

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE DES PEGANINS (VASICIN)

S. JOHNE und D. GRÖGER

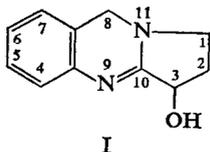
Institut für Biochemie der Pflanzen Halle/Saale (DDR) der Deutschen Akademie der
Wissenschaften zu Berlin

(Received 26 July 1967)

Abstract—The biosynthesis of peganine (vasicine) has been studied in young plants of the Indian *Adhatoda vasica* Nees (Acanthaceae). The aromatic part of the alkaloid is derived from anthranilic acid. In order to clarify the origin of the “non-anthranilic-portion” of peganine ^{14}C -labelled precursors were administered via the roots. The isolated peganine was degraded to anthranilic acid and glycine, which was subsequently converted to formaldehyde to give the radioactivity of each carbon atom of this amino acid. From the obtained results one may conclude that desoxyvasicine is not transformed into peganine. Furthermore an unspecific labelling pattern was observed after feeding of γ -hydroxy-glutamic acid-2- ^{14}C , putrescine-1,4- ^{14}C , ornithine-2- ^{14}C and 4-hydroxyproline-2- ^{14}C . No incorporation was obtained with N-methyl- ^{14}C -anthranilic acid and N-formyl- ^{14}C -anthranilic acid. After administration of aspartate-3- ^{14}C most of the radioactivity (~ 80 per cent) was found in glycine corresponding to the positions 1 and 2 of peganine. More radioactivity was recovered from position 2 of the alkaloid than from position 1. Aspartate-4- ^{14}C showed no specific incorporation. These results indicate either that aspartate (by loss of the carboxyl groups) or a related compound is an immediate precursor of peganine. A scheme of the possible biosynthetic pathway of peganine is presented.

EINLEITUNG

BISHER sind etwa 25 Chinazolinalkaloide bekannt, die in 4 Gruppen eingeteilt werden können. Zur ersten Gruppe gehören Chinazolon-(4) und dessen Abkömmlinge wie Arborin und Febrifugin. Die zweite Gruppe wird repräsentiert durch die Pyrrolidino-chinazoline, deren wichtigster Vertreter das Peganin=Vasicin (I)* ist. Die dritte Gruppe enthält β -Carbolino-chinazolone vom Typ des Rutaecarpins. Vor kurzem konnten zwei Chinazolinalkaloide isoliert werden,^{1,2} die sich als 6,7,8,9-Tetrahydro-11H-pyrido [2,1-*b*]chinazoline erwiesen.



Die Chinazolinalkaloide kommen bisher in acht systematisch z.T. weit auseinanderstehenden Pflanzenfamilien vor: Acanthaceen (*Adhatoda*), Araliaceen (*Mackinlaya*), Leguminosac-Papilionatae (*Galega*), Palmae (*Daemonorops*), Rutaceen (*Evodia*, *Glycosmis*, *Hortia*, *Zanthoxylum*), Saxifragaceen (*Dichroa*, *Hydrangea*), Scrophulariaceen (*Linaria*) und Zygophyllaceen (*Peganum*). Bemerkenswert ist, daß die Chinazolinalkaloide bei der Gattung

* Die Bezifferung dieses Alkaloids erfolgt nach E. SPÄTH, *Mh. Chem.* **72**, 115 (1939).

¹ S. R. JOHNS und J. A. LAMBERTON, *Chem. Commun.* 267 (1965).

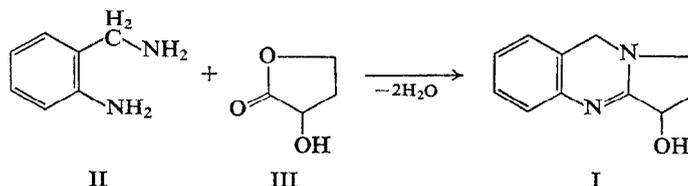
² J. S. FITZGERALD, S. R. JOHNS, J. A. LAMBERTON und A. H. REDCLIFE, *Australian J. Chem.* **19**, 151 (1966).

Glycosmis neben Acridin- und Furochinolinbasen vorkommen und bei der Gattung *Peganum* mit β -Carbolinen vom Typ des Harmans vergesellschaftet sind.

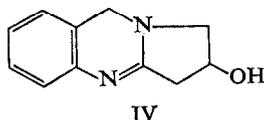
Das Vorkommen von Chinazolinalkaloiden ist nicht nur auf das Pflanzenreich beschränkt. Schildknecht und Wenneis³ konnten den im Wehrsekret von *Glomeris marginata* (Arthropoden) zu etwa 1 Prozent enthaltenen Bitterstoff Glomerin als 1,2-Dimethyl-chinazolone(4) identifizieren.

Das hier interessierende Alkaloid Peganin wurde bisher in den Gattungen *Adhatoda*,⁴ *Galega*,⁵ *Linaria*⁶ und *Peganum*⁷ gefunden.

Die erste Vermutung über die Biosynthese des Peganins stammt von Späth und Platzler.⁸ Sie formulierten eine Bildung aus *o*-Aminobenzylamin (II) und α -Hydroxybutyrolacton (III), zwei Verbindungen, die auch *in vitro* zur Peganinsynthese geführt hatten.⁸



Von Schöpf und Oechler⁹ wird die Möglichkeit diskutiert, daß Peganin aus *o*-Aminobenzylamin (II) und Äpfelsäure entstehen könnte. Unter der Voraussetzung, daß die beiden Aldehydgruppen des Äpfelsäuredialdehyds die gleiche Reaktionsfähigkeit besitzen, müßte man noch das Isomere des Peganins (IV) auffinden können.



Robinson¹⁰ postuliert Anthranilsäure (XVII) und Prolin als Vorstufen des Peganins, während Leete¹¹ Anthranilsäure (XVII) und Hydroxyprolin annimmt. Nach Wenkert¹² kann Peganin aus Anthranilsäure (XVII) und Erythrose entstehen.

Bei der Biosynthese der einfachen Abkömmlinge des Chinazolone(4) wird nach Pakrashi und Bhattacharyya¹³ primär die Aminogruppe der Anthranilsäure (XVII) methyliert. Erst dann erfolgt die weitere Umsetzung mit anderen Komponenten. Für die Biosynthese der Tetrahydro-11H-pyrido[2,1-*b*]-chinazoline nehmen Fitzgerald *et al.*² Anthranilsäure (XVII) und Lysin an.

³ H. SCHILDKNECHT und W. F. WENNEIS, *Z. Naturforsch.* **21** b, 552 (1966).

