

Eine enzymatische Synthese der Alkaloide Hygrin, Cuskhygrin, Isopelletierin und Methylisopelletierin

Von

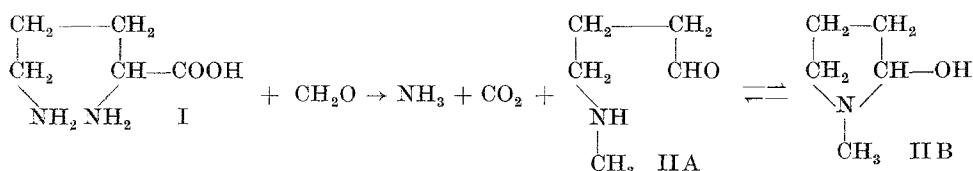
Hans Tuppy und Monier Shaker Faltaous*

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

(Eingegangen am 8. Januar 1960)

In Gegenwart des Enzyms Diaminoxydase entsteht in einer bei pH 7,6 gepufferten und belüfteten Mischung von N-Methylputrescin und Acetessigsäure das Alkaloid Hygrin. Wird die Acetessigsäure durch Acetondicarbonsäure ersetzt, so bilden sich Hygrin und Cuskhygrin. Cadaverin und N-Methylcadaverin geben bei der enzymatischen Oxydation in Gegenwart von Acetessigsäure Isopelletierin und Methylisopelletierin. Diese Reaktionen verlaufen mit befriedigender Ausbeute und sind mit Hinblick auf die Biogenese der Alkaloide von Interesse.

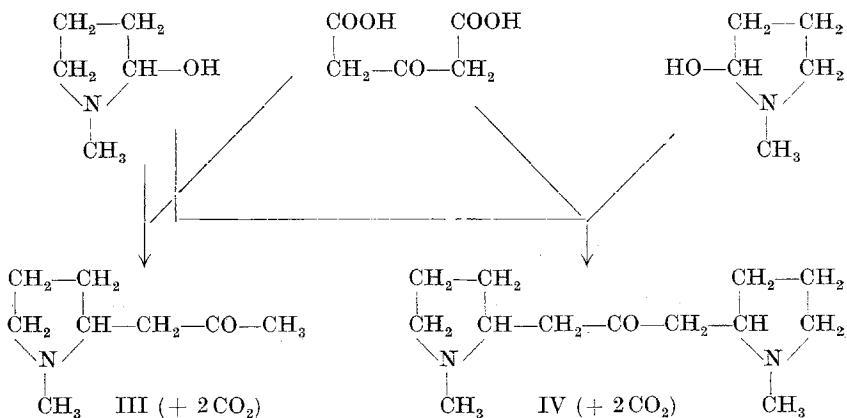
Die grundlegende Theorie der Alkaloid-biogenese, die von *R. Robinson*¹ im Jahre 1917 veröffentlicht wurde, sah für die Pyrrolidin-alkaloide Hygrin und Cuskhygrin folgende Bildungsweise vor: Zunächst werde Ornithin (I) durch Formaldehyd methyliert, oxydiert und decarb-



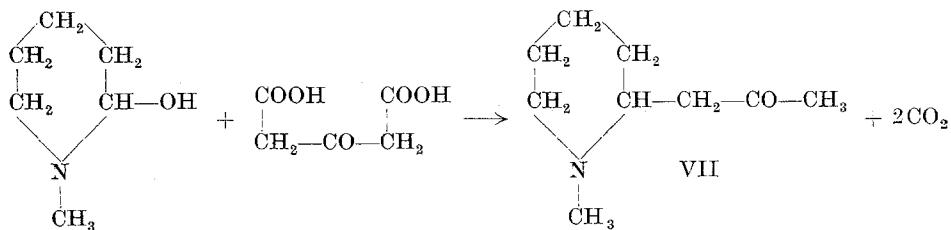
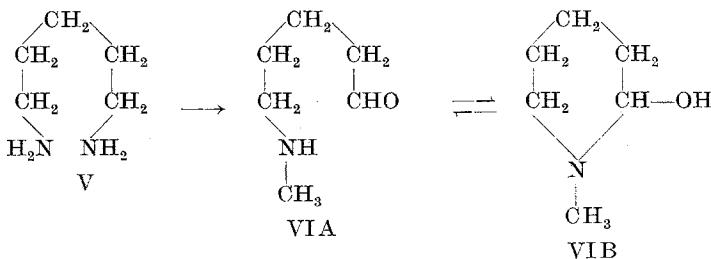
oxydiert; sodann reagierten ein oder zwei Moleküle des entstandenen γ -Methylamino-butyraldehyds (II A) bzw. des ihm isomeren Carbinolamins (II B) mit Acetondicarbonsäure zu Hygrin (III) und Cuskhy-

* Faculty of Veterinary Medicine, Cairo.

