

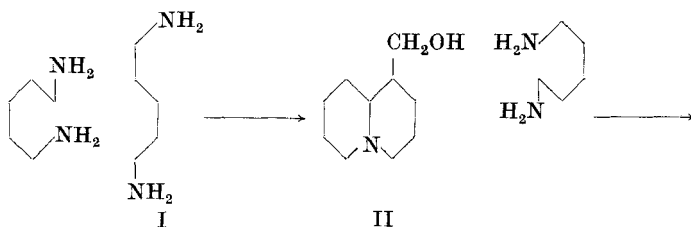
Zur Biosynthese der Papilionaceen- Alkaloide. XII<sup>1)</sup>**Biosynthese des Cytisins**

Von H. R. SCHÜTTE und J. LEHFELDT

*Professor Wolfgang Langenbeck zum 65. Geburtstage gewidmet***Inhaltsübersicht**

Zur Untersuchung der Biosynthese des Cytisins wurden Cadaverin-(1,5-<sup>14</sup>C) und Lysin-(2-<sup>14</sup>C) an *Cytisus laburnum* verabreicht. Für die Alkaloide Cytisin und N-Methyleytisin wurden die spezifischen Einbauraten bestimmt. Durch einen übersichtlichen Abbau konnten die Kohlenstoffatome 2,3,4,5 und 11 auf ihre Radioaktivität hin untersucht werden. Ein möglicher Biosyntheseweg des Cytisins wird diskutiert.

In früheren Mitteilungen wurde gezeigt, daß die Papilionaceen-Alkaloide Spartein<sup>2)</sup> <sup>3)</sup> (III), Lupanin<sup>4)</sup> <sup>5)</sup>, Hydroxylupanin<sup>4)</sup> und Matrin<sup>6)</sup> aus drei Molekülen Cadaverin-(1,5-<sup>14</sup>C) (I) spezifisch gebildet werden können. Möglicherweise wird dabei die Stufe des Lupinins(II) oder eines Äquivalentes durchschritten, wie es in der Formelreihe aufgezeigt ist. Für Lupinin ist bekannt, daß es aus zwei Molekülen Cadaverin-(1,5-<sup>14</sup>C) entstehen kann<sup>2)</sup> <sup>7)</sup> <sup>8)</sup>.



<sup>1)</sup> Als XI. Mitteilung gilt H. R. SCHÜTTE, K. L. KELLING, D. KNÖFEL u. K. MOTHES, *Phytochemistry* im Druck; X. Mitteilung H. R. SCHÜTTE, G. SANDKE u. J. LEHFELDT, *Arch. Pharmaz.* im Druck.

<sup>2)</sup> H. R. SCHÜTTE, *Arch. Pharmaz.* **293**, 1006 (1960).

<sup>3)</sup> H. R. SCHÜTTE, F. BOHLMANN u. W. REUSCHE, *Arch. Pharmaz.*, **294**, 610 (1961).

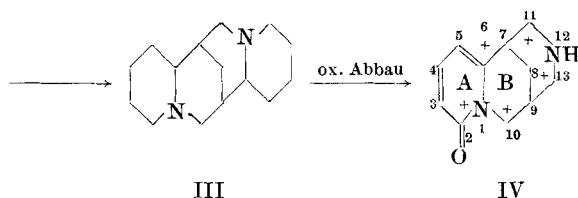
<sup>4)</sup> H. R. SCHÜTTE, E. NOWACKI u. CH. SCHÄFER, *Arch. Pharmaz.* **295**, 20 (1962).

<sup>5)</sup> H. R. SCHÜTTE u. CH. SCHÄFER, *Naturwissenschaften*, **48**, 669, (1961).

<sup>6)</sup> H. R. SCHÜTTE, H. ASLANOW u. CH. SCHÄFER, *Arch. Pharmaz.* **295**, 34, (1962).

<sup>7)</sup> H. R. SCHÜTTE u. E. NOWACKI, *Naturwissenschaften*, **46**, 493, (1959).

<sup>8)</sup> M. SOUČEK u. H. R. SCHÜTTE, *Angew. Chem.*, **74**, 901, (1962).



