

N-Salicyloyl-Asparaginsäure: Eine neue phenolische Verbindung aus Reben

von

H. STEFFAN, A. ZIEGLER und A. RAPP

N-Salicyloyl-aspartic acid: a new phenolic compound in grapevines

Summary: A new phenolic compound was detected in wild vines (*Vitis riparia* and *V. rupestris*) and some of their cross-breeding hybrids and identified as N-salicyloyl-aspartic acid. It shows no effects on *Botrytis*, but causes a slight inhibition of *Plasmopara* growth. The substance has never been found in nature hitherto.

Key words: phenol, carboxylic acid, amino acid, analysis, leaf, berry, Vitis, variety of vine, Botrytis, Plasmopara, resistance.

Einleitung

Phenolische Verbindungen sind von einer gewissen Bedeutung für die geschmackliche Beurteilung von Mosten und Weinen. Besonders für die Ausprägung der Rotweinfärbung spielen sie, sowohl als Vorläufer wie auch als Grundkörper von Farbstoffen, eine entscheidende Rolle. Wie in einer früheren Arbeit von RAPP und ZIEGLER (1973) mitgeteilt wurde, zeigen sich bei den einzelnen Rebsorten Unterschiede im Phenolmuster, was zur analytischen Sortendifferenzierung beitragen kann. Im Rahmen jener Untersuchungen fanden sich in Blättern und Beeren von Wildreben (*Vitis riparia*, *V. rupestris*) und auch in deren Kreuzungsnachkommen (z.B. Sbl. 5-24-20, Oberlin 595) in der Phenolcarbonsäurenfraktion zwei unbekannte Komponenten, die in den bisher untersuchten Europäerreben nicht nachgewiesen werden konnten.

Diese Verbindungen zeichnen sich dadurch aus, daß sie nach Besprühen mit diazotiertem p-Nitranilin durch ihre kirschrote Farbe hervortreten, während die anderen Phenole meist braune, gelbe, grüne und violette Tönungen zeigen. Lediglich p-Hydroxybenzoesäure wird noch zu einer violettroten Verbindung diazotiert.

Da Phenole nicht nur als Farb- und Geschmacksstoffe von Bedeutung sind, sondern auch mit Resistenzeigenschaften in Verbindung gebracht werden, war es von Interesse, die unbekanntesten Substanzen zu isolieren, ihre Struktur aufzuklären und die chemischen bzw. biologischen Eigenschaften kennenzulernen.

Material und Methoden

Aufarbeitung

Blätter der Wildrebenart *V. riparia* werden portionsweise in einem Gemisch von 80 % Methanol und 20 % Wasser mit einem Ultraturrax zerkleinert und zentrifugiert, die überstehende Lösung wird im Rotationsverdampfer bei 40 °C Wassertemperatur eingengt. Den Extrakt gibt man zur weiteren Reinigung und Anreicherung der unbe-

kannten Substanzen auf Polyamidsäulen (Polyamid SC-6, Macherey und Nagel). Nach Vorwaschen mit Methanol werden die Säulen mit den jeweiligen Fließmitteln equilibriert und die Proben aufgetrennt mit den Fließmitteln der Zusammensetzung Cyclohexan : Essigsäureethylester : Ethanol (60 : 30 : 4, . . . , 20 : 50 : 30).

Die Kontrolle der im Rotationsverdampfer eingegangenen Fraktion erfolgte durch zweidimensionale DC auf Mikro-Polyamidfolien F 1700, Schleicher und Schüll (Abb. 1) mit den Fließmitteln (F 1) Pentanon-2 : n-Butylformiat : Ameisensäure (4 : 15 : 1) und (F 2) Pentanon-2 : Ameisensäure : Wasser (2 : 12 : 6).

Diese Solventien werden auch zur weiteren säulenchromatographischen Abtrennung der unbekannt Substanzen verwendet. Für die HPLC-Endreinigung werden Lichrospher C-8- und Si-60-Säulen von Merck benutzt.