¹ R. Robinson, J. Chem. Soc. [London] 111, 876 (1917).



grin (IV). Auf analoge Weise formulierte *Robinson* auch die Entstehung des Methylisopelletierins (VII) aus Lysin (V), bei der δ -Methylamino-



valeraldehyd (VI A) oder das isomere α -Hydroxy-N-methylpiperidin (VI B) intermediär auftreten und mit Acetondicarbonsäure reagieren sollte.

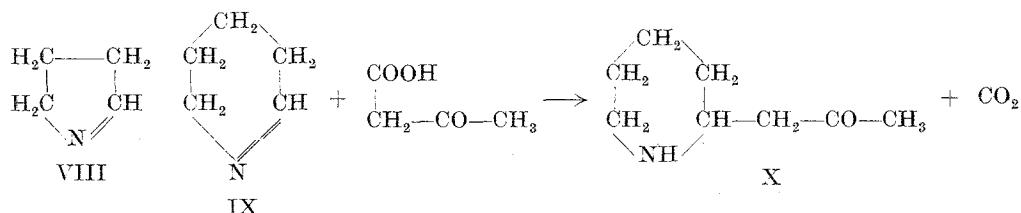
Den experimentellen Beweis, daß γ -Methylamino-butyraldehyd (II A) und δ -Methylamino-valeraldehyd (VI A) bzw. die Carbinolamine (II B und VI B) unter zellmöglichen Bedingungen in der von *Robinson* vorausgeschenen Art mit β -Ketosäuren reagieren, haben *Anet*, *Hughes* und *Ritchie*² sowie *Galinovsky*, *Wagner* und *Weiser*³ erbracht. Diese Autoren

² *E. Anet, G. K. Hughes* und *E. Ritchie*, Nature **163**, 289 (1949); **164**, 501 (1949).

³ *F. Galinovsky, A. Wagner* und *R. Weiser*, Mh. Chem. **82**, 551 (1951).

zeigten, daß II, durch schonende Hydrolyse des γ -Methylamino-butyraldehyd-acetals oder durch Reduktion von N-Methylpyrrolidon mit $\frac{1}{4}$ Mol Lithiumaluminiumhydrid dargestellt, bei der Umsetzung mit Acetessigsäure und Acetondicarbonsäure in guter Ausbeute die Alkaloide Hygrin (III) und Cuskhygrin (IV) ergibt; ebenso setzt sich VI, durch saure Hydrolyse seines Acetals oder durch Reduktion des N-Methyl-piperidons gewonnen, mit Acetessigsäure oder Acetondicarbonsäure glatt zu Methylisopelletierin (VII) um.

*Schöpf*⁴, der sich eingehend mit der Chemie des Δ^1 -Pyrrolins (VIII) und Δ^1 -Piperideins (IX) befaßte, sah in diesen am Stickstoff nicht methylierten Heterocyclen wahrscheinliche Zwischenprodukte der Synthese der Alkaloide von der Art des Hygrins und Isopelletierins. Er konnte experimentell zeigen, daß Isopelletierin (X) sich unter physiologischen



Reaktionsbedingungen aus Δ^1 -Piperidein (IX) und Acetessigsäure bilden kann⁵. Auch *Anet, Hughes* und *Ritchie*² sowie *Galinovsky* und Mitarbeiter³ beschrieben die Erzeugung von Isopelletierin durch Umsetzung von chemisch dargestelltem Piperidein mit Acetessigsäure oder Acetondicarbonsäure.

Bezüglich der Biogenese der von *Robinson* und von *Schöpf* für Zwischenprodukte der natürlichen Alkaloid-Synthese gehaltenen Verbindungen II, VI, VIII und IX sind heute schon etwas klarere Vorstellungen möglich. Δ^1 -Pyrrolin (VIII) und Δ^1 -Piperidein (IX) können, wie *Mann* und *Smithies*⁶ sowie *Hasse* und *Maisack*⁷ experimentell dargetan haben, aus Putrescin und Cadaverin, den Decarboxylierungsprodukten des Ornithins und Lysins, unter der Einwirkung des Enzyms Diaminoxydase entstehen. Nach *Zeller*⁸ sind nicht nur Putrescin und Cadaverin, sondern auch N-Methylputrescin und N-Methylcadaverin Substrate der Diamin-

⁴ C. Schöpf, Angew. Chem. **61**, 31 (1949).

⁵ C. Schöpf, F. Braun, K. Burkhardt, G. Dummer und H. Müller, Ann. Chem. **626**, 123 (1959).

⁶ P. J. G. Mann und W. R. Smithies, Biochem. J. **61**, 89 (1955).

⁷ K. Hasse und H. Maisack, Naturwiss. **42**, 627 (1955); Biochem. Z. **327**, 296 (1955).