⁴ D. HOOPER, *Pharm. J.* **18**, 841 (1888).

⁵ K. SCHREIBER, O. AURICH und K. PUF AHL, *Arch. Pharm.* **295**, 271 (1962).

⁶ u. a. S. J. JUNUSSOW und Z. F. ISMAILOW, *Ber. Akad. Wiss. Usbek. SSR* **11**, 25 (1956).

D. GRÖGER und S. JOHNE, *Planta Med.* **13**, 182 (1965).

⁷ u. a. E. SPÄTH und E. NIKAWITZ, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **67**, 45 (1934).

⁸ E. SPÄTH und N. PLATZER, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **69**, 255 (1936).

⁹ C. SCHÖPF und F. OECHLER, *Liebigs Ann. Chem.* **523**, 1 (1936).

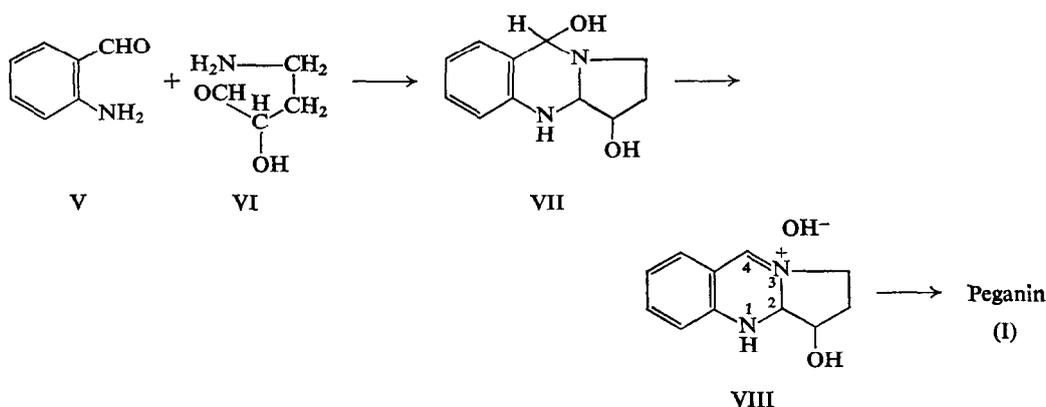
¹⁰ R. ROBINSON, *The Structural Relations of Natural Products*, p. 95, Oxford University Press (1955).

¹¹ E. LEETE, in P. BERNFELD, *Biogenesis of Natural Products*, Pergamon Press, Oxford (1963).

¹² E. WENKERT, *Experientia (Basel)* **15**, 165 (1959).

¹³ S. C. PAKRASHI und J. BHATTACHARYYA, *J. Sci. Ind. Res. (India)* **24**, 293 (1965). *Ann. Biochem. Exp. Med. (Calcutta)* **23**, 123 (1963).

Die klassischen Arbeiten der *in vitro*-Synthese unter zellmöglichen Bedingungen stammen von Schöpf und Oechler.⁹ Danach soll *o*-Aminobenzaldehyd (V)—aus dem Tryptophan-Stoffwechsel—mit α -Hydroxy- γ -aminobutyraldehyd (VI)—aus der auch heute noch unbekanntes Aminosäure β -Hydroxyornithin—zu VII reagieren. Diese Verbindung könnte weiter als Pseudobase in die quartäre Base VIII übergehen. Als letzte Stufe der Biogenese müßte man schließlich eine Wasserstoffverschiebung von 1,2 nach 3,4 des Chinazolinringes annehmen. Da der Hydroxyaldehyd damals noch nicht zugänglich war, setzten Schöpf und Oechler das Diäthylacetal des γ -Aminobutyraldehyds ein unter der Annahme, daß sich diese Verbindung nicht anders verhalten sollte als der hydroxylierte Aldehyd. Mit *o*-Aminobenzaldehyd (V) erhielt man bei pH 5 die Salze des 2,3-Trimethylen-1,2-dihydro-chinazoliniumhydroxyds. Durch Schütteln mit Palladium tritt die gewünschte Wasserstoffverschiebung ein, und Schöpf und Oechler erhielten in 18 prozentiger Ausbeute Desoxyvasicin (Pegen-(g)).



1960 gelang es Leonhard und Martell,¹⁴ aus dem inzwischen synthetisch zugänglichen α -Hydroxy- γ -aminobutyraldehyd-diäthylacetal durch Kondensation mit *o*-Aminobenzaldehyd (V) unter sehr milden Bedingungen das obige Schöpf-Oechler'sche Schema der Peganinsynthese zu verwirklichen und DL-Peganin (I) in 39 prozentiger Ausbeute herzustellen.

Auch die in *Evodia rutaecarpa* vorkommenden Chinazolinalkaloide Evodiamin und Rutaecarpin sollen nach Schöpf und Steuer¹⁵ auf ähnliche Weise gebildet werden: z.B. Rutaecarpin aus N-Formyltryptophan und *o*-Aminobenzaldehyd (V).

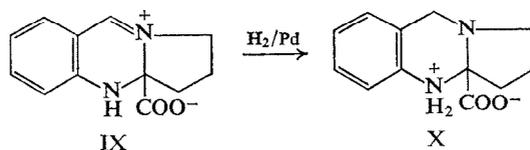
1959 äußerte Macholan¹⁶ die Vermutung, daß neben dem α -Hydroxy- γ -aminobutyraldehyd (VI) bei der Biosynthese des Peganins (I) auch die α -Keto- β -hydroxy- δ -aminovaleriansäure in Frage kommen könnte. Diese Ketosäure läßt sich—wie der Aldehyd—vom β -Hydroxyornithin ableiten. *o*-Aminobenzaldehyd (V) reagiert *in vitro* mit α -Keto- δ -aminovaleriansäure zu einem Zwischenprodukt IX. Dieses 2,3-Trimethylen-1,2-dihydrochinazolinium-2-carbonat (IX) läßt sich bei pH 7,2 und 20° mit Kaliumhexacyanoferrat-(III) oxydieren, wobei unter gleichzeitiger Decarboxylierung Desoxyvasicinon gebildet wird. Durch katalytische Hydrierung kommt man von IX zur Pegan-10-carbonsäure (X), die sich bei pH 7,5 mit dem gleichen Oxydationsmittel unter Freisetzung eines Mols CO₂ zu Desoxyvasicin umsetzen läßt. Da das postulierte β -Hydroxyornithin in der Natur bisher nicht

¹⁴ N. J. LEONHARD und M. J. MARTELL JR., *Tetrahedron Letters*, 44 (1960).