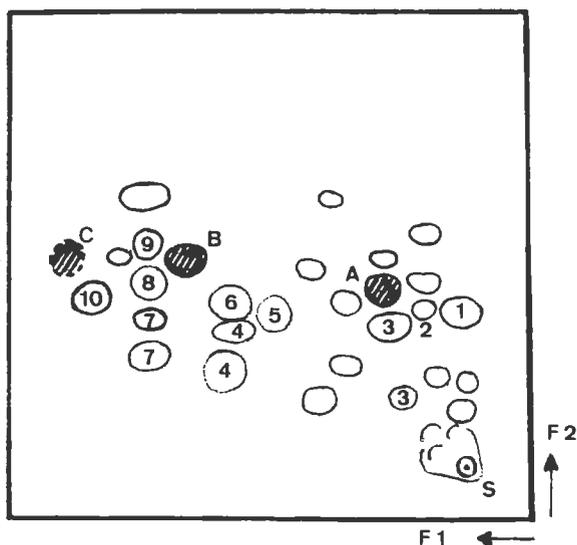


Abb. 1: Chromatogramm der Phenolcarbonsäurenfraktion auf DC-Mikro-Polyamidfolien F 1700 7,5 × 7,5 (Schleicher und Schüll); die schraffierten Spots A, B, C sind die nach Besprühen mit diazotiertem p-Nitranilin rot gefärbten Verbindungen. — 1 = Gallussäure, 2 = Protocatechusäure, 3 = Kaffeesäure, 4 = p-Cumarsäure, 5 = Gentisinsäure, 6 = p-Hydroxibenzoesäure, 7 = Ferulasäure, 8 = Vanillinsäure, 9 = Syringasäure, 10 = Salicylsäure.

TL chromatogram of the phenolic acid fraction on TLC micropolyamid plates F 1700 7.5 × 7.5 (Schleicher und Schüll); the shaded spots A, B, C are the substances coloured red by spraying with diazotated p-nitranilin. — For explanation of spot numbers see above.

Identifizierung

Zur Strukturauflklärung wurden ein Finnigan Massenspektrometer und ein Kernresonanzspektrometer der Firma Bruker verwendet. Als Vergleich dienten synthetisch gewonnene Referenzproben.

