

## Zur Biosynthese der Alkaloide vom Rhoeadin-Typ

### Bildung von Alpinigenin aus einer Tetrahydroprotoberberin-Vorstufe und Tetrahydropalmatin-methosalz

Hasso RÖNSCH

Institut für Biochemie der Pflanzen des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Halle/Saale

(Eingegangen am 16. November 1971/13. März 1972)

1. The biosynthesis of alkaloids with 2-phenyl-3-benzazepine skeleton (rhoeadine type) starts from two molecules of tyrosine. Now it was shown, using *Papaver bracteatum* plants, that [ $N$ - $^{14}C$ , 8- $^{14}C$ ]DL-tetrahydropalmatine methiodide (Ia) is incorporated with high efficiency into alpinigenine (III). Apparently the incorporation of the N-quaternary salt is a specific one.

2. A degradation sequence was applied which allows the selective determination of the radioactivity in the non-aromatic C-atoms as well as the aromatic rings of alpinigenine.

3. The incorporation of a compound with tetrahydroprotoberberine structure is in accordance with current biogenetic views. But involvement of a N-quaternary intermediate seems quite surprising. A novel mechanism of ring rearrangement may operate. Thus, ring splitting as a step for further transformation of tetrahydropalmatine should be initiated by N-methylation followed by hydroxylation on one of the  $\alpha$ -C-atoms (C-14 or C-8) and subsequent hydrolysis.

4. The significance of the feeding experiments in respect to biogenesis of benzazepine alkaloids is briefly discussed.

Der Start zur Biosynthese der 2-Phenyl-1,2,4,5-tetrahydro-3H-3-benzazepin-Alkaloide (Rhoeadin-Typ) erfordert ebenso wie bei anderen Papaver-Alkaloiden zwei Moleküle Tyrosin [2, 3]. Als nächstfolgende Einzelglieder der betreffenden Biosynthesekette werden allgemein Norlaudanolin, Reticulin und ein Tetrahydroprotoberberin, Schoulerin und vielleicht Tetrahydropalmatin (I), angenommen [4, S. 367 ff u. 407]. Tetrahydroprotoberberine, die in *Chelidonium majus* und vielleicht auch in anderen Pflanzen stereospezifisch aus (+)-Reticulin entstehen [5], nehmen bei der Biogenese von Papaver-Alkaloiden eine zentrale Stellung ein, da sie offenbar leicht unter sukzessiver Ring-Spaltung und erneutem Ringschluß in andere heterocyclische Systeme umgeformt werden, so z. B. in Basen mit Phthalidisochinolin- oder Benzophenanthridin-Struktur. Bezüglich des Mechanismus der Ringöffnung wird häufig angenommen, daß primär eine Dehydrierung zu Imoniumverbindungen erfolgt, welche anschließend über entsprechende Carbinolamine zu reaktiven Aldehydaminen hydrolytisch gespalten werden [4–7].

Zur Phenylbenzazepin-Biosynthese wurde in Anlehnung an diese Befunde wiederholt postuliert, daß

9. Mitteilung über *Papaver bracteatum*, Lindl.; 8. Mitteilung, s. [1].

geeignete Tetrahydroprotoberberine nach einem grundsätzlich gleichen Mechanismus über Protopin- bzw. Phthalidisochinolin/Narcein-Zwischenstufen umgewandelt werden können [4, 8, 9]. Unsere früheren Versuche zur Biogenese von Alpinigenin (III) mit [ $^{14}C$ , 3]Methionin [3] sprachen für eine Beteiligung von Tetrahydroprotoberberinen. Nunmehr wurde, wie bereits kurz berichtet [10], zur Überprüfung dieser Vorstellungen Tetrahydropalmatin als Methojodid Ia mit Radioaktivität lediglich in der N-Methylgruppe an *Papaver bracteatum* Lindl. verfüttert. Dieses Experiment konnte in der folgenden Vegetationsperiode (1970) mit doppelt markierter, zusätzlich im Grundgerüst  $^{14}C$ -Radioaktivität tragender Vorstufe Ia voll reproduziert werden. Der 1969 beobachtete spezifische Einbau in III wurde dadurch gesichert. Darüber hinaus wird über die Verfütterung von Tetrahydropalmatin selbst, [8- $^{14}C$ ]I, berichtet.

