

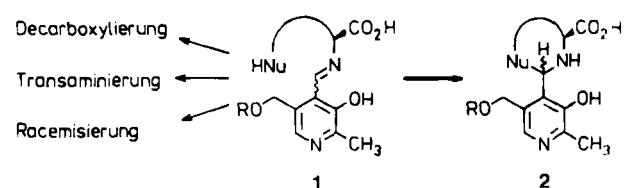
Erster Nachweis endogener Pyridoxylisochinolin-Alkaloide im Säugerorganismus**

Von Gerhard Bringmann* und Stephan Schneider

Die Leichtigkeit, mit der sich die Biosynthese der Isochinolin-Alkaloide aus Arylethylaminen und Aldehyden oder α -Ketosäuren *in vitro* nachvollziehen läßt^[1], führte schon früh zu der Annahme^[2], daß derartige Kondensationsreaktionen auch im Säugerorganismus, z. B. nach Alkoholkonsum^[3], ablaufen könnten. Vor allem der Aldehyd Pyridoxal 5, zentrales Coenzym des Aminosäure-Stoffwechsels, könnte mit körpereigenen dinucleophilen Aminen – über die biochemisch vertrauten intermediären Schiff-Basen 1 – auch zu Alkaloid-artigen Produkten 2 cyclisieren (Schema 1). Wir berichten hier über den ersten Nachweis der *in-vivo*-Entstehung neuartiger, auch im Pflanzenreich unbekannter Alkaloide im Säugerorganismus aus Vitamin B₆ 3 und L-Dopa 4, die bei einigen Stoffwechsel-Erkrankungen, z. B. beim Parkinsonismus^[4] oder bei der Homocystinurie^[5], in unphysiologisch hohen Dosen, oft in Grammengen, verabreicht werden.

In vorgeschalteten *in-vitro*-Modellreaktionen konnten wir zunächst die Vitamin-B₆-abgeleiteten Isochinolin-Alkaloide 8–11 (Schema 2) unter physiologischen Bedingungen verabreicht werden.

Decarboxylierung
Transaminierung
Racemisierung



Schema 1.

Tabelle 1. ^1H -NMR-Daten der Kondensationsprodukte 8, 9, 10 und 11 (300 MHz, Tetramethylsilan oder [2,3-D₄]-3-Trimethylsilyl-propionsäure-Natriumsalz int., δ -Werte).

	8 (DCI/D ₂ O)	9 (CD ₃ SOCD ₃)	10 (CD ₃ SOCD ₃)	11 (CD ₃ SOCD ₃)
1-H	4.85 (mc)	5.26 (mc)	5.40 (mc)	5.35 (mc)
3-H _c	1.91 (ddd, $J = 17.0, 4.5, 1.9$ Hz)	{ 2.58 (mc) 2.86 (mc)}	3.60 (dd, $J = 10.4, 3.9$ Hz)	3.67 (dd, $J = 10.9, 4.3$ Hz)
3-H _a	2.13 (ddd, $J = 17.0, 12.0, 5.5$ Hz)	{ 2.89 (mc) 3.26 (mc)}	—	—
4-H _c	2.69 (ddd, $J = 13.1, 5.5, 1.9$ Hz)	{ 6.48 (s) 6.04 (s)}	2.98 (dd, $J = 16.2, 3.9$ Hz)	2.95 (dd, $J = 15.6, 4.3$ Hz)
4-H _a	2.43 (ddd, $J = 13.1, 12.0, 4.5$ Hz)	{ 7.94 (s) 7.33 (s)}	2.90 (ddd, $J = 16.2, 10.4, 0.7$ Hz)	2.85 (ddd, $J = 15.6, 10.9, 0.8$ Hz)
5-H	{ nicht registrierbar }	{ 6.55 (s) 6.00 (s)}	6.54 (s)	6.54 (s)
6'-H	7.33 (s)	7.99 (s)	7.96 (s)	7.96 (s)
5'-CH ₂	4.15 (dd, $J = 12.9, 7.0$ Hz) 4.26 (dd, $J = 12.9, 7.8$ Hz)	4.56, 4.64 (2d, $J = 12.8$ Hz)	4.98 (mc)	4.55, 4.62 (2d, $J = 12.7$ Hz)
CH ₃	1.55 (s)	2.22 (s)	2.27 (s)	2.24 (s)