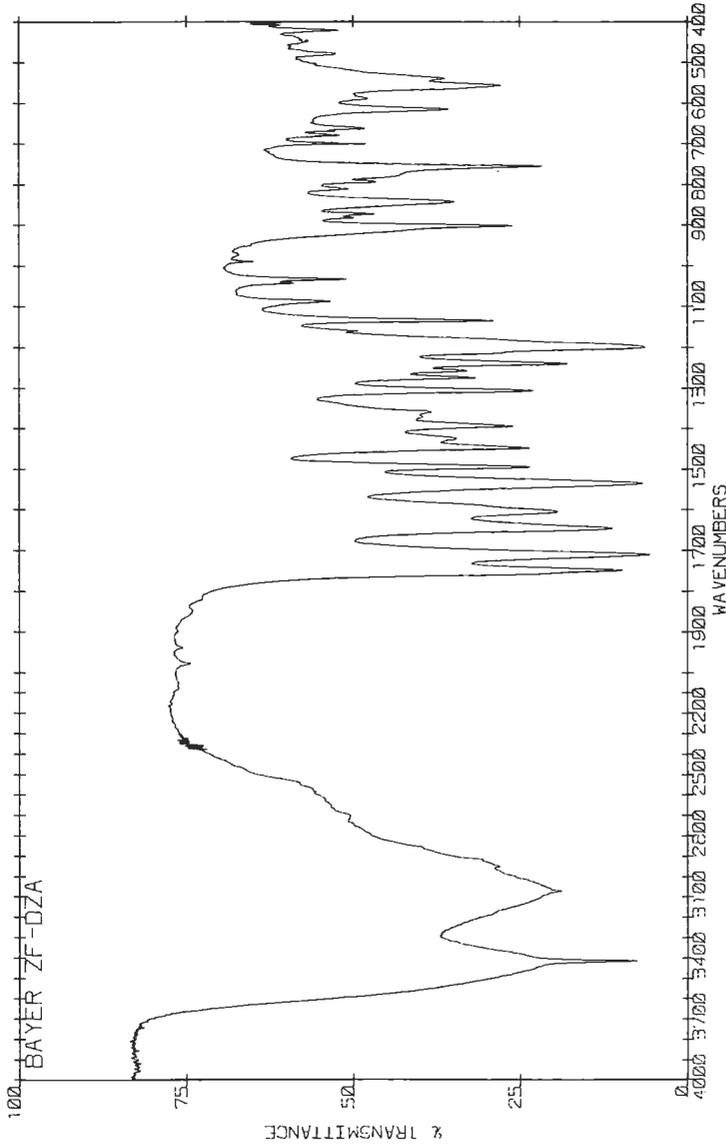


Abb. 2: Infrarotspektrum der synthetisierten N-Salicyloyl-Asparaginsäure (Substanz A).

Infrared spectrum of the synthetic N-salicyloyl-aspartic-acid (compound A).

Herstellung der Referenzproben

Acetyliertes Salicylsäurechlorid wird nach MAZOTTA *et al.* (1975) mit Asparaginsäurephenylester umgesetzt, anschließend wird durch Verseifung die N-Salicyloyl-Asparaginsäure (NSA) gewonnen und säulenchromatographisch gereinigt.

NSA ($C_{11}H_{11}NO_6$) kristallisiert in weißen Nadeln, hat einen Schmelzpunkt von 172–173 °C und zeigt im UV-Spektrum zwei Absorptionsmaxima bei 238 und 305 nm. Das IR-Spektrum ist in Abb. 2 dargestellt.

Blattscheibentest

Ausgestanzte Blattscheiben (\varnothing 1 cm) werden in einer feuchten Kammer auf Filterkarton ausgelegt, mit NSA-Lösung in abgestuften Konzentrationen und der jeweiligen Pilzsporensuspension besprüht und inkubiert.