#### EXPERIMENTELLES

##### Synthese der radioaktiven Vorstufen

[ $N$ - $^{14}C$ , 3]DL-Tetrahydropalmatin-methojodid (Ia). Die Lösung von 82,6 mg I in 5 ml Methanol wurde mit 10 mg  $CH_3J$  (1 mCi) in 1 ml Methanol versetzt, 48 Std bei 20 °C belassen und 90 min auf 60 °C

erhitzt. Nach Zugabe von 1 ml inaktivem  $\text{CH}_3\text{J}$  wurde 1 Std am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Aus der auf 1,5 ml eingeeengten Lösung kristallisierten 95,7 mg (83% d.Th.) Ia, F 249–250 °C (Zers.);  $6,48 \times 10^9$  dpm/mmol (56% der eingesetzten Radioaktivität); enthält etwas  $\alpha$ -Form, Lit. [11]:  $\alpha$ -Form 230 °C,  $\beta$ -Form 266 °C.

[8- $^{14}\text{C}$ ]DL-Tetrahydropalmin (I). Für die Einführung von Radioaktivität an C-8 sind die in der Literatur angegebenen Wege zur Synthese von [6- $^{14}\text{C}$ ] Tetrahydroprotoberberinen (vgl. z. B. [7]) offensichtlich nicht optimal anwendbar. Die Bradsher-Synthese [12] ließ sich jedoch an die Erfordernisse des radioaktiven Arbeitens gut anpassen. So wurde aus nicht-radioaktivem 6,7-Dimethoxy-isochinolin-1-carbaldoxim und [ $^{14}\text{CH}_2$ ]2,3-Dimethoxy-benzylbromid, Cyclisierung des erhaltenen *N*-Benzylisochinoliniums Salzes zum Benzaclidiniumsalz und nachfolgender  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion [8- $^{14}\text{C}$ ]DL-Tetrahydropalmin in 58%iger Ausbeute erhalten, F 147–149 °C,  $2,13 \times 10^9$  dpm/mmol. Das erforderliche radioaktive Benzylderivat wurde von  $^{14}\text{CO}_2$  und 2,3-Dimethoxy-phenyllithium ausgehend nach Gilman über 2,3-Dimethoxybenzoesäure und 2,3-Dimethoxy-benzylalkohol synthetisiert. Ausbeute 59% bei der Carbonisierung der Li-Verbindung 73% d.Th. Die Über-alles-Ausbeute von I auf  $^{14}\text{CO}_2$  bezogen betrug somit 34%.

#### Chemischer Abbau von Alpinigenin

Aus Pflanzen isoliertes radioaktives Alpinigenin wurde mit nicht-radioaktivem Alkaloid gemischt und gemeinsam umkristallisiert. Die daran gemessene Radioaktivität wurde als Bezugspunkt für den folgenden Abbau gewählt, RA = 100 (s. u.). Zur Chemie des Abbaus vgl. [14].

Abbau von 2-( $\beta$ -Dimethylamino-äthyl)-veratrumaldehyd (IV) 114 mg IV-Methojodid wurden im  $\text{N}_2$ -Strom mit 6 ml 20%iger KOH und frischgefälltem  $\text{Ag}_2\text{O}$  aus 180 mg  $\text{AgNO}_3$  2,5 Std magnetisch gerührt und anschließend weitere 2,5 Std auf 115 °C (Bad-Temp.) erhitzt. Entstandenes Trimethylamin wurde bei –20 °C in methanolischer HCl aufgefangen. Der Verdampfungsrückstand (75% d.Th.) lieferte nach Umkristallisation aus Methanol/Äther kristallines VII-hydrochlorid.

2-Vinyl-veratrum-säure (VI): Durch Methylchlorid-Extraktion der angesäuerten wäßrigen Phase wurden 85% d.Th. VI gewonnen, Nadeln aus Methanol/Wasser, F 183–185 °C, Lit. [15]: 184 °C.

