

K. Stolle und D. Gröger

Untersuchungen zur Biosynthese des Harmins*)

Aus dem Institut für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie der Wissenschaften,
Halle/Saale

(Eingegangen am 27. November 1967)

Mit Hilfe markierter Vorstufen wurde die Biosynthese des Harmins (I) in *Peganum harmala* untersucht. Durch Fütterung von Tryptophan- $(\beta\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N})$ konnte gezeigt werden, daß die Seitenkette mit Ausnahme der Carboxylgruppe spezifisch in das β -Carbolin-System eingebaut wird. Das gleiche Ergebnis wurde mit Tryptamin- $(\beta\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N})$ erzielt. Nach Fütterung von Methionin- $(\text{Methyl-}^{14}\text{C})$ waren 80% der Radioaktivität in der Methoxylgruppe lokalisiert. Zur Klärung der Herkunft des C_2 -Körpers der β -Carboline (C-1 und C-10 des Harmins) haben wir Acetat-1- ^{14}C , Acetat-2- ^{14}C , Pyruvat-2- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C appliziert. Pyruvat wird weitgehend spezifisch eingebaut (Pyruvat-2- $^{14}\text{C} \rightarrow$ C-1 vom Harmin; Pyruvat-3- $^{14}\text{C} \rightarrow$ C-10 vom Harmin). Bei den Acetat-Versuchen ließ sich eine starke Verschmierung der Radioaktivität beobachten. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure ist keine Zwischenstufe bei der Harmin-Biosynthese.

The biosynthesis of harmine in *Peganum harmala* has been studied using labelled compounds. With the exception of the carboxyl group the carbon atoms and the nitrogen atom of the alanine side chain are incorporated into harmine from tryptophan. Tryptamine- $(\beta\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N})$ is practically an equally good precursor as tryptophan- $(\beta\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N})$. In order to clarify the origin of the C_2 -unit of the β -carbolines (C-1 and C-10 of harmine) acetate-1- ^{14}C , acetate-2- ^{14}C , pyruvate-2- ^{14}C and pyruvate-3- ^{14}C were administered to young plants of *P. harmala*. A specific incorporation was observed after feeding pyruvate-2- ^{14}C into C-1 of harmine and pyruvate-3- ^{14}C into C-10 of harmine. An unspecific labelling pattern was observed after feeding of acetate- ^{14}C . 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid is no intermediate in the harmine-biosynthesis.

Einfache β -Carbolin-Derivate vom Typ des Harmans sind bisher in etwa 11 Pflanzenfamilien, u. a. in Chenopodiaceen, Euphorbiaceen, Leguminosae, Malpighiaceen, Passifloraceen, Rubiaceen und Zygophyllaceen, nachgewiesen worden. Die meisten Alkaloide besitzen in 1-Stellung eine Methylgruppe. Ausnahmen sind das N_β -Methyltetrahydro- β -carbolin aus der Chenopodiacee *Arthrophyllum leptocarpum*.

*) Herrn Professor Dr. Drs. h. c. K. Mothes danken wir sehr herzlich für die großzügige Förderung dieser Untersuchungen.

cladum¹⁾, sowie das Plectocomin (II), welches *Kiang et al.*²⁾ in den Früchten von *Plectocomiopsis geminiflorus* (Palmae) aufgefunden haben. Plectocomin ist wohl das erste β -Carboline-Alkaloid der Monocotylen. Die einzelnen tricyclischen Basen unterscheiden sich u. a. im Oxydationsgrad des Pyridin-Ringes. Neben den völlig aromatischen β -Carbolinen existieren Dihydro- und Tetrahydro- β -carboline-Alkaloide. Überraschenderweise kommen die drei Formen selten in der gleichen Pflanzengattung nebeneinander vor. Offenbar ist dies nur bei *Banisteria caapi* (Malpighiaceen) der Fall, wo Harmin (I), Dihydroharmin = Harmalin und Tetrahydroharmin vergesellschaftet sind³⁾.

In einer Reihe von Gattungen aus verschiedenen Familien (Chenopodiaceen, Eleagnaceen, Leguminosen, Rubiaceen) sind nur Tetrahydro- β -carboline bekannt geworden, besonders bei der Gattung *Eleagnus*, wo Tetrahydroharman = Eleagnin, Tetrahydroharmol und N_b -Methyltetrahydroharmol vorkommen.

Das einzige optisch aktive Alkaloid dieser Klasse ist das (+)-1,2,3,4-Tetrahydroharmin, dessen absolute Konfiguration von *Koblicova und Trojanek*⁴⁾ ermittelt wurde. Diese ist identisch mit der des (+)-1,2,3,4-Tetrahydroharmans. In beiden Fällen befindet sich die Methylgruppe am C-1 in α -Stellung. Das Vorkommen und die Analytik der β -Carboline im Pflanzenreich sind ausführlich von *Borkowski*⁵⁾ dargestellt worden. Über das Gesamtgebiet der Carboline informiert die Übersicht von *Abramovitch und Spenser*⁶⁾.