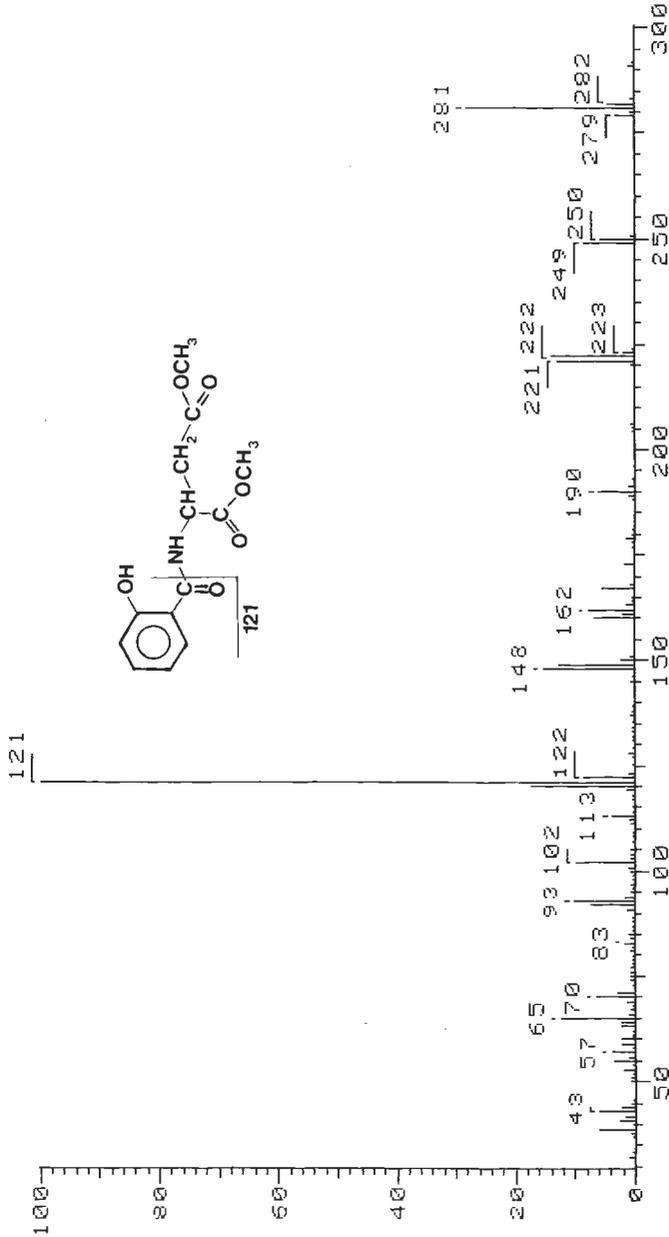


Abb. 3: Massenspektrum des Dimethylesters von N-Salicyloyl-Asparaginsäure (DC-Spot C).

Mass spectrum of N-salicyloyl-aspartic acid-dimethyl ester (TLC spot C).

Ergebnisse und Diskussion

Im Verlauf der Aufarbeitung fand sich außer den beiden eingangs erwähnten Flecken noch ein dritter rotgefärbter Spot im Dünnschichtchromatogramm (DC-Spot C, Abb. 1). Die Analyse dieser Substanz ergab im Massenspektrum (Abb. 3) einen Basispeak der Masse 121 (o-Hydroxy-Phenolcarbonsäurerest). Der Molpeak 281 wies

