schema 1. Abbau des n-Heptans



Schema 2. Zuordnung der C-Atome des n-Heptans zu den durch Abbau gewonnenen Fettsäuren

Säure	C-Atome des n-Heptans
Ameisensäure	C ₁ C₇
Essigsäure	C ₁ , C ₂ C₆, C₇
Propionsäure	C ₁ , C ₂ , C ₃ C₅, C₆, C₇
Buttersäure	C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄ C₄, C₅, C₆, C₇
Valeriansäure	C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄ , C ₅ C₃, C₄, C₅, C₆, C₇
Capronsäure	C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄ , C ₅ , C ₆ C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇

Tab. 3. Aktivität der Fettsäuren

Säure	mg	mMol	Imp./Min. (Korr. für Leerwert und Selbstabsorpt.)	Imp./Min./ mMol
Ameisensäure	1.38	0.03	0	0
Essigsäure	28.2	0.47	310	660
Propionsäure	17.8	0.24	152	635
Buttersäure	20.3	0.23	322	1400
Valeriansäure	41.8	0.41	622	1500
Capronsäure	11.6	1.100	204	2040

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen an den einzelnen Säuren sind in Tab. 3 wiedergegeben. Aus diesen Werten ergibt sich folgendes Aktivitätsverhältnis der Säuren (pro Mol): Ameisensäure : Essigsäure : Propionsäure : Buttersäure : Valeriansäure : Capronsäure = 0 : 1 : 1 : 2 : 2 : 3. Dem entspricht die angegebene Aktivitätsverteilung im Molekül des n-Heptans. Danach bildet sich das n-Heptan in *Pinus jeffreyi* durch Kopf-Schwanz-Kondensation von Acetat-Molekülen.

Die aus dem Versuch mit Natriumacetat-[2-¹⁴C] erhaltenen Ergebnisse zeigen kein entsprechend klares Bild, da wegen Teilnahme des Acetats am Carbonsäurecyclus eine Verschmierung der Aktivität eintritt. Ähnliche Erfahrungen mit in 2-Stellung markiertem Acetat wurden auch von anderer Seite gemacht⁹⁾.

⁸⁾ F. ASINGER, Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 656 [1942].

⁹⁾ S. ARONOFF, Techniques of Radiobiochemistry, Iowa State University Press 1960, S. 91; H. GRIESEBACH, Proc. of the Fourth Internat. Congr. of Biochemistry, Bd. 2, Pergamon Press, New York 1959, S. 62.

Dem BUNDESMINISTERIUM FÜR ATOMKERNENERGIE UND WASSERWIRTSCHAFT sowie der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. Für die Überlassung von Samen und jungen Pflanzen von *Pinus jeffreyi* gilt unser Dank Herrn N. T. MIROV, Plant Physiologist, California Forest und Range Experiment Station, University of California, Berkeley und für die Aufzucht der Pflanzen Herrn Obergärtner E. MANN, Bundesforschungsanstalt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Applikation des aktiven Materials: Mevalonsäure-[2-¹⁴C] (0.1 mC, spezif. Aktivität: 2 mC/mMol), Natriumacetat-[2-¹⁴C] (1.0 mC, spezif. Aktivität: 1 mC/mMol) und Natriumacetat-[1-¹⁴C] (1.0 mC, spezif. Aktivität: 1.5 mC/mMol) wurden in Form wäßriger Lösungen etwa 40 cm hohen *Pinus jeffreyi*-Pflanzen durch angeschnittene Nadeln verabreicht. Die Lösungen waren im Verlauf von 4–5 Tagen von den Pflanzen aufgenommen. Nach dieser Zeit wurden die verschiedenen Bereiche der Pflanze auf vorhandene Aktivität geprüft und die aktiven Pflanzenteile — sowohl Nadeln wie Äste und Teile des Stammes — geerntet.