Wegen der strukturellen Ähnlichkeit des Cytisins(IV) und des N-Methylcytisins(V) mit dem Spartein lag die Vermutung nahe, daß auch bei der Biosynthese des Cytisins das Cadaverin oder ein entsprechendes biochemisches Äquivalent als Vorstufe in Frage kommt. Tatsächlich konnten wir feststellen, daß sowohl Cadaverin-(1,5-<sup>14</sup>C) als auch Lysin-(2-<sup>14</sup>C) unter Berücksichtigung der präformierten Alkaloidmenge mit einer relativ hohen Einbaurrate in die Alkaloide von *Cytisus laburnum*, Cytisin und N-Methylcytisin, inkorporiert werden (vgl. Tab. 1 und 2).

Tabelle 1  
Spezifische Einbauraten von Cadaverin-(1,5-<sup>14</sup>C)  
in Cytisin und N-Methylcytisin in *Cytisus laburnum*

Verbindung	spez. Radioaktivität	spez. Einbaurrate in %
Cadaverin-(1,5- <sup>14</sup> C)	1,75 · 10 <sup>9</sup> Imp/min/mMol	
Cytisin	8,8 · 10 <sup>5</sup> Imp/min/mMol	0,05
N-Methylcytisin	7 · 10 <sup>5</sup> Imp/min/mMol	0,04

Tabelle 2  
Spezifische Einbauraten von Lysin-(2-<sup>14</sup>C) in Cytisin  
und N-Methylcytisin in *Cytisus laburnum*

Verbindung	spez. Radioaktivität	spez. Einbaurrate in %
Lysin-(2- <sup>14</sup> C)	4,5 · 10 <sup>9</sup> Imp/min/mMol	
Cytisin	4,75 · 10 <sup>5</sup> Imp/min/mMol	0,01
N-Methylcytisin	5,2 · 10 <sup>5</sup> Imp/min/mMol	0,011

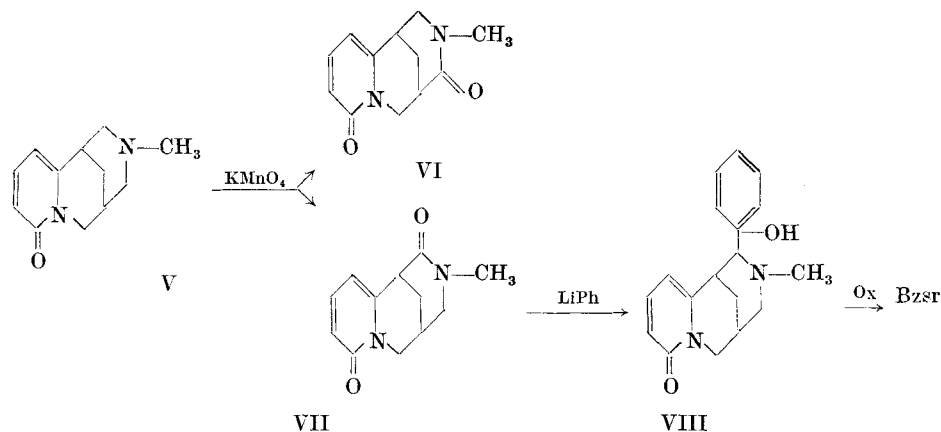
Die Biosynthese des Cytisins könnte dabei auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zunächst wäre es möglich, daß sich aus zwei Cadaverineinheiten ein Lupiningerüst bildet, das mit Hilfe eines Stickstoff- und eines C<sub>1</sub>-Körpers den Ring C schließt, oder es entsteht zuerst Spartein, das oxydativ zum Cytisin abgebaut wird. Der letzte Weg wird durch die Tatsache unterstützt, daß Cytisin bzw. N-Methylcytisin in der Natur sehr oft mit Spartein, Anagy-

rin und ähnlichen Alkaloiden vergesellschaftet vorkommt<sup>9)</sup>. N-Methylcytisin entsteht durch eine sekundäre Methylierungsreaktion<sup>10)</sup>.

Zur Untersuchung einer spezifischen Inkorporation wurde ein übersichtlicher chemischer Abbau des Cytisins durchgeführt. Dabei konnten die Kohlenstoffatome 2, 3, 4, 5 und 11 getrennt auf ihre Radioaktivität hin geprüft werden. Die mit einem Kreuzchen versehenen C-Atome sollten nach der Theorie radioaktiv sein.