Abbau von Hemipinimid (V). Der Abbau von V erfolgte in wasserfreiem Methanol mit Natriummethylat als Base [16]. Bei 0 °C wurden vereinigt: 244 mg V, 3 ml  $\text{NaOCH}_3$ -Lösung (aus 67 mg Na) und nach Auflösung 188,5 mg  $\text{Br}_2$  in 1,5 ml Methanol. Nach möglichst schnellem Aufheizen wurde 10 min am Rückfluß erhitzt und anschließend nach Zusatz von  $\text{NaHSO}_3$  im Vak. zur Trockne gebracht. Zur

Hydrolyse wurde in 5 ml Äthanol und 4 ml 20%iger Kalilauge gelöst und 2,5 Std am Rückfluß erhitzt. Die entstandenen zwei Dimethoxyanthranilsäuren VIIIa und VIIIb konnten aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit in Wasser und Äther sauber getrennt werden, vgl. Lit. [18]:

3,4-Dimethoxy-anthranilsäure (VIIIa): Äthanol wurde im Vak. vertrieben, mit 20%iger Salzsäure wurde bei pH 3 VIIIa ausgefällt, 42% d.Th., Nadeln aus Methanol, F 186–187 °C, Lit. [17]: 184 °C.

5,6-Dimethoxy-anthranilsäure (VIIIb): Eine Restmenge VIIIa wurde aus der wäßrigen Mutterlauge durch Ätherextraktion entfernt (2 $\times$ ). Methylchlorid-Extraktion (5 $\times$ ) ergab 20% d.Th. VIIIb, Plättchen aus *i*-Propanol, F 80–82 °C und 97–98 °C, Lit. [18]: 98–99 °C.

#### Fütterungsversuche

An blühende Freilandpflanzen von *P. bracteatum* [13], Alpinigenin-Rasse, wurden die radioaktiven Vorstufen in wäßriger Lösung über schmale, aus dem Stengel ausgeschnittene Zungen verabreicht. Das Aufsaugen erforderte 2–20 Std. Anschließend wurde  $\text{H}_2\text{O}$  gegeben. Es wurden jeweils ca. 20 Triebe mit 35–45 mg *precursor* gefüttert. Nach 15–20 Tagen wurden die oberirdischen Pflanzenteile geerntet, bei 80 °C getrocknet, gemahlen und mit Methylchlorid extrahiert. Nach Eindampfen der Extrakte im Vak. wurde der ölige Rückstand mehrfach mit kleinen Portionen 2%iger HCl extrahiert. Lipide wurden über Cellulosepulver abfiltriert. Die saure Lösung ergab nach Entfernung restlicher Lipide durch Ätherextraktion mittels Methylchlorid-Extraktion bei pH 9 eine Rohalkaloid-Fraktion, welche säulenchromatographisch in Thebain und Alpinigenin aufgetrennt wurde – mit Benzol/Methanol (80:20, v/v) an mit diesem Laufmittel vorbehandeltem Kieselgel Merck (0,05–0,2 mm). Alpinigenin wurde mehrfach aus Benzol/Methanol (95:5, v/v) und Methanol umkristallisiert, F 186,5–187,5 °C. Aus Benzol/Methanol kristallisierte III mit 1 Mol Benzol; zur Messung der Radioaktivität wurde bei 100 °C/Hochvak. getrocknet. – Thebain wurde aus Methanol/Wasser und Methanol umkristallisiert, F 194–195 °C.

Die Messung von Radioaktivitäten erfolgte mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer Tri-Carb, Modell 574, Fa. Packard, bei externer Standardisierung. Die so erhaltenen Werte wurden als Zerfälle/min = dpm angegeben. Relative Radioaktivitätswerte (= RA) beziehen sich auf bestimmte spezifische Aktivitäten innerhalb von Versuchsreihen.

#### ERGEBNISSE

Die Verfütterung von Tetrahydropalmin-methojodid, [ $\text{N-}^{14}\text{CH}_3$ , 8- $^{14}\text{C}$ ]Ia führte reproduzierbar und mit verhältnismäßig guter Einbaurate zu radioakti-

Tabelle 1. Fütterungsversuche mit radioaktivem Tetrahydropalmin-methojodid (Ia) und Tetrahydropalmin (I) an *P. bracteatum*

No.	precursor	Alpinigenin (III)			
				Einbauraten	
		spezif.	absolut		
	<sup>14</sup> C an	dpm/mmol	dpm/mmol		
1	Ia N-CH <sub>3</sub>	6,42 × 10 <sup>9</sup>	9,74 × 10 <sup>6</sup>	0,15	0,56
2	Ia N-CH <sub>3</sub> + C-8	7,55 × 10 <sup>9</sup>	4,69 × 10 <sup>6</sup>	0,06	0,52
3	I C-8	1,52 × 10 <sup>8</sup>	4,29 × 10 <sup>6</sup>	2,8	14,8