Die am längsten bekannten Harman-Basen sind das Harmalol und das Harmin (I), die von *Goebel*⁷⁾ und *Fritzsch*⁷⁾ im Samen der Steppenraute (*Peganum harmala*) aufgefunden wurden. Die Konstitution dieser Basen ist im wesentlichen den Arbeiten von *Perkin und Robinson*⁸⁾ zu verdanken, die auch den Namen Carbolin für das tricyclische Ringsystem eingeführt haben. Bei der Aufstellung der richtigen Strukturformeln der Harman-Basen haben biogenetische Überlegungen — erstmals in der Geschichte der Alkaloid-Chemie — eine entscheidende Rolle gespielt. Von den gleichen Autoren ist auch das erste Biogenese-Schema für Harmane aufgestellt worden (Schema 1). Es soll zuerst ein Tryptamin-Derivat (III) mit Acetaldehyd (IV) unter Bildung einer Tetrahydroverbindung (V) reagieren. Stufenweise Oxydation ergibt Harmalin (VI) und schließlich Harmin (I). Die Synthese der β -Carboline, ausgehend von zellmöglichen Vorstufen unter zellmöglichen Bedingungen, ist später beschrieben worden. Bei einem pH zwischen 5 und 6 und 25° kondensieren Tryptamin und Acetaldehyd zum Tetrahydroharman^{10) 11)}. *Hahn* und Mitarb.^{12) 13)} zeig-

1) T. F. Platanowa, A. D. Kusowkow und P. S. Massagetow, J. allg. Chemie (UdSSR) 28, 3128 (1958).

2) A. K. Kiang, K. C. Chan und W. I. Taylor, Lloydia 30, 189 (1967).

3) B. Borkowski, Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol. Nr. 4, 349 (1963).

4) Z. Koblicová und J. Trojanek, Chem. and Ind. 1966, 1342.

5) R. A. Abramovitch und J. D. Spenser, Advances in Heterocyclic Chemistry, Vol. 3, 79 (1964).

6) F. Goebel, Annalen Chem. Pharmaz. 38, 363 (1841).

7) J. Fritzsch, Annalen Chem. Pharmaz. 64, 365 (1847).

8) W. H. Perkin jr. und R. Robinson, J. chem. Soc. (London) 1919, 933.

9) W. H. Perkin jr. und R. Robinson, J. chem. Soc. (London) 1919, 967.

10) G. Hahn und H. Ludewig, Ber. dtsh. chem. Ges. 67, 203 (1934).

11) C. Schöpf und H. Bayerte, Liebigs Ann. Chem. 513, 190 (1934).

12) G. Hahn, L. Bärwald, O. Schales und H. Werner, Liebigs Ann. Chem. 520, 107 (1935).

13) G. Hahn und A. Hansel, Ber. dtsh. chem. Ges. 71, 2192 (1938).

ten darüber hinaus, daß Tryptamin unter physiologischen Bedingungen auch mit Ketsäuren, deren Carbonylgruppe enolisierbar ist, leicht reagiert, so mit Brenztraubensäure unter Bildung der entsprechenden 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-1-carbonsäure.

Die Physiologie der Harman-Derivate in *Peganum harmala* ist von Gröger¹⁴⁾ untersucht worden. Den Einbau von Tryptophan- β -¹⁴C in Harman-Alkaloide beobachteten erstmalig Gröger und Simon¹⁵⁾. Nach Applikation von Tryptophan- β -¹⁴C an sterile Wurzelkulturen von *Peganum harmala* konnten radioaktives Harmin, Harmalin und Harmalol isoliert werden. Damit war bewiesen, daß die Wurzeln der Steppenraute zur Alkaloidsynthese fähig sind*), Kürzlich berichteten O'Donovan und Kenneally¹⁶⁾ über den spezifischen Einbau von Tryptophan und Acetat in Tetrahydroharman in *Eleagnus angustifolia*. Im folgenden soll über weitere Untersuchungen zur Biosynthese des Hauptalkaloids der Steppenraute, des Harmins, berichtet werden.

Die radioaktiven Vorstufen haben wir über die Wurzeln an intakte Pflanzen von *Peganum harmala* appliziert und zur Aufarbeitung nur die Wurzeln herangezogen. Bekanntlich¹⁴⁾ ist der Gehalt an β -Carbolin-Alkaloiden im Sproß dieser Zygophyllacee wesentlich geringer als im unterirdischen Organ. Außerdem finden sich im Sproß noch Alkaloide eines anderen Typs (Chinazoline).