[*] Priv.-Doz. Dr. G. Bringmann, Dipl.-Chem. S. Schneider
Organisch-chemisches Institut der Universität
Orléansring 23, D-4400 Münster

[**] Endogene Alkaloide im Menschen, 2. Mitteilung. Diese Arbeit wurde vom Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen sowie vom Fonds der Chemischen Industrie (Sachmittel und ein Promotionsstipendium für S. S.) gefördert. Wir danken Priv.-Doz. Dr. K. D. Richter, Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung der Universitätskliniken Münster, für wertvolle Anregungen und Frau Dipl.-Chem. M. Ztsika für experimentelle Hilfe bei den Versuchen. - 1. Mitteilung: G. Bringmann, Naturwissenschaften 66 (1979) 22.

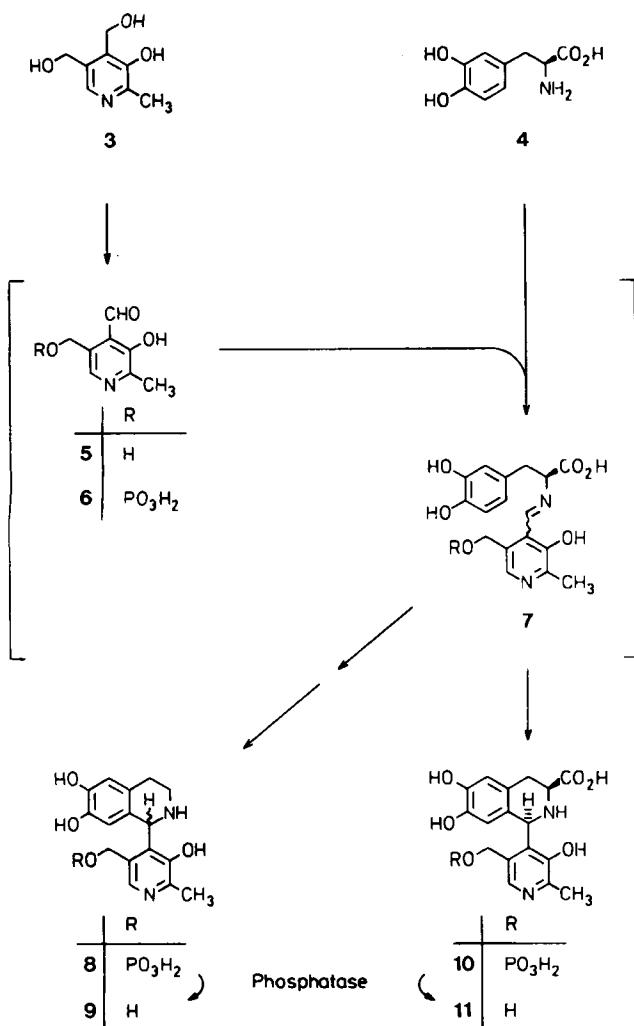
gen^[6] (Wasser, pH 6–8, 35 °C) aus Pyridoxal 5 oder Pyridoxalphosphat 6 und L-Dopa 4 oder Dopamin synthetisieren, wobei 7 als Zwischenstufe wahrscheinlich ist. Nach Aufklärung ihrer Konstitution und Konfiguration^[7] (^1H -NMR-Daten in Tabelle 1) wurde eine auf diese extrem polaren, teilweise mehrfach zwitterionischen Substanzen zugeschnittene Analytik erarbeitet. Auf der Basis Ionenpaar-assistierter Umkehrphasen-HPLC (RP 18; 0.01 M H_3PO_4 in $\text{H}_2\text{O} + 0.3\%$ Natriumdodecylsulfat / 0.01 M H_3PO_4 in CH_3OH) fanden wir Bedingungen, die eine effiziente chromatographische Trennung und Detektierung im Nanogrammbereich, auch in komplexen biologischen Systemen, gestatten.

Nach intravenöser Applikation therapeutisch üblicher Dosen (20 mg/kg) Pyridoxin 3 und L-Dopa 4 an Wistar-Ratten ließ sich allerdings das erwartete Isochinolin 11 im Blut nicht nachweisen, nicht einmal dann, wenn statt 3 der kondensationsfähige Aldehyd Pyridoxal 5 injiziert wurde. Stattdessen fanden wir in beiden Fällen noch stärker polare Metabolite, die chromatographisch (HPLC; siehe oben) den O-phosphorylierten Heterocyclen 8 und 10 gleichen.