Aufbereitung des Pflanzenmaterials, Gewinnung des Heptans: Das Pflanzenmaterial wurde mit Hilfe von Trockeneis eingefroren und in gefrorenem Zustand zerkleinert. Das zerkleinerte Material besaß je Versuch ein Gewicht von ca. 80 g. Es wurde mit 100 ccm Aceton im Soxhlet erschöpfend extrahiert. Von dem Extrakt wurde das Aceton am Wasserbad zusammen mit leicht flüchtigen Extraktbestandteilen abdestilliert und der Rückstand kurze Zeit mit Wasserdampf destilliert.

Die vereinigten Destillate, die sämtliche leicht flüchtigen Harzbestandteile enthalten, wurden mit 1 ccm inaktivem Heptan und dann mit 900 ccm gesätt. Kochsalzlösung versetzt. Hierbei schied sich als obere Phase vorwiegend *n*-Heptan ab. Das rohe Produkt wurde auf dem Wasserbad destilliert. Sdp. 70–98°. Der Destillationsrückstand wurde mit 0.5 ccm Heptan versetzt, das ebenfalls abdestilliert wurde. Das so erhaltene Heptan wurde im Gaschromatographen gereinigt.

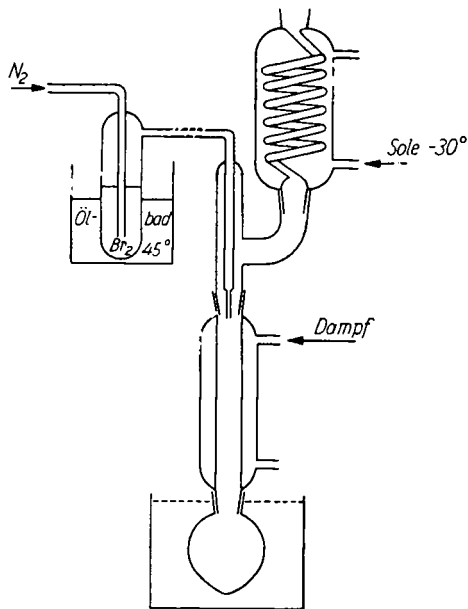
Die *gaschromatographische Reinigung des Heptans* geschah im Perkin-Elmer „Gasofract“ auf einer Sterchamol-Bienenwachs(30%)-Säule vom 2.5 cm Ø und 2.7 m Länge unter Verwendung von Helium als Trägergas bei 70° und einem Arbeitsdruck von 0.9 atü. Als hauptsächliche Verunreinigung wurde Aceton abgetrennt, das sich infolge der Aufbereitung des Pflanzenmaterials im Heptan befand. Andere außerordentlich geringe Verunreinigungen, die offenbar aus den Extraktstoffen der Pflanze stammen, wurden nicht näher identifiziert.

Das aus dem Gerät austretende Heptan wurde in einer auf –80° gekühlten Falle aufgefangen. Das so erhaltene Produkt wurde vor der weiteren Verarbeitung auf seine Aktivität geprüft.

Zur Bromierung des Heptans wurde das vorher erhaltene Produkt mit weiterem inaktivem Heptan versetzt, so daß die zur Bromierung zur Verfügung stehende Menge insgesamt 1.5 g betrug.

Auf einen in einem Ölbad befindlichen 10-ccm-Birnenkolben, der das Heptan enthielt, wurde ein Liebig-Kühler von 20 cm Mantellänge gesetzt, der durch Durchleiten von Wasserdampf auf 100° geheizt wurde. Auf dem Kühler befand sich ein Anschütz-Aufsatz, durch dessen graden Schenkel ein Kapillarrohr zum Einleiten eines Brom-Stickstoffgemisches eingeführt wurde, welches bis an die obere Grenze des Kühlermantels reichte. Der zweite Schenkel des Aufsatzes trug einen Intensiv-Kühler, der mit einer Kühlsole von –30° gekühlt wurde (Abbild. 2). Die Apparatur wurde dem Licht einer UV-Lampe ausgesetzt. Nun wurde das Heptan zum Sieden gebracht und dann die Kapillare mit einem auf 45° geheizten Brom-

vorratsgefäß verbunden, durch welches ein Stickstoffstrom von 2–3 Blasen/Sek. geleitet wurde. Die Temperatur des Ölbad es anfangs 100° wurde mit fortschreitender Bromierung