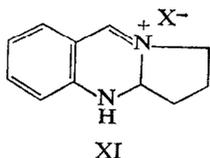
¹⁵ C. SCHÖPF und H. STEUER, *Angew. Chem.* **50**, 797 (1937); *Liebigs Ann. Chem.* **558**, 124 (1947).

¹⁶ L. MACHOLAN, *Collection Czech. Chem. Commun.* **24**, 550 (1959); *Chem. Listy* **51**, 2122 (1957).

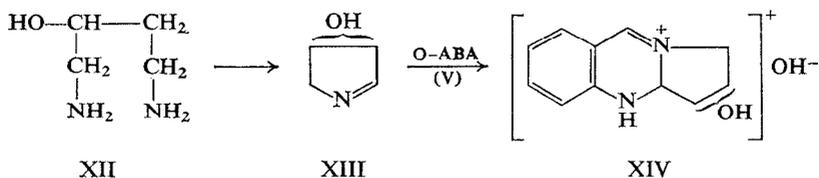
aufgefunden wurde, nimmt Macholan eine nachträgliche Hydroxylierung des Desoxyvasicins an. Für letzteres Alkaloid ist noch kein natürliches Vorkommen bekannt, während Desoxyvasicinon von Koretzkaja *et al.*¹⁷ aus *Peganum* und von Plekhanova *et al.*¹⁸ aus *Linaria transiliensis* isoliert wurden.



Durch Oxydation von Prolin gelangt man zum Δ^1 -Pyrrolin, das mit *o*-Aminobenzaldehyd (V) zu XI kondensiert. Skursky¹⁹ konnte kürzlich zeigen, daß Erbsenhomogenate in der Lage sind, XI—in einem wahrscheinlich enzymatischen Prozeß—zu Desoxyvasicin/Desoxyvasicinon umzusetzen. Ob man durch eine analoge Oxydation von Hydroxyprolin—über Hydroxypyrrolin—zu Peganin (I) gelangt, ist nicht bekannt.



Macholan²⁰ hat vor kurzem 2-Hydroxyputrescin (XII) in Phosphatpuffer bei pH 6,5–7 mit gereinigter Diaminoxidase desaminiert und die entstehenden Aldimine (XIII) mit *o*-Aminobenzaldehyd (V) abgefangen:



Es entstand eine einheitliche Verbindung (XIV). Aus verschiedenen Beobachtungen darf man schließen, daß bei dieser Reaktion nur 4-Hydroxy- Δ^1 -pyrrolin entsteht; es reagiert also der am weitesten von der Hydroxylgruppe entfernte Stickstoff. Hydroxyputrescin (XII), das als Baustein für Peganin auch schon 1961 von Mothes²¹ vermutet wurde, ist in der Natur noch nicht aufgefunden worden. Es könnte durch Abbau der im Pflanzenreich gefundenen Aminosäuren γ -Hydroxyarginin oder γ -Hydroxyornithin gebildet werden.

ERGEBNISSE

Unsere eigenen Untersuchungen zur Biosynthese der Chinazolinalkaloide—insbesondere des Peganins (I)—führten wir unter Verwendung radioaktiv markierter Verbindungen an

¹⁷ N. I. KORETZKAJA, *J. Allg. Chem. (Russia)* **27**, 3361 (1957); **28**, 1087 (1958).

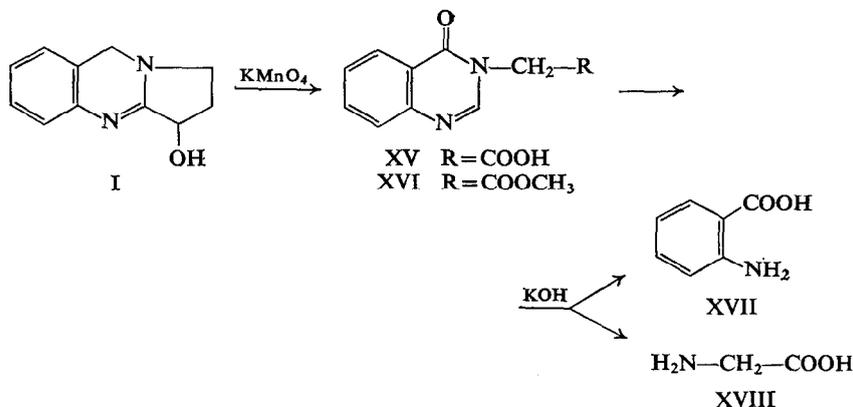
¹⁸ N. V. PLEKHAHOVA und G. P. SHEVELEVA, *Unters. d. Flora Kirgisiens auf alkaloidhaltige Pflanzen; Akad. Wiss. Kirg. SSR, Inst. f. Org. Chemie (Russia)* **54** (1965).

¹⁹ L. SKURSKY, *Collection Czech. Chem. Commun.* **30**, 2080 (1965).

²⁰ L. MACHOLAN, *Naturwissenschaften* **52**, 186 (1965).

²¹ K. MOTHEs, *Wiss. Z. Univ. Halle, Math.-Nat.* **1149** (1961).

Adhatoda vasica NEES durch. Gröger²² konnte bereits 1960 zeigen, daß Anthranilsäure- (¹⁴COOH) von steril aufgezogenen *Peganum harmala*-Pflanzen in Peganin (I) eingebaut wird. Die größte spezifische Aktivität wurde in den Wurzeln gefunden. In Weiterführung dieser Versuche wurde von uns ein beträchtlicher Einbau von Anthranilsäure- (¹⁴COOH) in Peganin (I) bei *Adhatoda vasica*²³ erreicht. Durch einen gezielten chemischen Abbau des radioaktiven Peganins (I) zu Anthranilsäure (XVII) und Glycin (XVIII)—in Anlehnung an Späth und Nikawitz⁷—wurde bewiesen, daß die Anthranilsäure (XVII) bei *Adhatoda* direkt und spezifisch in Peganin (I) eingebaut wird. Wie weiter von uns durchgeführte Versuche ergaben, liefert die Anthranilsäure (XVII) auch das N₍₉₎-Atom des Peganins (I).



Schildknecht *et al.*²⁴ erhielten vor kurzem ebenfalls einen spezifischen Einbau von Anthranilsäure- (¹⁴COOH) in Glomerin (s.o.), während es Yamazaki und Ikuta²⁵ gelang, Tryptophan-3-¹⁴C in den β -Carbolinteil von Evodiamin und Rutaecarpin einzubauen.