Zur Sicherung der Identität von 8 und 10 und zur zusätzlichen Quantifizierung führten wir die Tierversuche mit [$4,5\text{-}^{14}\text{C}$]Pyridoxin 3* durch. Zur umgekehrten Isotopenverdünnungsanalyse wurde nach Inkubation (2–6 h) das aus venösem Blut gewonnene Blutplasma mit inaktivem 8 bzw. 10 und mit inaktivem Edukt 3 versetzt. Nach Behandlung mit 5proz. Trifluoressigsäure wurden die Proteine abzentrifugiert und die überstehende Lösung gefriergetrocknet. Durch präparative HPLC (Bedingungen siehe oben) und anschließende Abtrennung des Ionenpaarreagens erhielt man 8* und 10*, die durch Kristallisation bis zur konstanten Radioaktivität gereinigt wurden. Um erste Hinweise über die Verteilung dieser neuartigen Metabolite

im Körper und ihre mögliche Biotransformation zu erhalten, wurde in jedem Fall auch die Leber analysiert. Die Ergebnisse der Tierversuche sind in Tabelle 2 zusammengefaßt^[8]. Zum weiteren Strukturbeweis ließen sich die Alkaloide 8* und 10* *in vitro* mit einer sauren Phosphatase (E.C. 3.1.3.2) zu den radioaktiven Alkoholen 9* und 11* dephosphorylieren.

Mit diesem Nachweis von Pyridoxylisochinolin-Alkaloiden im lebenden Säugerorganismus wird die bekannte Palette fein abgestimmter, enzymatisch gesteuerter Reaktion-



Schema 2. In-vitro- und in-vivo-Bildung von Pyridoxylisochinolin-Alkaloiden.

nen von Vitamin B₆ noch erweitert durch die wahrscheinlich nichtenzymatische Pictet-Spengler-Kondensation zu heterocyclischen Metaboliten.

Tabelle 2. Ergebnisse der umgekehrten Isotopenverdünnungsanalyse nach Applikation von Pyridoxin 3* (10 µCi, 20 mg/kg) und L-Dopa 4 (20 mg/kg) an Ratten.

Isoliertes Alkaloid (Probe)	Inkubationszeit [h]	Gesamt-radioaktivität [nCi]	Absolute Einbaurate [%] × 10 ²	Alkaloidgehalt [ng/mL bzw. ng/g]
8 (Blut)	4	1.9	1.9	133
8 (Blut)	6	3.0	3.0	206
8 (Leber)	6	0.2	0.2	28
10 (Blut)	2	0.7	0.7	53
10 (Blut)	4	0.8	0.8	57
10 (Leber)	6	<0.007	<0.007	<1

Eingegangen am 2. Oktober,
ergänzte Fassung am 11. November 1985 [Z 1481]

[1] W. Whaley, T. Govindachari, *Org. React.* 6 (1951) 151.

[2] P. Holtz, K. Stock, F. Westermann, *Nature (London)* 203 (1964) 656.

[3] Siehe z. B. M. Sandler, S. Carter, K. Hunter, G. Stern, *Nature (London)* 241 (1973) 439; J. L. Cashaw, K. McMurtrey, H. Brown, V. E. Davis, *J. Chromatogr.* 99 (1974) 567; M. A. Collins, W. Nijm, G. Borge, G. Teas, C. Goldfarb, *Science* 206 (1979) 1184. Übersicht: M. A. Collins in A. Brossi: *The Alkaloids*, Bd. XXI, S. 329, Academic Press, New York 1983.

[4] H. Bader: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Edition Medizin, Verlag Chemie, Weinheim 1983.

[5] H. Grobe, *Dtsch. Med. Wochenschr.* 98 (1973) 1313.

[6] C. Schöpf, H. Bayerle, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 513 (1934) 190.