Abbild. 2. Apparatur zur Bromierung des aktiven Heptans

des Heptans und damit steigendem Siedepunkt des Sumpfes so gesteigert, daß stets ausreichend Heptan im Kopf des Liebig-Kühlers verfügbar war. Nach Erreichen einer Ölbad-Temperatur von 150° wurde die Bromierung beendet. Das erhaltene rohe Gemisch der isomeren Monobromheptane (3.28 g) wurde anschließend destilliert, Sdp. 158–170°. Ausb. 2.61 g (97% d. Th.).

Die Reinheitsprüfung des Bromheptan-Gemisches geschah gaschromatographisch unter Verwendung einer Säule Typ 0 (Perkin-Elmer) mit Helium als Trägergas bei 170° und einem Arbeitsdruck von 1.5 atü. Es konnten keine höher bromierten Produkte aufgefunden werden.

Dehydrohalogenierung: Das Gemisch der Monobromheptane wurde mit 10 ccm einer Lösung von 5.6 g KOH in 28 ccm absol. Äthanol im Einschlußrohr 5 Stdn. auf 100° erhitzt. Nach Erkalten wurde mit 1 ccm Heptan und 150 ccm Wasser versetzt. Der Zusatz von Heptan erwies sich als zweckmäßig, um die gebildeten Heptene von

Nebenprodukten besser trennen zu können. Da die Weiterverarbeitung der Heptene in Heptan als Lösungsmittel geschieht, stört der Zusatz nicht. Die nach Zusatz des Wassers sich abscheidende obere Phase wurde getrennt, über Natriumsulfat getrocknet und destilliert. Sdp. 96–98°. Das aus Heptan und Heptenen bestehende Destillat wurde ozonisiert.

Ozonisierung und Spaltung der Ozonide: Das vorstehend erhaltene Destillat wurde mit 9 ccm Heptan versetzt und bei –25° ozonisiert. Hierzu wurde 1 Stde. mit einem Gemisch von Sauerstoff und Ozon (100 mg Ozon/l) bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 50 l/Stde. behandelt. Die erhaltene Lösung der Ozonide wurde einer Aufschlämmung von 8 g Silberoxyd in 20 ccm 20-proz. Natronlauge bei 100° unter schnellem Rühren tropfenweise zugesetzt. Es wurde nun 5 Stdn. bei 100° weitergerührt. Dann wurde das Heptan abdestilliert und vom Silberoxyd filtriert. Das Filtrat wurde mit 10-proz. Schwefelsäure gegen Phenolphthalein neutralisiert und zur Trockne gedampft. Der verbleibende Rückstand, bestehend aus Natriumsulfat und den Salzen der bei der Ozonisierung gebildeten Fettsäuren, wurde mit 100 ccm absol. Äthanol ausgekocht und filtriert. Das Filtrat wurde zur Trockne gedampft. Die Ausbeute an fettsauren Salzen betrug 0.898 g (29.7% d. Th., bezogen auf eingesetztes Bromheptan).

Spaltung der fettsauren Salze: Die vorstehend erhaltenen Salze wurden mit 2 g Kaliumdihydrogenphosphat vermischt und langsam auf 250° erhitzt. Die hierbei auftretenden freien Säuren wurden in einer mit Eis/Kochsalz gekühlten Vorlage aufgefangen. Ausb. 0.687 g (97% d. Th., bezogen auf das Salzgemisch).