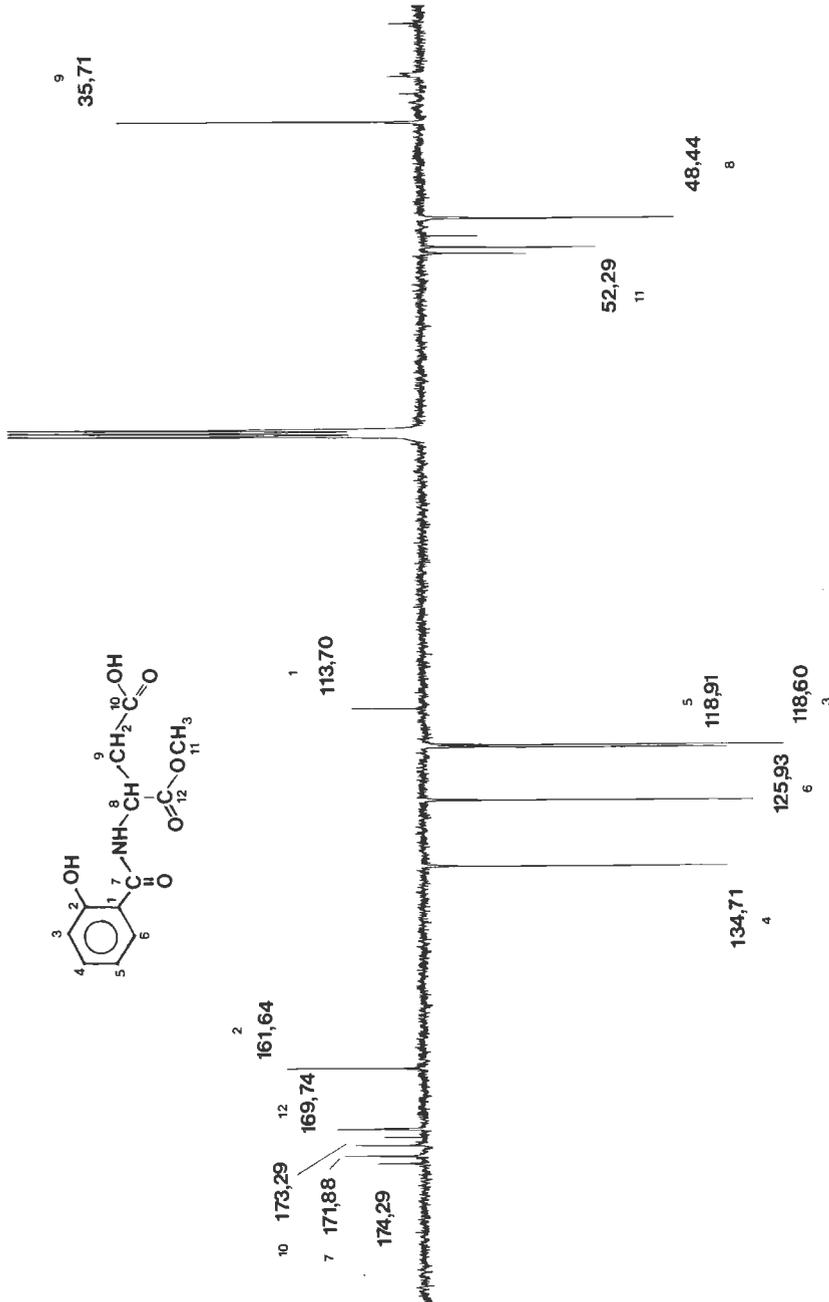


Abb. 4: ^{13}C -NMR-Spektrum des Monomethylesters von N-Salicyloyl-Asparaginsäure (DC-Spot B).

^{13}C NMR spectrum of N-salicyloyl-aspartic acid-monomethylester (TLC spot B).