Nachdem Anthranilsäure (XVII)—oder ein entsprechendes biochemisches Äquivalent—als Baustein des Peganins (I) feststand, mußte geklärt werden, ob die in 3-Stellung befindliche Hydroxylgruppe mit dem zweiten Baustein in die Molekel eingeführt wird oder ob Peganin (I) durch nachträgliche Hydroxylierung von Desoxyvasicin entsteht. Aus diesem Grunde wurde Pegen-(9)-[1,2,3,10-¹⁴C]=Desoxyvasicin²⁶ an *Adhatoda*-Pflanzen appliziert und das radioaktive Alkaloid abgebaut (Tabelle 1).

TABELLE 1. BIOSYNTHESE VON PEGANIN AUS DESOXYVASICIN

Spez. Akt. des Peganins	Ipm/mMol $\times 10^{-4}$ Spez. Akt. der Abbauprodukte (Radioaktivitätsverteilung)		
	Anthranilsäure	Glycin (C-1 + C-2)	C-3 + C-10 (durch Differenz)
17.1 (100%)	8.5 (50%)	2.72 (16%)	(34%)

An 10 junge *Adhatoda*-Pflanzen wurden 14.5 mg radioaktiv markiertes Desoxyvasicin (spez. Akt. $1.11 \cdot 10^8$ Ipm/mMol) appliziert. Versuchsdauer: 10 Tage. Spez. Akt. des isolierten Peganins $9.1 \cdot 10^5$ Ipm/mMol; spez. Einbaureate 0,82%.

²² D. GRÖGER und K. MOTHES, *Arch. Pharm.* **293**, 1049 (1960).

²³ D. GRÖGER, S. JOHNE und K. MOTHES, *Experientia (Basel)* **21**, 13 (1965).

²⁴ H. SCHILDKNECHT und W. F. WENNEIS, *Tetrahedron Letters* 1815 (1967).

²⁵ M. YAMAZAKI und A. IKUTA, *Tetrahedron Letters* 3221 (1966).

²⁶ S. JOHNE und D. GRÖGER, *Z. Chem.* **5**, 228 (1965).

In weiteren Versuchen wurde γ -Hydroxyglutaminsäure- α - $^{14}\text{C}^{27}$ an *Adhatoda*-Pflanzen appliziert und das radioaktive Peganin (I) ebenfalls dem chemischen Abbau unterworfen (Tabelle 2). Diese erstmals von Virtanen und Hietala²⁸ in *Phlox* aufgefundene Aminosäure erschien auf Grund ihres gemeinsamen Vorkommens mit Peganin (I) in der Gattung *Linaria*²⁹ als aussichtsreicher Precursor, zumal sich der daraus durch Decarboxylierung und Reduktion entstehende α -Hydroxy- γ -aminobutyraldehyd (VI) *in vitro* leicht mit *o*-Aminobenzaldehyd (V) zum Peganin (I) umsetzen läßt.¹⁴

TABELLE 2. BIOSYNTHESE VON PEGANIN AUS γ -HYDROXYGLUTAMINSÄURE

Radioaktivitätsverteilung % in den Abbauprodukten von Peganin=100%		
Anthranilsäure	Glycin (C-1 + C-2)	C-3 + C-10 (durch Differenz)
46	27	27

An 10 junge *Adhatoda*-Pflanzen wurden 40.6 mg γ -Hydroxyglutaminsäure- α - $^{14}\text{C}=2.41 \cdot 10^8$ Ipm-spez. Akt. $9.7 \cdot 10^8$ Ipm/mMol-appliziert. Versuchsdauer 9 Tage. Aus dem Pflanzenmaterial wurden 10 mg radioaktives Peganin isoliert. Spez. Akt. $2.2 \cdot 10^6$ Ipm/mMol. Spez. Einbaurrate 0.23%.

Um zu prüfen, ob in Analogie zum Nicotin, bei dem ein spezifischer Einbau von Ornithin-2- ^{14}C und Putrescin-1.4- ^{14}C in den Pyrrolidin-Ring erfolgt, diese zur "Glutaminsäure-Familie" zählenden Verbindungen in Peganin (I) inkorporiert werden, wurden Ornithindihydrochlorid-2- ^{14}C , Putrescin-dihydrochlorid-1.4- $^{14}\text{C}^{30}$ und 4-Hydroxyprolin-2- ^{14}C an *Adhatoda*-Pflanzen appliziert (Tabellen 3-5).

TABELLE 3. BIOSYNTHESE VON PEGANIN AUS ORNITHIN

Spez. Akt. des Peganins	Ipm/mMol $\times 10^{-4}$ Spez. Aktivität der Abbauprodukte (Radioaktivitätsverteilung)		
	Anthranilsäure	Glycin (C-1 + C-2)	C-1 als HCHO-Dimedon
5.87 (100%)	2.35 (40%)	1.93 (33%)	1.11 (19%)

An 8 junge *Adhatoda*-Pflanzen wurden 3 mg Ornithin-2- $^{14}\text{C} \cdot 2 \text{ HCl}$ (spez. Akt. $1.69 \cdot 10^9$ Ipm/mMol) appliziert. Versuchsdauer 3 Tage (Mai 1967).

TABELLE 4. BIOSYNTHESE VON PEGANIN AUS PUTRESCIN

Spez. Akt. des Peganins	Ipm/mMol $\times 10^{-4}$ Spez. Akt. d. Abbauprodukte (Radioaktivitätsverteilung)		
	Anthranilsäure	Glycin (C-1 + C-2)	C-3 + C-10 (durch Differenz)
12.2 (100%)	7.6 (62.5%)	1.2 (9.9%)	27.6%

An 5 *Adhatoda*-Pflanzen wurden über den Stengel (2 Blattpaare) 5.2 mg Putrescin-dihydrochlorid-1.4- ^{14}C appliziert = $1.4 \cdot 10^7$ Ipm; spez. Akt. $4.24 \cdot 10^8$ Ipm/mMol. Versuchsdauer 3 Tage. Es wurden 39 mg radioaktives Peganin isoliert, spez. Akt. $2.34 \cdot 10^5$ Ipm/mMol; spez. Einbaurrate 0.055%, und mit inaktivem Peganin auf 75 mg verdünnt.

²⁷ L. BENOITON und L. P. BOUTHILLIER, *Can. J. Biochem. Physiol.* **34**, 661 (1956).

²⁸ A. I. VIRTANEN und P. K. HIETALA, *Acta Chem. Scand.* **9**, 175 (1955).

²⁹ S.-I. HATANAKA, *Acta Chem. Scand.* **16**, 513 (1962).

³⁰ D. GROSS und H. R. SCHÜTTE, *Z. Chem.* **3**, 192 (1963).