Zur Klärung der Herkunft des pyr-N-Atoms von (I) haben wir doppelt markiertes Tryptophan eingesetzt und die ¹⁵N/¹⁴C-Rate im markierten Harmin bestimmt (Tab. 1). Das ¹⁵N : ¹⁴C-Verhältnis beträgt praktisch 1. Daraus geht hervor, daß die Alanin-Seitenkette des Tryptophans mit Ausnahme der Carboxylgruppe spezifisch in das β -Carbolin-System inkorporiert wird. Kürzlich ist auch von irischen Autoren¹⁶⁾ gezeigt worden, daß Tryptophan- α -¹⁴C spezifisch in Eleagnin = Tetrahydroharman eingebaut wird. Nach Abbau des Alkaloids unter Anwendung der von Leete¹⁷⁾ entwickelten Methode ließ sich praktisch die gesamte Radioaktivität im C-3 des Eleagnins nachweisen. Um die Syntheseaktivität von *Peganum*-Pflanzen in verschiedenen Stadien der Entwicklung zu untersuchen, wurde Tryptophan an zwei Monate und sechs Monate alte Pflanzen appliziert. Die jungen Pflanzen (Tab. 1) zeigten die höhere spezifische Einbaurate. In einem weiteren Versuch sollte die Rolle des Tryptamins bei der Biosynthese der β -Carboline geprüft werden. Bei in-vitro-Versuchen hat es sich gezeigt¹⁰⁾, daß Tryptamin unter zellmöglichen Bedingungen sich glatt mit Acetaldehyd zum entsprechenden Tetrahydro- β -carbolin umsetzen läßt. Nach Fütterung von Tryptamin (β -¹⁴C-¹⁵N) an *P. harmala* (Tab. 1) konnte markiertes Harmin isoliert werden. Das ¹⁵N : ¹⁴C-Verhältnis beträgt auch

*) Einen Einbau von Tryptophan- β -¹⁴C und Pyruvat-3-¹⁴C in Harmin nach Applikation der Vorstufen über die Wurzeln intakter Pflanzen von *Zygophyllum coccineum* konnten Liebisch et al. (15a) nachweisen.

¹⁴⁾ D. Gröger, *Planta medica* 7, 461 (1959).

¹⁵⁾ D. Gröger und H. Simon, *Abh. dtsh. Akad. Wiss., Kl. Chem. Geol. Biol.* Nr. 4, 343 (1963).

¹⁶⁾ a) H. W. Liebisch, A. F. Shalaby und H. R. Schütte (1966), unveröffentlicht.

¹⁶⁾ D. G. O'Donovan und M. F. Kenneally, *J. chem. Soc. (London)* 1967, 1109.

¹⁷⁾ E. Leete, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 6338 (1960); *Tetrahedron (London)* 14, 35 (1961).

hier praktisch 1, so daß ein spezifischer Einbau der Seitenkette des Tryptamins erfolgt sein muß. Vergleicht man die spezifischen Einbauraten von Tryptophan und Tryptamin (Tab. 1, Versuche B), so zeigt es sich, daß die Aminosäure etwas besser verwertet wird als das entsprechende Amin. Ob in vivo zuerst Tryptophan zum Tryptamin decarboxyliert wird und dann die Umsetzung mit dem C₂-Körper erfolgt, läßt sich auf Grund eines Versuches noch nicht entscheiden. Konkurrenz-Versuche Tryptophan/Tryptamin könnten hier vielleicht weiterführen. Der Einbau von Tryptamin in Indolalkaloide, bei denen das zweite N-Atom von der β -Stellung des Indols durch zwei C-Atome getrennt ist, ist bisher wenig untersucht. Im Falle des Psilocybins, eines einfachen Indolalkylamin-Derivates, konnten Agurell et al.¹⁸⁾ zeigen, daß Tryptamin eine bessere Vorstufe als Tryptophan ist. Bei den Ergolin-Alkaloiden konnte kein Einbau¹⁹⁾ von Tryptamin beobachtet werden. Offenbar sind hier Decarboxylierung der Aminosäure und Ringschluß (Bildung des Ringes C) synchron verlaufende Prozesse.

Tabelle 1

Der Einbau von Tryptophan- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}]$, Tryptamin- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}]$ und 1,2,3,4-Tetrahydroharman-carbonsäure(3)- $[4\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}]$ in Harmin. Fütterungsdauer: 5 Tage