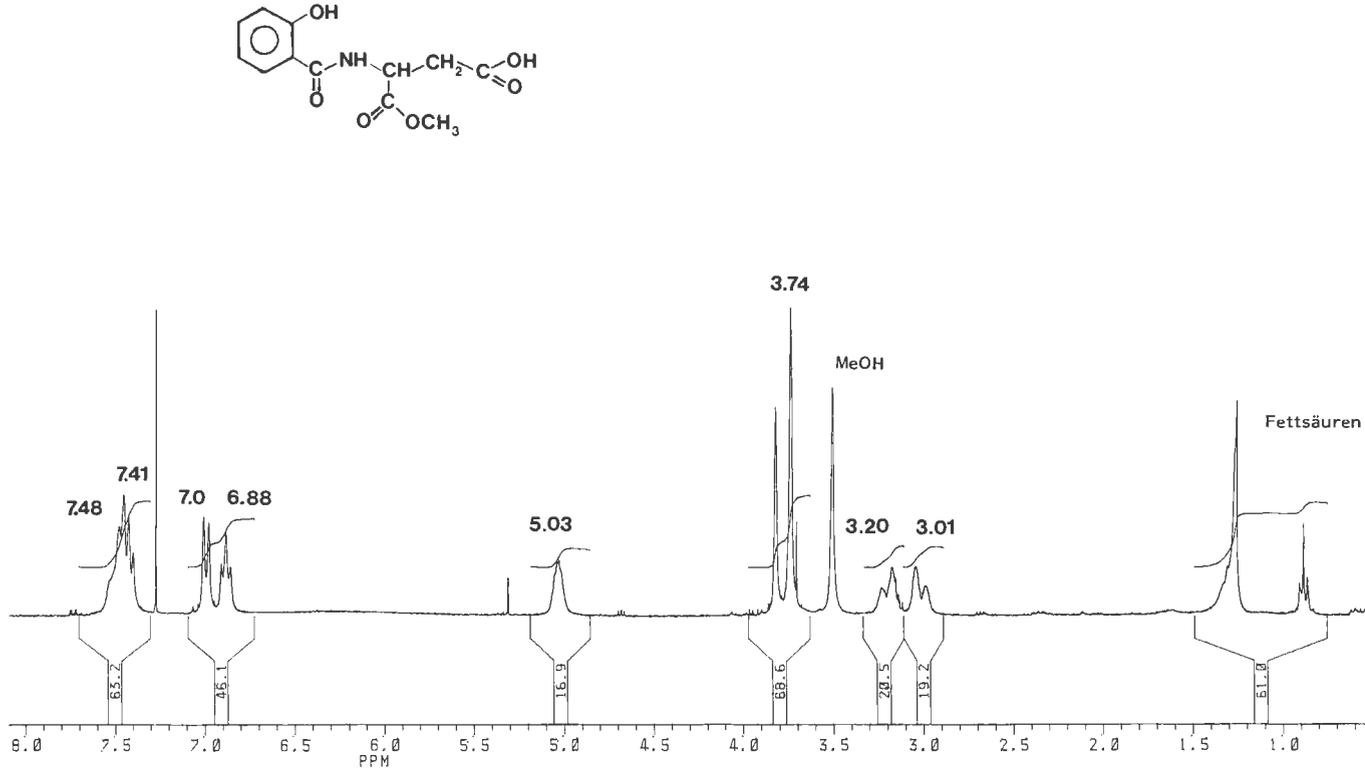


Abb. 5: Protonen-NMR-Spektrum des Monomethylesters von N-Salicyloyl-Asparaginsäure (DC-Spot B).

¹H NMR spectrum of N-salicyloyl-aspartic-acid-monomethylester (TLC spot B).

auf N-Salicyloyl-Asparaginsäuredimethylester hin. Durch Kernresonanzspektrometrie konnte das Ergebnis bestätigt werden.

Abb. 4 und 5 zeigen das ^{13}C - und Protonen-NMR-Spektrum der Substanz B. Die CH_3O -Gruppe bei 52,29 ppm und der freie Carbonsäurerest (173,29 ppm) sowie die Ring-C-Atome 3, 4, 5 und 6 der Salicylsäure bei 118,6, 134,7, 118,9 und 125,9 ppm belegen das Vorhandensein des N-Salicyloyl-Asparaginsäuremonomethylesters.

Bei Verbindung A handelt es sich um die freie Säure, wie durch die Synthese der Referenzverbindung bewiesen werden konnte (NMR-Vergleichsspektrum und DC). In einer Aufarbeitung von Rebenblättern ohne Methanolzusatz fand sich lediglich die freie Säure (NSA), so daß Mono- und Dimethylester als Artefakte anzusehen sind, die beim Aufarbeiten mit 80 % Methanol entstehen. Mit der synthetisierten reinen Substanz war nachzuweisen, daß NSA sehr leicht Ester bildet. Bei der chromatographischen Auftrennung des NSA-Monoethylesters konnten in den Fließmitteln Essigsäurebutylester : Eisessig (18 : 2) und Hexan : Ameisensäureethylester : Methanol (10 : 8 : 2) jeweils zwei eng beieinander liegende Spots beobachtet werden. Es dürfte sich hierbei um die beiden unterschiedlichen Monoester handeln, die einmal durch Veresterung der endständigen Carboxylgruppe (C-10), zum anderen durch Reaktion der Carboxylgruppe C-12 entstanden.

NSA wurde bisher in der Natur nicht aufgefunden. Die Substanz ist lediglich als Syntheseprodukt bekannt. Neben anderen Salicyloyl-Aminosäuren ist sie für pharmakologische Zwecke hergestellt worden (MAZOTTA *et al.* 1975).

Bei ersten biologischen Untersuchungen zeigte NSA im Blattscheibentest keine fungizide Wirkung gegenüber *Botrytis cinerea*; dagegen wird das Wachstum von *Plasmopara viticola* gehemmt.

Ein ähnliches Peptid (N-p-Hydroxybenzol-5-Hydroxyanthranilat) isolierten WOO und CHOI (1987) aus *Melandrium firmum* (Caryophyllaceae) und nannten es Melandrin. PONCHET *et al.* (1984) fanden in einer Species der gleichen Familie, *Dianthus caryophyllus*, zwei Verbindungen, die sie Dianthramid A und B benannten und als N-Salicyloyl-4-Methoxyanthranilsäure und N-Salicyloyl-4-Hydroxyanthranilsäuremethylester identifizierten. Nach unseren Erfahrungen erlauben wir uns die Bemerkung, daß der Methylester eventuell erst bei der Aufarbeitung entstanden sein könnte. Diesen Verbindungen wird eine den Phytoalexinen analoge Wirkung zugeschrieben, da sie nach Infektion mit *Phytophthora parasitica* verstärkt gebildet werden. Daß Phenolcarbonsäureamide, insbesondere aromatische Amide, einen antiviralen Effekt zeigen, berichten MARTIN-TANGUY *et al.* (1978). Somit scheint diese Gruppe von Verbindungen bei Resistenzreaktionen eine Rolle zu spielen.