TABELLE 5. BIOSYNTHESE VON PEGANIN AUS HYDROXYPROLIN

Spez. Akt. des Peganins	Ipm/mMol $\times 10^{-4}$ Spez. Akt. der Abbauprodukte (Radioaktivitätsverteilung)		
	Anthranilsäure	Glycin (C-1 + C-2)	C-3 + C-10 (durch Differenz)
20.8 (100%)	12.6 (60%)	3.46 (17%)	23%

Es wurden 20 mg 4-Hydroxyprolin-2- ^{14}C an 5 junge *Adhatoda*-Pflanzen appliziert = $5.32 \cdot 10^6$ Ipm; spez. Akt. $3.44 \cdot 10^7$ Ipm/mMol. Versuchsdauer 9 Tage. Es wurden 8 mg Peganin mit einer spez. Akt. von $1.1 \cdot 10^6$ Ipm/mMol isoliert. Die spez. Einbaurrate betrug 3.2%. Das radioaktive Alkaloid wurde mit inaktivem Peganin auf 75 mg verdünnt.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, erscheint ein beträchtlicher Teil der Radioaktivität im "Anthranilsäure-Teil" des Peganins (I). Damit dürften diese Aminosäuren incl. Putrescin als Precursoren für Peganin (I) kaum in Betracht kommen. Aus diesem Grunde haben wir die Möglichkeit der Peganin-Biosynthese unter Verwendung der Asparaginsäure (XIX) untersucht.³¹ In Analogie zur Biosynthese des Pyridinringes³² könnte Peganin (I) in der Pflanze aus Anthranilsäure (XVII), Asparaginsäure (XIX) und einem C_1 -Körper entstehen (Abb. 1).

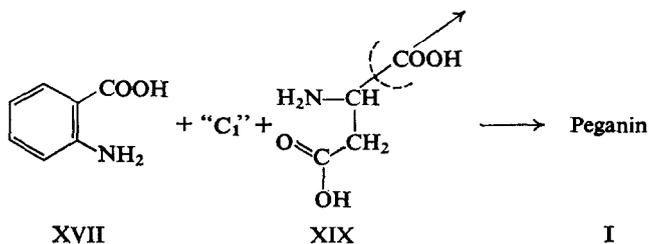
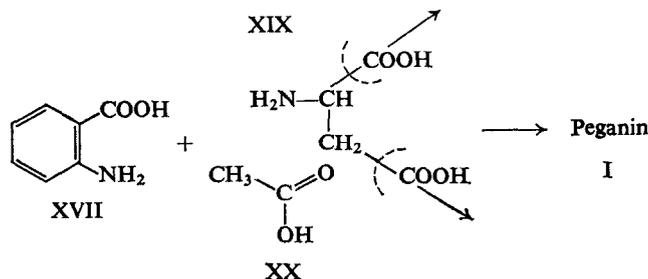


ABB. 1. MÖGLICHE BIOSYNTHESE VON PEGANIN

Aber auch ein Einbau der Asparaginsäure (XIX) unter Elimination beider Carboxylgruppen wäre möglich. Die Komplettierung der Peganinmolekel würde dann einen C_2 -Körper erfordern (Abb. 2).


 ABB. 2. MÖGLICHE BIOSYNTHESE DES PEGANINS UNTER BETEILIGUNG EINES C_2 -KÖRPERS

³¹ D. GRÖGER, S. JOHNE und K. MOTHES, *Experientia (Basel)* **23**, 812 (1967).

³² D. GROß, H. R. SCHÜTTE, G. HÜBNER und K. MOTHES, *Tetrahedron Letters* 541 (1963).

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde Asparaginsäure-3-¹⁴C und Asparaginsäure-4-¹⁴C an *Adhatoda*-Pflanzen appliziert (Tabellen 6 und 7).

TABELLE 6. BIOSYNTHESE VON PEGANIN AUS ASPARAGINSÄURE-3-¹⁴C

Versuchs- dauer (Tage)	Spez. Akt. des Peganins	Ipm/mMol × 10 ⁻⁴				
		Spez. Akt. der Abbauprodukte (Radioaktivitätsverteilung)				
		Anthranilsäure	Glycin (C-1 + C-2)	C-1 als HCHO- Dimedon	C-2 (durch Differenz)	C-3 + C-10 (nicht bestimmt)
1	20.6 (100%)	3.68 (17.9%)	16.8 (81.5%)	7 (34%)	47.5%	0.6%
3	40.9 (100%)	4.33 (10.6%)	33.3 (81%)	12.3 (30%)	51%	8.4%

Appliziert wurden jeweils 2 mg; die spez. Aktivität der Asparaginsäure betrug 2.72 · 10⁹ Ipm/mMol. Bei dem 3 Tage-Versuch wurden gleichzeitig 3 mg inaktive Anthranilsäure appliziert.

TABELLE 7. BIOSYNTHESE VON PEGANIN AUS ASPARAGINSÄURE-4-¹⁴C

Peganin	Spez. Aktivität (Ipm/mMol × 10 ⁻⁴) 4-Oxo-3,4-dihydrochinazolyl-3-essigsäure
6.73 (100%)	5.83 (86.6%)

An 10 junge *Adhatoda*-Pflanzen wurden 4.9 mg Asparaginsäure-4-¹⁴C (spez. Akt. 6.21 · 10⁸ Ipm/mMol) appliziert. Versuchsdauer: 2 Tage. Das radioaktive Peganin wurde mit inaktivem Alkaloid verdünnt.

Bei der Applikation von N-Methyl-(¹⁴C)-anthranilsäure und N-Formyl-(¹⁴C)-anthranilsäure wurde keine Inkorporation der Radioaktivität in Peganin gefunden.

DISKUSSION

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, ist eine Hydroxylierung von Desoxyvasicin bei *Adhatoda vasica* nicht wahrscheinlich. Während ein großer Teil des inkorporierten Desoxyvasicins aus der Pflanze wieder isoliert werden konnte, muß ein anderer Teil abgebaut und die Bruchstücke unspezifisch in Peganin (I) inkorporiert worden sein.