Alter der Peganumpflanzen: A = 6 Monate; B = 2 $\frac{1}{2}$ Monate

Applizierte Substanz	Isoliert aus Wurzeln (g)	^{15}N -Überschuß im Harmin(%)	Spez. Aktivität (Ipm/mMol)	Spez. Einbaurate (%) ^{14}C	Spez. Einbaurate (%) ^{15}N
A Tryptophan- $\beta\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ (spez. Akt. $2,49 \cdot 10^9$ Ipm/mMol- ^{15}N 52%) 8,2 mg	1,8 Harmin (15 mg)	0,508	$5,66 \cdot 10^6$	0,23	0,27
B Tryptamin- $\beta\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ (spez. Akt. $1,59 \cdot 10^8$ Ipm/mMol- ^{15}N 52%) 5,7 mg	0,7 Harmin (8,5 mg)	0,604	$6,36 \cdot 10^5$	0,4	0,45
B Tryptophan- $\beta\text{-}^{14}\text{C}$ (spez. Akt. $4,08 \cdot 10^8$ Ipm/mMol) 15 mg	0,5 Harmin (5,7 mg)	—	$1,96 \cdot 10^6$	0,48	—
B 1,2,3,4-Tetrahydroharman-carbonsäure-(3)- $[4\text{-}^{14}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}]$ (spez. Akt. $1,34 \cdot 10^8$ Ipm/mMol- ^{15}N 52%) 14 mg	0,6 Harmin (5 mg)	—	inaktiv	—	—

¹⁸⁾ S. Agurell, S. Blomkvist und P. Catalfomo, Acta Pharmac. Suecica 3, 37 (1966).

¹⁹⁾ H. G. Floß und D. Gröger, Z. Naturforschg. 18b, 519 (1963).

Der Mechanismus der Biosynthese der großen Zahl von Indolalkaloiden, an deren Aufbau ein cyclopentanoides Monoterpen beteiligt ist, ist noch ungeklärt. Fütterungsversuche mit Tryptamin sind noch nicht durchgeführt worden.

Eine Reihe von Harman-Alkaloiden sind am aromatischen Ring hydroxyliert bzw. tragen eine Methoxylgruppe. Auf welcher Stufe die Einführung der OH-Gruppe erfolgt, ist bisher nicht untersucht. Durch Fütterungsversuche mit Methionin (Methyl- ^{14}C) ließ sich beim Harmin (Tab. 2 und 3) zeigen, daß die CH_3 -Gruppe vom Methionin stammen kann. Nach Fütterung dieser Aminosäure waren 80% der Radioaktivität in der OCH_3 -Gruppe lokalisiert.

Tabelle 2

Der Einbau von Pyruvat-[2- ^{14}C], Pyruvat-[3- ^{14}C], Acetat-[1- ^{14}C], Acetat-[2- ^{14}C] und Methionin-[^{14}C] Methyl in Harmin.

Fütterungsdauer: 2 Tage. — Alter der Pflanzen: $3\frac{1}{2}$ — $5\frac{1}{2}$ Monate

Applizierte Substanz	Isoliert aus Wurzeln (g)	Alkaloid (mg)	Spez. Akt. (Ipm/mMol)	Spezifische Einbaurrate %
Pyruvat-[2- ^{14}C] (spez. Akt. $1 \cdot 10^6$ Ipm/mMol) 10,2 mg	0,42 Harmin	7,8	$2,69 \cdot 10^6$	0,27
Pyruvat-[3- ^{14}C] (spez. Akt. $5 \cdot 10^6$ Ipm/mMol) 19,5 mg	0,49 Harmin	8,9	$1,30 \cdot 10^6$	0,26
Na-Acetat-[1- ^{14}C] (spez. Akt. $1,54 \cdot 10^9$ Ipm/mMol) 11 mg	0,65 Harmin	9,0	$2,25 \cdot 10^6$	0,15
Na-Acetat-[2- ^{14}C] (spez. Akt. $1,2 \cdot 10^9$ Ipm/mMol) 11 mg	0,65 Harmin	9,5	$1,04 \cdot 10^7$	0,9
Methionin- ^{14}C -Methyl (spez. Akt. $5,5 \cdot 10^6$ Ipm/mMol) 14 mg	2,0 Harmin	30,5	$5,22 \cdot 10^6$	0,95

Tabelle 3

Abbauresultate von Harmin nach Applikation von Pyruvat-[2- ^{14}C], Pyruvat-[3- ^{14}C], Acetat-[1- ^{14}C], Acetat-[2- ^{14}C] und Methionin-[^{14}C -Methyl]

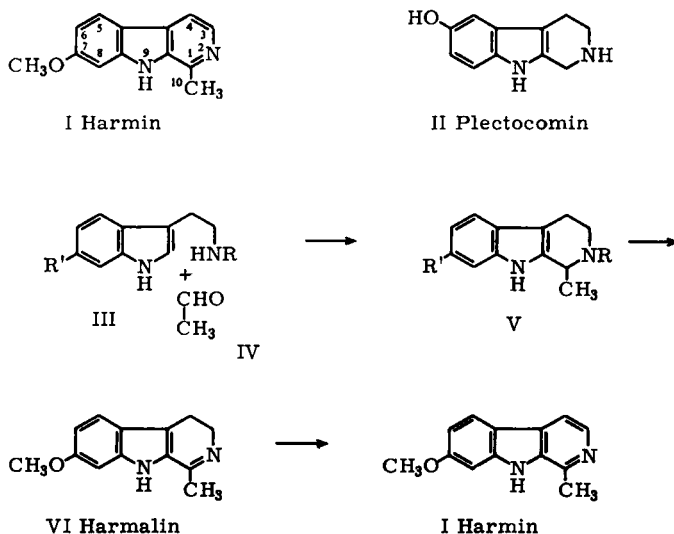
Appliziert	Substanz	C-Atom	Spez. Aktiv. (Ipm/mMol)	% der spez. Aktivität des Harmins
Pyruvat-[2- ^{14}C]	Harmin	—	$2,12 \cdot 10^5$	100
	Essigsäure	1, 10	$9,60 \cdot 10^4$	45,3
	BaCO_3	1	$8,30 \cdot 10^4$	39,2
	CH_3NH_2 · Pikrat	10	$6,73 \cdot 10^3$	3,2