Zur Eliminierung des Kohlenstoffatoms 2 wurde das gereinigte Cytisin zum Tetrahydrocytisin hydriert. Durch Umsatz mit Lithiumphenyl und anschließender Oxydation mit Kaliumpermanganat ließ sich das C-Atom 2 als Carboxylgruppe der dabei entstehenden Benzoesäure erhalten. In einem weiteren Versuch wurde durch erschöpfende Oxydation des Tetrahydrocytisins mit Chromsäure Bernsteinsäure erhalten. Sie kann nur aus dem Ring A gebildet werden. Sowohl die Benzoesäure als auch die Bernsteinsäure enthielten etwa ein Fünftel der Gesamtradioaktivität (vgl. Tab. 3). Daraus folgt, daß die C-Atome 3, 4 und 5 inaktiv sind.

Zur Eliminierung des C-Atoms 11 wird N-Methylcytisin vorsichtig mit Kaliumpermanganat oxydiert. Dabei entsteht nach ING<sup>11)</sup> neben N-Methyl- $\beta$ -cytisamid (VI) hauptsächlich N-Methyl- $\alpha$ -cytisamid (VII), das durch Umkristallisieren aus abs. Benzol gereinigt werden kann. Setzt man diese Verbindung mit Lithiumphenyl um (VIII) und oxydiert anschließend mit Kaliumpermanganat, so kann das C-Atom 11 wiederum in Form von Benzoesäure eliminiert werden.



<sup>9)</sup> H. G. BORT, Ergebnisse der Alkaloidchemie bis 1960, Akademie-Verlag Berlin 1961, S. 177ff.

<sup>10)</sup> M. PÖHM, Mh. Chem. **90**, 58, (1959); M. PÖHM, Mh. Chem. **88**, 597 (1957).

<sup>11)</sup> H. R. ING, J. chem. Soc. London **1932**, 2778.

Die Benzoessäure aus C-Atom 11 enthält 17,5% der Gesamtaktivität, was mit der Theorie gut übereinstimmt (vgl. Tab. 3)

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das Cytisin durch Abbau eines Sparteingerüsts entsteht. Diese Deutung ist auch in Übereinstimmung mit Versuchen, nach denen Na-Formiat- $^{14}\text{C}$  als  $\text{C}_1$ -Körper mit wesentlicher geringerer Einbaurrate inkorporiert wird als Cadaverin-(1,5- $^{14}\text{C}$ ) bzw. Lysin-(2- $^{14}\text{C}$ ).

Tabelle 3  
Spez. Radioaktivitäten der Cytisin-  
Abbauprodukte

Verbindung	spez. Radioaktivität	
	gefunden	berechnet
Cytisin	100%	100%
Bernsteinsäure	21%	20%
Benzoessäure ( $\text{C}_2$ )	19%	20%
Benzoessäure ( $\text{C}_{11}$ )	17,5%	20%

### Beschreibung der Versuche

Jeweils 10 Sprosse von *Cytisus laburnum* wurden durch Aufsaugen über den Stengel mit Cadaverin-(1,5- $^{14}\text{C}$ )-dihydrochlorid, Lysin-(2- $^{14}\text{C}$ )-hydrochlorid und Na-Formiat- $^{14}\text{C}$  gefüttert. Pro Pflanze wurden etwa 0,5–1,0 mg der jeweiligen radioaktiven Verbindung verabreicht. Die Inkubationszeit betrug 4 Tage.

Zur Aufarbeitung spülte man die gefütterten Pflanzen mit destilliertem Wasser ab, trocknete, mahlte und extrahierte sie nach Zugabe einer geringen Menge an methanolischer KOH mit Chloroform. Der Chloroformextrakt wurde mit 2n Salzsäure ausgeschüttelt, die wäßrige Lösung alkalisch gemacht und mit Chloroform extrahiert. Nach dem Trocknen und Abdampfen des Chloroforms ließ sich der Rückstand papierchromatographisch in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) als Hydrochlorid auftrennen. Die mit DRAGENDORFF-Reagenz angefärbten Alkaloide wurden mit verdünnter Schwefelsäure eluiert, aus alkalischer Lösung erneut mit Chloroform ausgeschüttelt und rechromatographiert. Dabei fand die Dünnschichtchromatographie (Kieselgel nach STAHL, MERCK, Laufmittel Benzol-Methanol 80:20) Anwendung. Mit Hilfe dieser Methode konnten gleichzeitig Cytisin und N-Methyl-cytisin getrennt werden. Die wiederum eluierten Alkaloide wurden mit inaktivem Material verdünnt und in Form ihrer Pikrate bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität aus Wasser umkristallisiert.