Die gaschromatographische Trennung der Säuren wurde an einer Sterchamol-Bienenwachs-Säule, wie bereits beschrieben, vorgenommen. Die aus dem Gaschromatographen austretenden Säuren wurden in auf –80° gekühltem Äthanol aufgefangen und durch Titration mit absol.

äthanol. n_{10} NaOH bestimmt. Das Äthanol wurde verdampft und die zurückbleibenden Säuresalze zur Bestimmung der Aktivität verwendet.

Die *Bestimmung der Aktivität* geschah in der Weise, daß die Säuresalze in 1 ccm einer 0.1-proz. Lösung von Agar-Agar aufgenommen wurden. Die Lösung wurde dann auf Stahlschalen aufgegeben, erkalten gelassen und dann unter einer Infrarot-Lampe bei gleichzeitigem Überleiten eines warmen Luftstromes vorsichtig zur Trockne gedampft. Schließlich wurden die Präparate i. Hochvak. über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Messung der Präparate erfolgte unter einem Methandurchflußzähler, Typ FH 407.

KURT ALDER†, RUDOLF HARTMANN¹⁾ und WOLFGANG ROTH

Synthesen in der Bicyclo-[1.2.2]-heptan-Reihe. Darstellung von Nortricyclen-carbonsäuren

Aus dem Chemischen Institut der Universität Köln a. Rh.

(Eingegangen am 3. Juni 1960)

Die Dien-Synthese der Tiglinsäure mit Cyclopentadien stellt einen weiteren Fall von *exo*-Addition dar. Die aus den Addukten und ihren Hydrierungsprodukten durch Reduktion mit Lithiumalanat erhaltenen Alkohole werden beschrieben. — Bei der Hydrolyse der Addukte aus halogenierten Acrylsäuren und Cyclopentadien entstehen neben einfachen Hydroxysäuren Verbindungen, die zu zwei isomeren Nortricyclen-monocarbonsäuren führen.

Im Jahre 1937 gaben K. ALDER und G. STEIN²⁾ ein Orientierungsschema an, das es gestattete, die Konfiguration der Addukte aus Dien-Synthesen vorauszusagen. Nach diesem „Prinzip der maximalen Häufung von Doppelbindungen“ erhält man bei dem Einsatz von Cyclopentadien als Dien stets die sogenannten *endo*-Addukte.

In den vergangenen Jahren veröffentlichten K. ALDER und Mitarbb.^{3–8)} Ergebnisse, die nicht im Einklang mit dieser Anschauung standen. Sie betrafen in der Hauptsache die Addition von Cyclopentadien an methyl- und halogensubstituierte Acrylsäuren. Auch von anderer Seite wurde dieses Problem in Angriff genommen^{9–12)}.

1) Dissertat. Univ. Köln 1960. 2) Angew. Chem. 50, 510 [1937].

3) K. WOLFF, Dissertat. Univ. Köln 1953.

4) L. MESTEMACHER, Diplomarb. Univ. Köln 1954.

5) R. LÜNING, Dissertat. Univ. Köln 1955.

6) K. ALDER und W. ROTH, Chem. Ber. 90, 1830 [1957].

7) K. ALDER und W. GÜNZL, Chem. Ber. 93, 809 [1960].

8) K. ALDER, R. HARTMANN und W. ROTH, Liebigs Ann. Chem. 613, 6 [1958].

9) S. BECKMANN, R. SCHABER und R. BAMBERGER, Chem. Ber. 87, 997 [1954].

10) G. KOMPPA und S. BECKMANN, Liebigs Ann. Chem. 523, 77 [1936].

11) C. S. RONDESTVEDT JR. und C. D. VER NOOY, J. Amer. chem. Soc. 77, 4878 [1955].

12) J. D. ROBERTS, E. R. TRUMBULL, W. BENNETT und R. ARMSTRONG, J. Amer. chem. Soc. 72, 3116 [1950].