Fortsetzung von Tabelle 3

Appliziert	Substanz	C-Atom	Spez. Aktiv. (Ipm/mMol)	% der spez. Aktivität des Harmins
Pyruvat-[3- ¹⁴ C]	Harmin	—	$5,83 \cdot 10^4$	100
	Essigsäure	1, 10	$2,44 \cdot 10^4$	42
	BaCO ₃	1	$5,00 \cdot 10^3$	8,6
	CH ₃ NH ₂ · Pikrat	10	$1,85 \cdot 10^4$	31,7
Na-Acetat-[1- ¹⁴ C]	Harmin	—	$4,66 \cdot 10^5$	100
	Essigsäure	1, 10	$3,12 \cdot 10^4$	7
	BaCO ₃	1	$2,57 \cdot 10^4$	5,5
	CH ₃ NH ₂ · Pikrat	10	fast inaktiv	—
Na-Acetat-[2- ¹⁴ C]	Harmin	—	$6,78 \cdot 10^5$	100
	Essigsäure	1, 10	$2,64 \cdot 10^5$	39
	BaCO ₃	1	$9,30 \cdot 10^4$	13,7
	CH ₃ NH ₂ · Pikrat	10	$1,30 \cdot 10^5$	19,2
Methionin- ¹⁴ C-Methyl	Harmin	—	$1,39 \cdot 10^6$	100
	Triäthyl-methyl- ammoniumjodid	11	$1,10 \cdot 10^6$	80

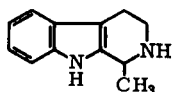
Über die Herkunft der restlichen 2 C-Atome, die am Aufbau der 1-Methyl- β -carboline beteiligt sind, lagen bislang keine Ergebnisse vor. Während der Durchführung unserer Untersuchungen erschien die Arbeit von *O' Donovan und Kenneally*¹⁶⁾. Sie haben Acetat-1-¹⁴C an Sprosse von *E. angustifolia* appliziert. Die spezifische Einbaurate in Eleagnin (VII) bei 23tägiger Fütterung betrug 0,003 %. Durch Kuhn-Roth-Oxydation von VII und nachfolgendem Schmidt-Abbau der erhaltenen Essigsäure konnten sie zeigen, daß praktisch die gesamte Radioaktivität im C-1 lokalisiert war. Somit kann beim Tetrahydroharman = VII Acetat als eine Vorstufe des C₂-Körpers angesehen werden. Unsere eigenen Versuche wurden zuerst mit Pyruvat-2-¹⁴C und Pyruvat-3-¹⁴C durchgeführt. Trotz der verhältnismäßig kurzen Applikationsdauer (2 Tage) waren etwa 55—60 % der Radioaktivität im Tryptamin-Teil des Harmins lokalisiert (Tab. 3). Die restlichen 40—45 % der Radioaktivität konnten im C-1 und C-10 wiedergefunden werden und waren hier weitgehend spezifisch inkorporiert. Setzt man die im C-1 und C-10 wiedergefundene Aktivität gleich 100 %, so waren bei der Verfütterung von Pyruvat-2-¹⁴C ~ 85 % im C-1 und bei Applikation von Pyruvat-3-¹⁴C ~ 75 % im C-10 lokalisiert. Überraschend war das Resultat nach Fütterung von Acetat-¹⁴C sowie Acetat-2-¹⁴C. Besonders beim Acetat-1-¹⁴C-Versuch war eine starke Verschmierung zu beobachten. Die Versuche sind mehrfach wiederholt worden. Es konnten jedoch niemals mehr als 10 % der Gesamtaktivität in der Essigsäure (C-1 + C-10) gefunden werden. Der größte Teil davon war im C-1 nachweisbar. Nach Acetat-2-Fütterung ließen sich