### Spaltung des Cytisin- bzw. N-Methylecystinipikrates

380 mg Cytisinpikrat bzw. 420 mg N-Methylecystinipikrat wurden in 100 ml heißem Wasser gelöst und bei etwa 50–60° über eine Säule ( $\varnothing$  1,5 cm, Länge 5 cm) von Ionenaustauscher Wofatit L 150 in der OH-Form filtriert. Es wurde mit 100 ml warmem Wasser nachgespült und die vereinigten Eluate alkalisch mit Chloroform extrahiert. Die Ausbeute an freier Base war fast quantitativ.

### Abbau des Cytisins durch erschöpfende Chromsäureoxydation

150 mg Cytisin löste man in 15 ml Eisessig und hydrierte nach Zugabe von 70 mg  $\text{PtO}_2$  als Katalysator. Bereits nach 1–2 Stunden war die Hydrierung beendet. Das Platin wurde

abfiltriert, die Essigsäure im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst und alkalisch mit Chloroform extrahiert.

Den Rückstand des Chloroformextraktes löste man in wenig Wasser. Dazu wurde die Hälfte einer Lösung von 900 mg Chromoxyd in 2,6 ml Wasser und 0,8 ml konz. Schwefelsäure gegeben und im Wasserbad erhitzt. Der Rest wurde nach einer Stunde zugegeben. Nach etwa 20 Stunden setzte man weitere 400 mg Chromoxyd zu. Die Gesamtzeit der Reaktion betrug 72 Stunden. Anschließend wurde die überschüssige Chromsäure mit Schwefeldioxyd reduziert und 48 Stunden mit Äther extrahiert. Der Äther wurde gut getrocknet und abgedampft. Der Rückstand bestand zum größten Teil aus Bernsteinsäure. Zur Reinigung wurde sie im Hochvakuum bei 110–120° bis zur konstanten spez. Radioaktivität sublimiert. Ausbeute 5–10 mg.

### Phenylierung des Cytisins mit Lithiumphenyl und Oxydation zu Benzoesäure

Das nach obiger Hydrierung erhaltene Tetrahydrocytisin löste man in 2 ml abs. Benzol und versetzte unter Stickstoff mit einem Überschuß an Lithiumphenyl. Man kochte 3 Stunden am Rückfluß und ließ über Nacht stehen, Anschließend wurde in der Kälte mit verd. Salzsäure zersetzt und zur Entfernung von eventuell entstandenem Diphenyl mehrere Male mit Äther ausgeschüttelt. Das phenylierte Cytisin wurde durch Extraktion mit Chloroform aus alkalischer Lösung erhalten. Auf eine Reinigung verzichtete man.

Zur Oxydation wurde der Rückstand des Chloroformextraktes in 4 ml Wasser suspendiert, mit 500 mg  $\text{KMnO}_4$  versetzt und 1 Stunde gekocht. Den entstandenen Braunstein reduzierte man mit  $\text{SO}_2$  und extrahierte die klare Lösung sauer mit Äther. Aus dem getrockneten Äther ließ sich durch Abdampfen die Benzoesäure gewinnen. Sie wurde bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität bei 120° sublimiert. Ausbeute 4–8 mg.

### Darstellung des N-Methyl- $\alpha$ -Cytisamid

200 mg N-Methylcytisin wurden in 5 ml Wasser gelöst und bei 5° tropfenweise mit einer gesättigten  $\text{KMnO}_4$ -Lösung versetzt, bis die Lösung einige Zeit rotbraun gefärbt blieb. Man ließ einige Stunden stehen, bis sich alles  $\text{MnO}_2$  abgeschieden hatte und filtrierte. Der Niederschlag wurde einige Male mit Wasser gewaschen und die vereinigten Filtrate mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung trocknete man, dampfte das Chloroform ab und löste den Rückstand in wenig heißem abs. Benzol. Nach einiger Zeit schieden sich schwach gefärbte Kristalle ab. Sie hatten einen Schmelzpunkt von 210–215° und stellten reines N-Methyl- $\alpha$ -cytisamid dar.

Ausbeute 50–60 mg.

Der Abbau zur Benzoesäure erfolgte wie oben beschrieben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. K. MOTHES danken wir für die großzügige Förderung der Arbeit und für viele wertvolle Ratschläge.

Halle (Saale), Institut für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.

Bei der Redaktion eingegangen am 15. Oktober 1963.