Von *Azotobacter vinelandii* ist die Verbindung N,N'-bis-(2,3-Dihydroxybenzoyl)-2-Lysin („Azotochelin“) bekannt, für die eine siderophore Wirkung beim Eisenstoffwechsel nachgewiesen wurde (KNOSP *et al.* 1984; PAGE und HUYER 1984).

Es ist zu erwarten, daß noch weitere peptidisch gebundene Phenolcarbonsäurederivate existieren. Die Untersuchungen darüber werden weitergeführt.

Zusammenfassung

In Wildreben (*Vitis riparia* und *V. rupestris*) und einigen ihrer Kreuzungsnachkommen wurde ein neuer Naturstoff entdeckt und als N-Salicyloyl-Asparaginsäure [N-(o-Hydroxybenzoyl)-Asparaginsäure] identifiziert. Die Substanz zeigt im Blattscheibentest keine Wirkung auf *Botrytis cinerea*, bewirkt jedoch eine leichte Hemmung des Wachstums von *Plasmopara viticola*.

Wir bedanken uns bei Herrn Dr. VOGELER und Frau Dr. BRAUNER (Bayer AG), Herrn DVORČAK (Bruker AG) für die Erstellung der Spektren, ebenso bei Herrn Dr. KUNZELMANN (Universität Heidelberg) für die anfänglichen Strukturuntersuchungen. Herrn Dr. JÄGER (Bayer AG) sei gedankt für die Prüfung der Wirksamkeit von NSA auf verschiedene Schadpilze. Frau H. BENNEK sagen wir Dank für ihre technische Mithilfe und Herrn Prof. MAZOTTA für die freundliche Überlassung von synthetisierter NSA.

Literatur

1. KNOSP, O.; TIGERSTROM, M. VON; PAGE, W. J.; 1984: Siderophore mediated uptake of iron in *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. **159**, 496—502.
2. MARTIN-TANGUY, J.; CABANNE, F.; PEDRIZET, E.; MARTIN, C.; 1978: The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. Phytochemistry **17**, 1927—1928.
3. MAZOTTA, D.; GIORI, P.; GUANERI, M.; BENASSI, C. A.; 1975: Esteri ed ammidi di salicilolamminocidi. Il Farmaco (Ed. Sci.) **30**, 399—407. [Abstr.: Chem. Abstr. **83**, 547.]
4. PAGE, W. J.; HUYER, M.; 1984: The repression of the *Azotobacter vinelandii* siderophore system using iron containing minerals to limit iron repletion. J. Bacteriol. **158**, 496—502.
5. PONCHET, M.; MARTIN-TANGUY, J.; MARAIS, A.; MARTIN, C.; 1982: Hydroxycinnamoyl acid amides and aromatic amines in the inflorescences of some Araceae species. Phytochemistry **21**, 2865—2869.
6. — — ; — — ; — — ; POUPEL, A.; 1984: Dianthramides A and B, two N-benzoylanthranilic acid derivatives from elicited tissues of *Dianthus caryophyllus*. Phytochemistry **23**, 1901—1903.
7. RAPP, A.; ZIEGLER, A.; 1973: Bestimmung der Phenolcarbonsäuren (Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyzimtsäuren) in Rebblättern, Weintrauben und Wein mittels Mikro-Polyamid-Dünnschichtchromatographie. Vitis **12**, 226—236.
8. WOO, W. S.; CHOI, J. S.; 1987: A phenolic amide and other constituents of *Melandrium firmum*. Phytochemistry **26**, 2099—2100.

Eingegangen am 18. 3. 1988

Dr. H. STEFFAN
Prof. Dr. A. RAPP
BFA für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
D 6741 Siebeldingen