~ 40% der Radioaktivität in der durch Kuhn-Roth-Oxydation gewonnenen Essigsäure (C-1 + C-10) nachweisen. Bei einem spezifischen Einbau sollte die gesamte Radioaktivität im C-10 lokalisiert sein. Dies ist jedoch nicht der Fall, da beim Schmidt-Abbau der Essigsäure auch ein beträchtlicher Teil der Radioaktivität im BaCO_3 (C-1) nachgewiesen werden konnte. Unsere Ergebnisse mit Acetat unterscheiden sich also beträchtlich von denen der irischen Autoren¹⁶). Bemerkenswert ist ferner, daß wir wesentlich höhere spezifische Einbauraten ($\text{Acetat-1-}^{14}\text{C} \rightarrow \text{Harmin} = 0,15\%$; dagegen $\text{Acetat-1-}^{15}\text{C} \rightarrow \text{Eleagnin} = 0,003\%$) erzielen konnten als ¹⁶). Offenbar sind die Wurzeln von *Peganum harmala* erheblich stoffwechselaktiver und das Acetat wird via Acetyl-CoA sehr schnell in den allgemeinen Metabolismus einbezogen. Die Folge ist eine starke Verschmierung der Radioaktivität im Harmin. Kurzzeiterperimente könnten hier weiterführen.

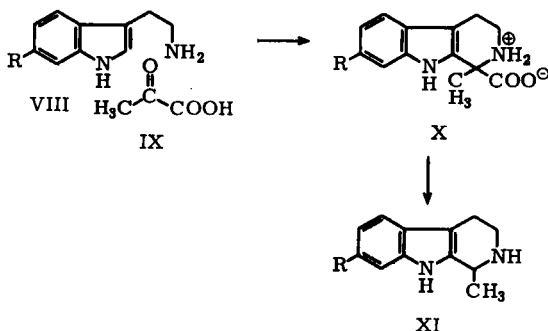
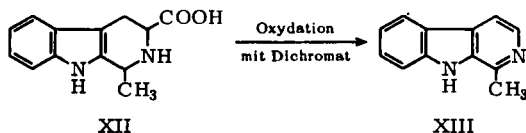


Schema 1 Biogenese der Harman-Alkaloide n. Perkin und Robinson

Pyruvat wird spezifisch eingebaut, wie oben gezeigt wurde. Über den Mechanismus des Pyruvat-Einbaues läßt sich noch nichts Endgültiges aussagen. Es wäre möglich, daß Pyruvat durch oxydative Decarboxylierung in Acetyl-Co-A übergeht und dieses mit Tryptophan reagiert. Andererseits sind α -Ketosäuren selbst außerordentlich reaktionsfähig und Pyruvat könnte sich leicht mit Tryptamin zur Tetrahydro- β -carbolin-1-carbonsäure (X) umsetzen. Decarboxylierung würde dann 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (XI) ergeben (Schema 2).



VII Eleagnin

Schema 2 Möglicher Weg des Pyruvat-Einbaues in β -CarbolineSchema 3 Umwandlung von 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (XII) in 1-Methyl- β -carbolin (XIII)

Die weitere Reaktionsfolge ist noch ungeklärt. Schon *Perkins* und *Robinson*²⁰⁾ haben vermutet, daß durch stufenweise Oxydation aus der Tetrahydroverbindung die Dihydroverbindung und dann Harmin entsteht (Schema 1). In vitro läßt sich XI in saurem Milieu nur mit schlechten Ausbeuten zu XIII oxydieren. Leicht gelingt dies dagegen durch Dichromat mit der 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure (XII). Allerdings wird dabei die Stufe der Dihydroverbindung nicht durchlaufen und es entsteht sofort 1-Methyl- β -carbolin (XIII). Möglicherweise läuft diese Reaktion auch in vivo ab²⁰⁾ 5). Wir haben nun diese Verbindung (XII) radioaktiv markiert und an zwei Monate und sechs Monate alte Pflanzen verfüttert. Es konnte in jedem Fall nur inaktives Harmin isoliert werden (Tab. 1). Somit ist

²⁰⁾ *R. Robinson*, J. chem. Soc. (London) 1936, 1079; Intern. Congr. Biochem. 1st Congress Cambridge, Engl. p. 32 (1949).

gezeigt, daß XII in vivo nicht in Harmin übergeht. Auf Grund dieses Versuches lassen sich aber Tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäuren noch nicht endgültig als Vorstufe der Harman-Alkaloide ausschließen. Der Nichteinbau von (XII) in Harmin kann auch auf das Unvermögen der Pflanze zurückzuführen sein, das intakte β -Carbolingerüst in 7-Stellung zu hydroxylieren und anschließend zu methylieren. Versuche mit entsprechenden methoxylierten Vorstufen sind im Gange.