Die für weitere Versuche verwendete γ -Hydroxyglutaminsäure erschien auf Grund ihrer in γ -Stellung befindlichen Hydroxylgruppe als geeigneter Precursor. Virtanen und Hietala³³ konnten zeigen, daß γ -Hydroxyglutaminsäure durch Extrakte aus *Escherichia coli* zu α -Hydroxy- γ -aminobuttersäure decarboxyliert wird. Bei höheren Pflanzen steht dieser Nachweis noch aus. Da γ -Hydroxyglutaminsäure zwei asymmetrische Zentren besitzt, liegt bei der synthetischen Verbindung ein Gemisch von 4 Isomeren vor, von denen evtl. nur ein oder zwei (L-Formen) für die Biosynthese Verwendung finden. Wir haben das Racemat appliziert. Wenn γ -Hydroxyglutaminsäure- α -¹⁴C spezifisch in Peganin (I) inkorporiert würde, müßte die Radioaktivität im C-1 des Alkaloids lokalisiert sein. Beim Abbau zu Anthranilsäure (XVII) und Glycin (XVIII) würde der Hauptteil der Radioaktivität im Glycin (XVIII) zu erwarten sein. Es zeigt sich jedoch (s. Tab. 2), daß diese Aminosäure unter diesen Bedingungen unspezifisch in Peganin (I) inkorporiert wird. Offenbar ist *Adhatoda*

³³ A. I. VIRTANEN und P. K. HIETALA, *Acta Chem. Scand.* **9**, 549 (1955).

vasica nicht in der Lage, γ -Hydroxyglutaminsäure zu α -Hydroxy- γ -aminobuttersäure zu decarboxylieren. Nach Hasse³⁴ ist eine Decarboxylierung der Δ^1 -Pyrrolincarbonsäure-(5)—bei dieser angenommenen Peganin-Biosynthese würde als Zwischenprodukt 3-Hydroxy- Δ^1 -pyrrolincarbonsäure-(5) entstehen—im Pflanzenreich bisher noch nicht bewiesen worden.

Homola und Dekker³⁵ untersuchten den Katabolismus der γ -Hydroxyglutaminsäure an abgeschnittenen Blättern von *Phlox decussata*. Sie applizierten γ -Hydroxyglutaminsäure- α -¹⁴C und bereits nach wenigen Stunden war ein beträchtlicher Abbau der radioaktiven γ -Hydroxyglutaminsäure festzustellen. Der Hauptteil des ¹⁴C befand sich im Alanin, aber auch Serin, Glutamin- und Asparaginsäure (XIX) waren radioaktiv. Damit würde die von Bouthillier und Binette³⁶ in der Rattenleber gefundene Reaktion γ -Hydroxyglutaminsäure \rightarrow Alanin + Glyoxylsäure wahrscheinlich auch in Pflanzen ablaufen, und der unspezifische Einbau von γ -Hydroxyglutaminsäure- α -¹⁴C in Peganin (I) wäre so erklärbar.

Auch 4-Hydroxyprolin erschien als Precursor geeignet, weil für diese Aminosäure, die ja nachgewiesene Beziehungen zum Betonicin, zur 4-Hydroxyhydrinsäure und anderen Pyrrolidinalkaloiden hat, der reversible Übergang zu γ -Hydroxyglutaminsäure-semialdehyd bewiesen ist. Letztere Verbindung wäre ideal für eine angenommene Peganin-Biosynthese aus Anthranilsäure (XVII) und einer hydroxylierten Glutaminsäure. Trotz der bemerkenswert hohen spezifischen Einbaurate erfolgt die Inkorporation unspezifisch. Das negative Resultat wird evtl. durch die nicht sehr ausgeprägte Tendenz zur Ringaufspaltung und durch die bisher offenbar noch nicht bewiesene Decarboxylierung der 3-Hydroxy- Δ^1 -pyrrolincarbonsäure-(5) zu erklären sein.

Putrescin dihydrochlorid-1·4-¹⁴C wird ebenfalls in das Alkaloid inkorporiert. Eine Beteiligung dieses Amins an der Peganin-Biosynthese wird man aber auf Grund der durch den Abbau des radioaktiven Alkaloids (Tab. 4) festgestellten Radioaktivitätsverteilung mit Sicherheit ausschließen können. Auch Ornithin dürfte als Precursor für Peganin (I) nicht in Betracht kommen (Tab. 3).

Nimmt man eine Beteiligung der Asparaginsäure (XIX) am Aufbau des Peganins (I) an, so müßte nach Inkorporation der in 3-Stellung markierten Aminosäure der Hauptteil der Radioaktivität im C-2 des Peganins (I) lokalisiert sein. Es zeigt sich, daß ein geringer Teil der Radioaktivität in der Anthranilsäure (XVII) erscheint (s. Tab. 6). Im Vergleich mit den Ergebnissen der anderen Aminosäuren und in Anbetracht der großen Stoffwechselaktivität der Asparaginsäure (XIX) ist dies jedoch gering. Appliziert man ein Gemisch von Anthranilsäure (XVII) und radioaktiver Asparaginsäure (XIX), so läßt sich der Radioaktivitätseinbau in dem aromatischen Teil des Peganins (I) zurückdrängen. Der überwiegende Anteil der Radioaktivität findet sich nach dem Abbau im Glycin (XVIII), das den C-Atomen 1 und 2 des Peganins (I) entstammt. Durch den Abbau des Glycins (XVIII) kann die Verteilung der Radioaktivität in dieser Verbindung bestimmt werden. Es zeigt sich, daß etwa die Hälfte der Radioaktivität im C-2 und etwa 30 Prozent im C-1 des Peganins (I) lokalisiert ist. Eine Wiederholung dieser Inkorporationsversuche ergab die gleichen Ergebnisse. Die Radioaktivität im C-1 des Alkaloids kann durch folgende Reaktionen dieser Aminosäure erklärt werden: Asparaginsäure (XIX) geht durch die Aspartase-Reaktion in Fumarat bzw. durch Desaminierung in Oxalacetat über. Die letztere Verbindung kann in einem reversiblen Prozeß via Malat in Fumarat umgewandelt werden. Tritt hierbei eine Reaminierung ein, so

³⁴ K. HASSE, Tagungsbericht vom 3. Intern. Symp. Biochemie und Physiologie der Alkaloide, Halle (S.) 1965, Akademie-Verlag Berlin 1966, S. 535 (Diskussion).

³⁵ A. D. HOMOLA u. E. E. DEKKER, *Biochim. biophys. Acta* **82**, 207 (1964).

³⁶ L. P. BOUTHILLIER und Y. BINETTE, *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 1930 (1961).

besitzt die entstehende Asparaginsäure (XIX) eine Gleichverteilung der Radioaktivität im C-2 und C-3. Ähnliche Verhältnisse fanden auch kürzlich Jackanicz *et al.*³⁷ bei der Biosynthese des Pyridinringes vom Nicotin. Diese Autoren postulieren die Inkorporation einer unsymmetrischen Verbindung (Asparaginsäure (XIX), Oxalacetat oder Malat), da im C-3 des Pyridins stets mehr Radioaktivität als im C-2 lokalisiert war. Johns und Marion³⁸ dagegen nehmen für die Biosynthese des Ricinins den Einbau einer symmetrischen Zwischenstufe an.