Tabelle 2. Chemischer Abbau von radioaktivem Alpinigenin (III) aus Fütterungsversuchen mit Tetrahydropalmin-methojodid (Ia)

Die angegebenen Versuchsnummern entsprechen Fütterungsversuchen in Tab. 1. Im Versuch 2 war die Radioaktivität auf N-Methylgruppe und C-8 des precursors im Verhältnis 71,7:28,3 verteilt. RA bezieht sich auf die spezifische Radioaktivität von verdünntem III, RA' auf den oben angegebenen Prozentsatz der Gesamtradioaktivität an N-CH<sub>3</sub> bzw. C-8 (im precursor). — Zur Struktur der Zwischenstufen des Abbaus vgl. [14]

<sup>14</sup> C im precursor an	Versuch 1	Versuch 2
	N-Methyl	N-Methyl, C-8
Alpinigenin (III)	1,09 × 10 <sup>6</sup> dpm/mmol RA = 100	7,95 × 10 <sup>5</sup> dpm/mmol RA = 100
III-Nitril	RA = 101	RA = 101
III-Nitril-methojodid	RA = 98	RA = 103
Benzylidenphthalimidin	RA = 98	RA = 102
IV-Methojodid	RA = 96	RA' NCH <sub>3</sub> = 100
VII-Hydrochlorid	RA = 97	RA' NCH <sub>3</sub> = 96
2-Vinyl-veratrum-säure (VI)	RA = 0	RA' NCH <sub>3</sub> = 1
Hemipinimid (V)	RA = 0	RA' C-8 = 99
VIII a	—	RA' C-8 = 0
VIII b	—	RA' C-8 = 106

vem Alpinigenin (III) (Tab. 1). Das Thebain der Versuchspflanzen erwies sich dagegen als inaktiv. Grundsätzlich mögliche Übertragungen radioaktiver Methylgruppen [19] von Ia auf Zwischenstufen der Thebain-Biosynthese spielen offenbar keine Rolle, was analog auch für die Alpinigenin-Bildung gelten sollte. Dennoch erschien es notwendig, durch einen chemischen Abbau, der gegenüber dem kürzlich beschriebenen Verfahren [14] etwas erweitert wurde (vgl. Fig. 2, Experimentelles), alle nichtaromatischen Ring-C-Atome, die N-Methylgruppe und die aromatischen Ringe einzeln auf ihre Radioaktivität zu prüfen. Wie Tab. 2 zeigt, war die Gesamtradioaktivität von Alpinigenin (III) in N-Methylgruppe (Trimethylamin, VII) und C-18 (5,6-Dimethoxy-anthra-

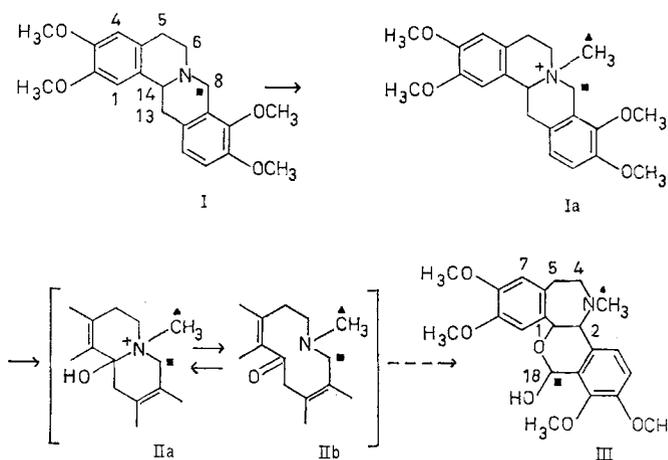


Fig. 1. Biosynthese von Alpinigenin (III) über Tetrahydropalmin (I). ▲ bzw. ■ bezeichnen die Markierung durch <sup>14</sup>C. Die unterschiedliche Zählweise der heterocyclischen Ring-systeme bedingt, daß gleiche Zahlen in I und III nicht die gleichen C-Atome bezeichnen