Beschreibung der Versuche

I. Synthese radioaktiv markierter Verbindungen

1. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3-carbonsäure-[4- ^{14}C -2- ^{15}N]

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an *Harvey et al.*²¹⁾. 80 mg Tryptophan-(β - ^{14}C - ^{15}N) wurden in 3 ml siedendem Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur haben wir 2 ml einer 10proz. Acetaldehydlösung hinzugegeben und das Ganze 2 Tage im Dunklen aufbewahrt. Die Tetrahydroharmancarbonsäure bildete sich allmählich und kristallisierte in weißen Nadeln. Es wurde 2mal mit Wasser gewaschen und kurz über P_2O_5 getrocknet. Ausbeute 31 mg (33% d. Th.). Schmp. 294–296° (Zers.). Analyse einer inaktiven Probe:

Ber.: C 67,8	H 6,1	N 12,2
Gef.: C 68,2	H 6,1	N 12,2

Elektronenstoß-Massenspektrum: $m/e = 230 (\text{M}^+)$, 215 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 169, 156 (Schlüsselbruchstücke von Tetrahydro- β -carbolinen).

2. Tryptamin-(β - ^{14}C - ^{15}N) $\cdot \text{HCl}$

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an ²²⁾. 120 mg Tryptophan-(β - ^{14}C - ^{15}N) wurden in 6 ml frisch destilliertem Diphenyläther aufgenommen und unter Stickstoff 1 Std. am Rückfluß gehalten (260–270°). Nach dem Abkühlen haben wir 3mal mit jeweils 30 ml 2 n HCl ausgeschüttelt. Zur Entfernung von Diphenyläther-Resten extrahierten wir noch 2mal mit Äther und stellten anschließend mit 6 n NaOH stark alkalisch. Durch erneutes Ausschütteln mit Äther ließ sich Rohtryptamin gewinnen, welches durch präparative Schichtchromatographie gereinigt wurde. DC-Platten: Kieselgel H „Merck“. Lösungsmittelsystem Chloroform : Methanol : konz. Ammoniak (1 : 1 : 0,05). Als Detektionsmittel diente eine 1proz. Cerammoniumsulfat-Lösung in konz. Phosphorsäure. Tryptamin ergibt zitronengelbe Flecke. Die Tryptamin-Zonen wurden abgeschabt und mit Methanol/Äther (5 : 1) eluiert. Danach erfolgte Rechromatographie im gleichen System. Die freie kristalline Base wurde mit absol. Äther erhitzt und durch Einleiten von HCl-Gas das Tryptaminhydrochlorid ausgefällt. Ausbeute 23 mg (20% d. Th.). Schmp. 245–247°.

II.

1. Applikation von radioaktiven Verbindungen und Isolation des Alkaloids

Die markierten Vorstufen wurden an 2–7 Monate alte Pflanzen von *Peganum harmala* über die Wurzel gefüttert. Die Aufnahme der radioaktiven Lösungen erfolgte innerhalb

²¹⁾ D. G. Harvey, E. J. Miller und W. Robson, J. chem. Soc. (London) 1941, 153.

²²⁾ D. H. R. Barton, G. W. Kirby, R. H. Prager und E. M. Wilson, J. chem. Soc. (London) 1965, 3990.

weniger Std. Bis zum Versuchsende haben wir ständig Wasser nachgefüllt. Gefüttert wurde an 6–10 Pflanzen.

2. Isolation von Harmin

Von den intakten Pflanzen wurden die Wurzeln abgetrennt, gut gewaschen und bei 70° im Trockenschrank getrocknet. Danach wurde das Pflanzenmaterial zerrieben, mit Ammoniak gut durchfeuchtet und 4 Std. im Soxhlet mit einem Gemisch von Chloroform : Isopropanol (3 : 1) extrahiert. Das Eindampfen des Extraktes erfolgte i. Vak. Zur Vorreinigung wurde an einer Kieselgel H „Merck“-Säule chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Chloroform : Methanol (3 : 1). Die Wanderung des Harmins ließ sich leicht durch die starke blaue Fluoreszenz verfolgen. Das Roh-Harmin wurde durch mehrfache DC weiter gereinigt: Kieselgel H „Merck“, Lösungsmittelsysteme a) Chloroform : Methanol (3 : 1); b) Chloroform : Methanol : Aceton (3 : 1 : 0,5). Anschließend erfolgte Umkristallisation aus Methanol. Die in den Tabellen aufgeführten Harmin-Werte beziehen sich auf Alkaloid, welches bis zur konstanten spez. Radioaktivität gereinigt wurde. Für Abbaureaktionen haben wir das Harmin mit inaktivem Alkaloid verdünnt.

III. Abbaureaktionen am Harmin

1. Kuhn-Roth-Oxydation

80 mg Harmin wurden in 2 ml 2 n H_2SO_4 gelöst, mit 3,8 g CrO_3 in 6 ml 2 n H_2SO_4 versetzt und auf 140–145° erhitzt. Unter Konstanz des Ausgangsvol. durch kontinuierlichen Zulauf von Wasser wurden etwa 90 ml Destillat gesammelt. Das Destillat haben wir 45 Min. am Rückfluß erhitzt und titrierten anschließend gegen 0,1 n NaOH. Verbrauch 2,95 ml 0,1 n NaOH = 17,7 mg Essigsäure (79% d. Th.).