[7] Die Konfiguration des Pyridoxyl-Substituenten an C-1 in 10 und 11 ließ sich ¹H-NMR-spektroskopisch aus der ³J-Kopplung zwischen 1-H_a und 4-H_b als äquatorial, damit *cis* bezüglich der äquatorialen Carboxygruppe und somit als (1*R*) ermitteln. Zur massenspektrometrischen Analyse wurden 8 und 10 enzymatisch zu 9 und 11 dephosphoryliert (saure Phosphatase, H₂O, pH 5), da sie als Phosphorsäureester auch nicht durch schonende Ionisationstechniken (Felddesorption oder Fast Atom Bombardment) erfassbar waren. – Über die Darstellung dieser Kondensationsprodukte wurde bereits berichtet, ihre spektroskopische Charakterisierung war jedoch unvollständig, wobei vor allem die Konfiguration möglicher epimerer Produkte vernachlässigt wurde: E. A. Rudd, W. C. Cunningham, J. W. Thanassi, *J. Med. Chem.* 22 (1979) 233; C. Borri Voltorini, A. Orlacchio, A. Giartosio, F. Conti, C. Turano, *Eur. J. Biochem.* 53 (1975) 151; T. Kametani, M. Koizumi, K. Okui, Y. Nishii, M. Ono, *J. Med. Chem.* 15 (1972) 203; J. H. Fellman, E. S. Roth, *Biochemistry* 10 (1971) 408; H. F. Schott, W. G. Clark, *J. Biol. Chem.* 196 (1952) 449.

[8] Bei der Bewertung der absoluten Einbauraten (Gesamtradioaktivität der isolierten Alkaloide dividiert durch die der markierten Vorstufe 3 × 100) ist zu berücksichtigen, daß die dem Körper vertrauten Vorstufen nach ihrer Verteilung im lebenden Organismus auch in konkurrierende Stoffwechselwege einfließen und daß darüber hinaus auch die Alkaloide ihrerseits rasch weiter umgewandelt zu werden scheinen.

Der Ferrocenylmethyl(Fem)-Rest als hochlipophile und chromophore Gruppe zur Maskierung von Peptidbindungen**

Von Heiner Eckert* und Christoph Seidel

Für eine neue Strategie zur Chemosynthese von Peptiden^[1], die durch Verwendung stark lipphiler und chromophorer Gruppen gekennzeichnet ist, wurde eine Methode zur Maskierung von Peptidbindungen entwickelt. Die Behandlung der chemisch reaktiven funktionellen Gruppen ist durch die konventionellen Schutzgruppentechniken^[2] weitgehend abgedeckt. Peptidbindungen sind hingegen vor allem „physikalisch reaktiv“, das heißt, sie haben großen Einfluß auf Sekundärstruktur und Löslichkeit eines Peptids. Solche Konformationseffekte erschweren oft die Synthese. Versuche, diese Effekte zu verhindern^[3], wurden von Weygand et al. mit dem 2,4-Dimethoxybenzyl-Rest^[3a] unternommen. Ugi et al. erkannten die präparative Nützlichkeit der lipophilen und chromophoren Ferrocenylalkyl-Gruppierung in stereospezifischen Reagentien^[3b]. Von Ragnarsson et al. wurde kürzlich die *tert*-Butoxycarbonylierung der Peptidbindung in einem Prolyl-glycin-Derivat^[3c] beschrieben.

Der chromophore (gelbe) Ferrocenylmethyl(Fem)-Rest^[4] ermöglicht eine wirtschaftlich günstige, regenerative Maskierung von Peptidbindungen zur Unterdrückung oder Manipulation von Sekundärstrukturen und zur lipophilen Solubilisierung von Peptid-Derivaten. Der Fem-Rest kann durch einfache katalytische reduktive Alkylierung von Aminosäuren oder Aminosäure-estern mit kommerziell erhältlichem Ferrocencarbaldehyd 1 und Wasserstoff eingeführt werden. Als Hydrierkatalysator kommt das hochselektive Palladium(II)-phthalocyanin^[5] in Betracht: Während 1 nur äußerst langsam reduziert wird, lässt sich das aus 1 und der Aminosäure bzw. dem Aminosäureester erhaltenen Azomethin 2 innerhalb einiger Stunden hydrieren. Dabei entstehen die Fem-Aminosäuren bzw. deren Ester racemisierungsfrei und in hohen Ausbeuten (Tabelle 1),

[*] Dr. H. Eckert, C. Seidel

Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.