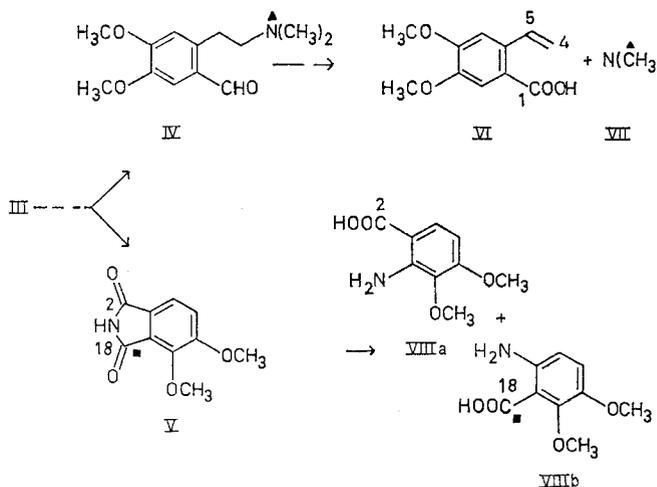


Fig. 2. Chemischer Abbau von Alpinigenin (III). ▲ bzw. ■ bezeichnen die Markierung durch <sup>14</sup>C. Die arabischen Zahlen neben einzelnen C-Atomen beziehen sich auf die entsprechenden Positionen im Alpinigenin

nilsäure, VIIIb) lokalisiert, und zwar in dem im precursor Ia (Versuch 2) vorgegebenen Verhältnis von N-Methyl- : Grundgerüst-Aktivität. Demgegenüber repräsentierten 2-Vinyl-veratrum-säure (VI) und 3,4-Dimethoxy-anthranilsäure (VIIIa) den inaktiven Rest von III. Insbesondere durch Versuchsreihe 2 ist damit der Beweis erbracht, daß das N-quaternäre Methosalz Ia unter den Versuchsbedingungen als Gesamtmolekül in Alpinigenin (III) umgewandelt wurde. Darüber hinaus ergibt sich gemeinsam mit Versuch 3 (Inkorporierung von Radioaktivität aus

[8-<sup>14</sup>C] Tetrahydropalmatin, I) die Beteiligung eines Tetrahydroprotoberberins, I, an der Biosynthese von III, einem Alkaloid vom Rhoeadin-Typ.

#### DISKUSSION

Das Dibenzochinolin-Ringsystem von Tetrahydropalmatin (I) erleidet bei der Alpinigenin-Biosynthese eine vermutlich schrittweise, über chemisch definierte Zwischenstufen verlaufende Umformung in das 2-Phenyl-3-benzazepin-Gerüst der Alkaloide vom Rhoeadin-Typ. Wie die Markierungsversuche zeigen (vgl. Fig. 1), stammt das acetalische C-18 von III aus dem C-8 von I, der sog. „Berberin-Brücke“. Reihenfolge und Mechanismus bei der hierzu erforderlichen Spaltung der Bindungen zwischen Stickstoff einerseits und C-8 sowie C-14 andererseits, Struktur der intermediär gebildeten Verbindungen sowie Chemismus der Ring-Neubildungsreaktionen sind noch weitgehend unbekannt und Gegenstand laufender Untersuchungen.

Unabhängig von grundsätzlichen Vorbehalten, die anschließend diskutiert werden, wird für die beobachteten Umwandlungen der in Fig. 1 gezeigte Mechanismus vorgeschlagen. Die Ringöffnung wird durch eine N-Methylierung eingeleitet. Durch Hydroxylierung des entstandenen Methosalzes Ia an C-14 entsteht in einem Schritt die kationische Form IIa von Cryptopalmatin [11] (= Muramin [20]), die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der Normalform IIb steht. Die Zugehörigkeit solcher Alkaloide vom Protopin-Typ zur Biogenesekette der natürlichen Benzazepin-Basen wurde bereits postuliert [8].

Dieser neuartige Ringöffnungsmechanismus dürfte als biogenetisch relevant gelten, sofern gezeigt werden kann, daß auch der Schritt I → Ia im Zuge der pflanzlichen Alkaloidsynthese realisiert wird. Die bisherigen Experimente sind hierfür nicht hinreichend beweisend. Denkbar wäre auch, daß die Transformation Ia → III in der enzymatisch möglicherweise multipotenten Pflanze vorwiegend unter unphysiologischem Substratangebot abläuft, wobei synthetische Möglichkeiten aufgezeigt werden, die normalerweise ungenutzt bleiben.