Um zu überprüfen, ob in Analogie zur Biosynthese der Nicotinsäure bei *Mycobacterium tuberculosis*³² das C-4 der Asparaginsäure (XIX) bei der Biosynthese des Peganins (I) Verwendung findet, wurde Asparaginsäure-4-¹⁴C an *Adhatoda*-Pflanzen appliziert. Bei einer spezifischen Inkorporation von Asparaginsäure-4-¹⁴C müßte die gesamte Radioaktivität im C-3 des Peganins (I) lokalisiert sein. Nach dem chemischen Abbau des Peganins dürfte die entstandene 4-Oxo-3,4-dihydrochinazolyl-3-essigsäure (XV) keine Radioaktivität besitzen. Es zeigte sich aber, daß der größte Teil der Radioaktivität in XV enthalten ist (s. Tab. 7). Auch hier ergab eine Wiederholung der Inkorporationsversuche die gleichen Ergebnisse. Man darf deshalb annehmen, daß eine Elimination des C-4 der Asparaginsäure (XIX) und ein unspezifischer Einbau dieses CO₂ in das Peganin (I) erfolgte. Dieses Resultat steht im Einklang mit den durch Applikation von N-Methyl-(¹⁴C)-anthranilsäure und N-Formyl-(¹⁴C)-anthranilsäure erhaltenen Ergebnissen: würde das C-4 der Asparaginsäure (XIX) bei der Biosynthese des Peganins (I) Verwendung finden, wäre der Einbau eines weiteren C₁-Körpers zu erwarten. Dabei könnte es sich um Formyl- oder Methylantranilsäure handeln.

Nach dem jetzigen Stand der Untersuchungen ist anzunehmen, daß neben Anthranilsäure (XVII) und der Asparaginsäure (XIX), die das C-1 und C-2 des Alkaloids liefert, noch ein C₂-Körper -Acetat (XX)?—an der Biosynthese des Peganins (I) bei *Adhatoda* beteiligt ist (Abb. 2).

EXPERIMENTELLES

1. Applikationstechnik und Alkaloid-Isolation

Für die Biosyntheseuntersuchungen an *Adhatoda* benutzten wir ca. 5 Wochen alte Pflanzen (Sproßlänge 5–10 cm), deren Anzucht im Gewächshaus erfolgte. Die Applikation der radioaktiven Substanzlösungen wurde meist über die Wurzel vorgenommen, aber auch die Fütterung an den abgetrennten Sproß oder an abgeschnittene oder bewurzelte Blätter ist möglich. Das Volumen der applizierten radioaktiven Lösungen betrug etwa 1 ml; die Fütterungsdauer bewegte sich zwischen 2 und 10 Tagen.

Das getrocknete und gemahlene Pflanzenmaterial wurde stets mit 10 prozentigem Ammoniak angefeuchtet und mit CHCl₃/i-Propanol=3:1 extrahiert. Die Reinigung des Alkaloids erfolgte dünnschichtchromatographisch: Kieselgel G Merck, angerührt mit 0,5 prozentiger KOH; Laufmittel: 1. CHCl₃/Methanol/Eisessig=75:20:5 (Die Elution erfolgte mit Methanol). 2. CHCl₃/Methanol=3:1; die Elution geschah ebenfalls mit Methanol. Die quantitative Bestimmung des radioaktiven Peganins haben wir mit Tropäolin 00 durchgeführt.³⁹

2. Chemischer Abbau des Peganins (I)

Zum Abbau des mit inaktivem Material verdünnten radioaktiven Peganins (I) wurde die Substanz in Aceton gelöst und mit KMnO₄ oxydiert. Die entstandene 4-Oxo-3,4-dihydrochinazolyl-3-essigsäure (XV) wird bei pH 2 mit Äther extrahiert. Die kristalline Substanz haben wir mit kaltem CHCl₃ gewaschen und im Hochvakuum sublimiert. Schmp. 237°. Die Reinheitskontrolle kann auch dünnschichtchromatographisch erfolgen: Kieselgel G Merck, Laufmittel CHCl₃/Methanol/Eisessig=85:15:3. Die Detektion erfolgt mit Joddampf. *R_F* 0,28.

³⁷ T. H. JACKANICZ u. R. U. BYERRUM, *J. Biol. Chem.* **241**, 1296 (1966).

³⁸ S. R. JOHNS u. L. MARION, *Can. J. Chem.* **44**, 23 (1966).

³⁹ D. GRÖGER und S. JOHNE, Festschrift K. Mothes, VEB G. Fischer Verlag Jena 1965, S.205.

Die Veresterung der Säure XV wurde mit Diazomethan durchgeführt. Zur Reindarstellung des Methyl-esters XVI destillierte man das Rohprodukt zweimal im Vakuum und kristallisierte anschließend aus verdünntem Methanol um. Schmp. 151°. DC: Kieselgel G Merck, Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}/\text{Eisessig} = 85:15:3$. Detektion: Dragendorffs Reagens.

Die Spaltung von XVI erfolgte durch 1/2-stündiges Erhitzen mit 20 prozentiger KOH unter Stickstoff. Die Anthranilsäure (XVII) haben wir bei pH 3 mit Äther extrahiert und zweimal dünn-schichtchromatographisch gereinigt: Kieselgel G Merck/0.5 Prozent KOH. Laufmittel 1. $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}/\text{Eisessig} = 85:13:2$; 2. Äthylacetat/Ammoniak (25 prozentig/*i*-Propanol=45:20:35. Die Detektion erfolgte unter u.v.-Licht; die Elution mit Äthanol/Methanol=1:1. Zur weiteren Reinigung kann die Anthranilsäure (XVII) im Hochvakuum sublimiert werden. Die quantitative Bestimmung wurde nach Gröger *et al.* durchgeführt.⁴⁰

Die glycinhaltige Lösung wurde zur Entsalzung über Dowex 50 (H^+) gegeben und die Aminosäure mit 1n Ammoniak eluiert. Die weitere Reinigung erfolgte dünn-schichtchromatographisch: Kieselgel G Merck, Laufmittel 1. Äthanol (70 prozentig); 2. *n*-Butanol/Wasser/Eisessig=4:1:1. Zur Elution verwendete man das erste Laufmittel.