2. Schmidt-Reaktion

Etwa 20 mg Natriumacetat wurden mit 0,4 ml 97proz. Schwefelsäure aufgenommen und mit 38 mg Natriumazid versetzt. Die Umsetzung wurde in der üblichen Weise durchgeführt. Ausbeute 30 mg $BaCO_3$ (62% d. Th.).

Das außerdem gebildete Methylamin wurde nach Zugabe von konz. Natronlauge zur schwefelsauren Lösung im Stickstoff-Strom in eine gesättigte ätherische Pikrinsäurelösung übergetrieben und als Pikrat gefällt. Ausbeute 35 mg. Schmp. 214–215°.

3. Methoxylbestimmung nach Zeisel

In einer Spezialapparatur (n. *Sirotenko*) wurden 49 mg Harmin mit einem Körnchen Phenol und 0,2 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach Zugabe von 2,5 ml Jodwasserstoffsäure ($d = 2,7$) erhitzen wir das Ganze zum Sieden. Während der Reaktionsdauer von etwa $1\frac{1}{2}$ Std. wurde ein Stickstoff-Strom durch die Apparatur geleitet. Zur Entfernung der mitgerissenen Jodwasserstoffsäure diente ein Kolben, der mit Kaliumcarbonatlösung und etwas rotem Phosphor beschickt war. Zum Abfangen des gebildeten Methyljodids benutzten wir eine Vorlage (— 70°), die eine 6proz. Lösung von Triäthylamin in 96% Äthanol enthielt. Nach dem Abdampfen der Lösung i. Vak. und Umkristallisieren aus wenig Isopropanol verblieb ein rein weißer, kristalliner Rückstand von Triäthylmethylammoniumjodid. Ausbeute 15 mg (30% d. Th.). Schmp. 296–297°.

IV. Bestimmungsmethoden

Radioaktivitätsmessungen wurden mit dem Methandurchflußzähler der Firma *Friescke & Höpfner* durchgeführt. Die ^{15}N -Bestimmungen erfolgten nach der von *Munsche*²³⁾ angegebenen Methode: Der Stickstoff wurde mit dem Hochfrequenzgenerator HF 3 zur Lichtemission angeregt und das Spektrum mit dem Quarzspektrographen Q 24 aufgenommen. Elektronenstoß-Massenspektrum:*) Massenspektrometer Varian MAT CH4/IV, 70 eV Elektronenenergie und 3 KV Beschleunigung.

*) Für die Aufnahme der Massenspektren danken wir Herrn Professor Dr. B. Franck, Kiel, sehr herzlich. Die ^{15}N -Bestimmungen wurden von Herrn Jänicke, Halle, durchgeführt, die Elementaranalysen vom Mikroanalytischen Laboratorium I. Beetz, Kronach (Oberfranken), und Herrn R. Martin, Leipzig.

²³⁾ D. Munsche, Kernenergie 8, 32 (1965).

Anschrift: Doz. Dr. D. Gröger, 401 Halle/Saale, Weinberg.

[Ph 538]

M. M. Sidky und A. A. El-Kateb

Über 6,6'-Dichinoly-Derivate

Aus dem National Research Centre, Dokki, Kairo

(Eingegangen am 27. Dezember 1967)

Es wurde 8,8'-(Diäthylamino-äthylamino)-6,6'-dichinolin synthetisiert und in pharmakologischen und mikrobiologischen Versuchen festgestellt, daß die Verbindung im Vergleich mit dem einfachen 8-(Diäthylamino-äthylamino)-chinolin nicht wirksam ist.

8,8'-(Diethylamino-ethylamino)6,6'-diquinoline was synthesized. By pharmacological and microbiological tests it was determined that the compound in comparison to the simple 8-(diethylamino-ethylamino)-quinoline is not active.

An verschiedenen Beispielen wurde gefunden, daß die Wirkung zunimmt, wenn ein Arzneistoffmolekül verdoppelt wird¹⁾. Aminochinolin-Derivate, in denen die Aminogruppe mit einer basischen Seitenkette verknüpft ist, besitzen bedeutende Wirksamkeit gegen Malaria, Amöben- und Wurminfektionen²⁾. Das Ziel dieser Arbeit war zu prüfen, ob es gelingt, durch Molekülverdoppelung von 8-Aminochinolinen, die ursprüngliche chemotherapeutische Aktivität zu erhöhen. Zu diesem

1) J. Büchi, „Grundlagen der Arzneimittelforschung und der synthetischen Arzneimittel“, Birkhäuser Verlag, Stuttgart und Basel 1963, S. 174.

2) F. Schönhöfer, „Naturforschung und Medizin in Deutschland, Band 43, Chemotherapie“, Dieterichsche Verlagsbuchhandlung, Wiesbaden 1948, S. 1; H. P. Kaufmann, „Arzneimittel-Synthese“, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953, S. 636.