Abschließend sei hervorgehoben, daß der Nachweis für eine allgemeinere Bedeutung N-quarternärer Ammoniumverbindungen in der Biosynthese der Alkaloide bisher nicht erbracht werden konnte. Über entsprechende Versuche wurde allerdings nur

gelegentlich berichtet, vgl. [4, S. 101 ff, 19]. In weiteren Vorstufen-Studien zur Bildungsweise der Phenylbenzazepin-Basen werden gegenwärtig diese mit der Umwandlung der Tetrahydroprotoberberine verbundenen Probleme näher untersucht und u. a. die Funktion des Cryptopalmatins überprüft.

Für sein Interesse an den Untersuchungen sei Herrn Prof. Dr. Drs. h. c. K. Mothes herzlich gedankt. Frau H. Menzky assistierte mit Sorgfalt und Geschick.

#### LITERATUR

1. Böhm, H. (1971) *Biochem. Physiol. Pflanz. (BPP)*, **162**, 476.
2. Böhm, H. & Rönsch, H. (1968) *Z. Naturforsch. B*, **23**, 1553.
3. Rönsch, H. & Böhm, H. (1971) *ABH. Deut. Akad. Wiss. Berlin*, **271**.
4. Mothes, K. & Schütte, H. R. (1969) *Biosynthese der Alkaloide*, Akademie-Verlag, Berlin.
5. Battersby, A. R., Francis, R. J., Ruveda, E. & Staunton, J. (1965) *Chem. Commun.* **89**.
6. Battersby, A. R., Francis, R. J., Hirst, M., Southgate, R. & Staunton, J. (1967) *Chem. Commun.* **602**.
7. Leete, E. & Murill, J. B. (1967) *Phytochemistry*, **6**, 231.
8. Kühn, L. & Pfeifer, S. (1965) *Pharmazie*, **20**, 659.
9. Šantavý, F. (1970) in *The Alkaloids* (Manske, R. H. F. ed.), vol. 12, p. 417, Academic Press, New York.
10. Rönsch, H., Vortrag, Chemiedozententagung der DDR, Leipzig, Mai 1970.
11. Haworth, R. D., Koepfli, J. B. & Perkin jr., W. H. (1927) *J. Chem. Soc.* **2261**.
12. Bradsher, C. K. & Dutta, N. L. (1961) *J. Org. Chem.* **26**, 2231; Dutta, N. L. & Bradsher, C. K. (1962) *J. Org. Chem.* **27**, 2213.
13. Günther, K. F. & Böhm, H. (1968) *Österr. Bot. Z.* **115**, 1.
14. Rönsch, H. (1969) *Tetrahedron Lett.* **5121**.
15. Decker, H. & Galatty, L. (1909) *Chem. Ber.* **42**, 1179; Battersby, A. R. & Harper, B. J. T. (1962) *J. Chem. Soc.* **3526**.
16. Jeffreys, E. (1897) *Chem. Ber.* **30**, 898.
17. Kühn, C. (1895) *Chem. Ber.* **28**, 809.
18. Radionow, W. M., Kanewskaya, S. J. & Kupinskaya, G. W. (1929) *Chem. Ber.* **62**, 2563.
19. Barton, D. H. R., Boar, R. B., Widdowson, D. A., Deulofeu, V. & Albonico, S. M. (1969) *J. Chem. Soc. C* **807**; vgl. auch Battersby, A. R., Foulkes, D. M., Hirst, M., Parry, G. V. & Staunton, J. (1968) *J. Chem. Soc. C* **210**.
20. Boit, H. G. & Flentje, H. (1960) *Naturwissenschaften*, **47**, 180; Cross, A. D., Dolejš, L., Hanuš, V., Maturova, M. & Šantavý, F. (1965) *Collect. Czech. Chem. Commun.* **30**, 1335.

H. Rönsch  
 Institut für Biochemie der Pflanzen der D.A.d.W.  
 DDR-401 Halle/Saale, Weinberg  
 Deutsche Demokratische Republik