Die quantitative Bestimmung des Glycins (XVIII) erfolgte durch Umsetzen mit Ninhydrin. Der entstehende Formaldehyd gibt mit Chromotropsäure eine kolorimetrisch auswertbare Färbung.⁴¹ Der weitere Abbau des Glycins (XVIII) gestaltet sich wie folgt: Will man die Radioaktivität vom C-1 des Glycins (XVIII) bestimmen, so setzt man die Aminosäure mit Chloramin T um und fällt das entstehende CO_2 als BaCO_3 .⁴² Das C-2 des Glycins (XVIII) wird bei dessen Umsetzung mit Ninhydrin als Formaldehyd erhalten, der mit Dimedon zu einem schwerlöslichen Derivat reagiert. Schmp. 189°.

3. Synthesen

(a) *Pegen*-(9)-[1,2,3,10- ^{14}C]=*Desoxyvasicin*. Prolin-(U- ^{14}C) wurde mit NaJO_4 oxydiert und das entstehende Δ^1 -Pyrrolin mit *o*-Aminobenzaldehyd (V) abgefangen. Weitere Einzelheiten siehe.²⁶

(b) *N-Methyl*-(^{14}C)-*anthranilsäure*. Die Darstellung dieser Verbindung erfolgte in Anlehnung an Houben und Brassert.⁴³ 137 mg umkristallisierte Anthranilsäure (XVII), 55 mg Soda und 1,4 ml H_2O wurden unter Beachtung entsprechender Vorsichtsmaßnahmen mit 157 mg $^{14}\text{CH}_3\text{J}$ in ein kleines Bombenrohr gefüllt und abgeschmolzen. Das Gemisch wurde 45 min (unter häufigem Schütteln) bei 75° gehalten. Anschließend lagerte man die Bombe einen Tag im Kühlschrank und filtrierte schließlich die Kristalle ab. Aus verdünntem Äthanol umkristallisiert erhielt man weiße Blättchen. Ausbeute 35 mg (=23 Prozent d.Th.); Schmp. 177°.

(c) *N-Formyl*-(^{14}C)-*anthranilsäure*. Bei der Darstellung dieser Verbindung arbeiteten wir in Anlehnung an v. Meyer.⁴⁴ 150 mg 32 prozentige H^{14}COOH wurden mit 130 mg umkristallisierter Anthranilsäure (XVII) in eine kleine Bombe eingeschmolzen und 90 min auf 120° erhitzt. Nach dem Öffnen der stark gekühlten Bombe wurde der Niederschlag abgesaugt und die noch vorhandene radioaktive Ameisensäure durch vorsichtiges Erwärmen im Vakuum vertrieben. Die Reinigung der *N-Formyl*-(^{14}C)-*anthranilsäure* erfolgte dünn-schichtchromatographisch: 20 g -Platten Kieselgel G Merck/0.5 Prozent KOH; Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}/\text{Eisessig} = 85:13:2$. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenz im u.v.-Licht. Nach der Elution mit Methanol wurde die Substanz in wenig Wasser gelöst und zweimal mit heißem CHCl_3 ausgeschüttelt. Der CHCl_3 -Extrakt ergab autoradiographisch saubere *N-Formyl*-(^{14}C)-*anthranilsäure*. Schmp. 168°.

(d) *Putrescin-dihydrochlorid*-1-4- ^{14}C . Na^{14}CN wurde mit Äthylenbromid zu Bernsteinsäuredinitril 1-4- ^{14}C umgesetzt, dessen katalytische Hydrierung in guter Ausbeute *Putrescin-dihydrochlorid*-1-4- ^{14}C lieferte.³⁰

(e) γ -*Hydroxyglutaminsäure*- α - ^{14}C . Die Synthese dieser Verbindung erfolgte nach Benoiton *et al.*²⁷ Setzt man β -Chlormilchsäureäthylester^{45,46} mit Acetanhydrid um, so kommt man zu α -Acetoxy- β -chlorpropionsäureäthylester.⁴⁷ Bei der Reaktion dieser Verbindung mit Acetamido-cyanessigsäureäthylester- α - ^{14}C ,^{48,49} den man aus Essigsäure-2- ^{14}C in einer mehrstufigen Reaktion synthetisiert, erhält man ein Kondensationsprodukt, aus dem durch Erhitzen mit Salzsäure die γ -Hydroxyglutaminsäure- α - ^{14}C oder das Lacton gebildet wird.

⁴⁰ D. GRÖGER, K. MOTHES, H. SIMON, H. G. FLOSS und F. WEYGAND, *Z. Naturforsch.* **16 b**, 432 (1961).

⁴¹ R. KRÜGER, *Helv. Chim. Acta* **32**, 250 (1949).

⁴² M. KNIGHT, R. S. WOLFE und S. R. ELSDEN, *Biochem. J.* **99**, 76 (1966).

⁴³ J. HOUBEN und W. BRASSERT, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **39**, 3233 (1906).

⁴⁴ E. V. MEYER, *J. Prakt. Chem.* (2) **33**, 18 (1886).

⁴⁵ E. BAER und H. O. L. FISCHER, *J. Biol. Chem.* **180**, 145 (1949).

⁴⁶ C. F. KOELSCH, *J. Am. Chem. Soc.* **52**, 1105 (1930).

⁴⁷ US.-P. 2.499.393 (1950); *Chem. Zentr.* 2590 (1952).

⁴⁸ s. a. H. R. SNYDER und C. W. SMITH, *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 350 (1944).

⁴⁹ BRIT. P. 583.307; C. A. **41**, 2747 (1947).

(f) *Anthranilsäure*-($^{14}\text{COOH}$). Diese Verbindung wurde nach der Vorschrift von Munsche und Schütte⁵⁰ hergestellt: *o*-Nitroanilin wird diazotiert und mit einer Lösung von $\frac{1}{3}$ CuCN und $\frac{2}{3}$ Na ^{14}CN durch Sandmeyer-Reaktion in *o*-Nitrobenzotrinitril-(^{14}CN) überführt. Durch Verseifen der Nitrilgruppe und Reduktion der Nitrogruppe erhält man Anthranilsäure($^{14}\text{COOH}$).

Für die Förderung dieser Arbeit sei Herrn Prof. Dr. Drs. h. c. K. Mothes herzlich gedankt.

⁵⁰ D. MUNSCH und H. R. SCHÜTTE, *Z. Chem.* **3**, 230 (1963).

Anmerkung bei der Korrektur—Aus *Anisotes sessiliflorus* C. B. Cl. wurden fünf neue 4-Chinazolonalkaloide isoliert C. R. R. Arndt *et al.*

Tetrahedron **23**, 3521 (1967). S. Mann berichtete über das Vorkommen von Derivaten des 4-Methylchinazolins in *Pseudomonas aeruginosa* (*Arch. f. Mikrobiol.* **56**, 324 (1967).)