⁸ E. A. Zeller, J. R. Fouts, J. A. Carbon, J. C. Lazanas und W. Voegtli, Helv. Chim. Acta **39**, 1632 (1956).

oxydase; wenngleich die Verbindungen, die bei der enzymatischen Oxydation dieser monomethylierten Diamine auftreten, bisher noch nicht isoliert und identifiziert worden sind, darf man doch annehmen, daß es die Methylamino-aldehyde II und VI sind.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche zeigen, daß sich die enzymatische Umwandlung von Diaminen in Aminoaldehyde mit der nicht-enzymatischen Kondensation der letzteren mit β -Ketosäuren in vitro vereinen läßt und eine einfache Alkaloidsynthese darstellt, die unter zellmöglichen Bedingungen mit befriedigenden Ausbeuten verläuft und vermutlich der Alkaloid-biogenese nahe verwandt ist.

Experimenteller Teil

Material

Diaminoxydase wurde nach den Angaben von *Kapeller-Adler*⁹ aus Schweineharn gewonnen. Bestimmungen der Wirksamkeit des Enzympräparats, mit Histamin als Substrat nach *Kapeller-Adler*¹⁰ ausgeführt, ergaben Werte von 1000 bis 1200 Permanganat-Einheiten (P. E.) je mg Protein; die Aktivität des Diaminoxydase-Präparats gegenüber N-Methylputrescin betrug 550—650, gegenüber N-Methylcadaverin 800—900 und gegenüber Cadaverin 400—500 P. E./mg Protein.

Kristallisierte *Katalase* wurde aus Rinderleber nach der Vorschrift von *Schnuchel*¹¹ erhalten.

Die Synthese von *N*-Methylputrescin erfolgte nach der Vorschrift von *Dudley* und *Thorpe*¹², diejenige von *N*-Methylcadaverin nach *R. Enger*¹³; von dieser Prozedur wichen wir nur bei der Abspaltung des Benzoylrestes aus 1-Benzoylamino-5-methylamino-pentan-hydrochlorid ab. Letzteres wurde mit der 5fachen Gewichtsmenge Salzsäure ($d = 1,18$) 8 Stdn. im Bombenrohr auf 150° erhitzt. Nachdem der erkaltete Rohrinhalt mit dest. Wasser verdünnt worden war, wurde die ausgeschiedene Benzoësäure abgesaugt. Das durch Eindampfen des Filtrats erhaltene Kristallisat wurde aus absol. Äthanol umgelöst. Die Ausbeute an dem in Alkohol wenig löslichen, hygroskopischen Dihydrochlorid des *N*-Methylcadaverins war nahezu quantitativ. Schmp. 180—182°.

$C_6H_{16}N_2 \cdot 2 HCl$. Ber. C 38,10, H 9,59. Gef. C 38,22, H 9,72.

Bei der Herstellung der *Acetessigsäure* aus ihrem Äthylester folgten wir der Methode von *Shaffer*¹⁴, bei der der *Acetondicarbonsäure* aus Citronensäure den „Organic Syntheses“¹⁵.

Das *Dragendorff*-Reagens wurde nach den Angaben von *Schultz* und *Strauss*¹⁶ bereitet.

⁹ *R. Kapeller-Adler*, Biochem. J. **44**, 70 (1949).

¹⁰ *R. Kapeller-Adler*, Biochem. J. **48**, 99 (1951).

¹¹ *G. Schnuchel*, Z. physiol. Chem. **298**, 241 (1954).

¹² *H. W. Dudley* und *W. V. Thorpe*, Biochem. J. **19**, 845 (1925).

¹³ *R. Enger*, Z. physiol. Chem. **189**, 239 (1930).

¹⁴ *P. A. Shaffer*, J. Biol. Chem. **47**, 433 (1921).

¹⁵ Organic Synth., Coll. Vol. I, Seite 99.

¹⁶ *O. E. Schultz* und *D. Strauss*, Arzneimittelforsch. **5**, 342 (1955).

Methoden

Papierchromatographie (Tab. 1). Hygrin, Cuskhygrin, Isopelletierin und Tab. 1 Methylisopelletierin wurden als Hydrochloride auf Schleicher & Schüll-Papier No. 2043 a mit n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) als Lösungsmittel absteigend chromatographiert und sodann auf den Papierstreifen durch Be-sprühen mit *Dragendorff*-Reagens lokalisiert. Isopelletierin gab im Gegen-satz zu den drei anderen Alkaloiden auf den Chromatogrammen mit diesem Reagens eine nur schwache Farbreaktion, ließ sich jedoch auch in geringer Menge durch seine Blaufärbung mit Natriumnitroprussiat, Acetaldehyd und Natriumcarbonat¹⁷ nachweisen.

Tabelle 1. Papierchromatographie der Hydrochloride von Hygrin, Cuskhygrin, Isopelletierin und Methylisopelletierin

	<i>R</i> _F	Farbe mit <i>Dragendorff</i> -Reagens
Hygrin	0,45	purpurn
Cuskhygrin	0,21	orangerot
Isopelletierin	0,58	rot
Methylisopelletierin	0,59	rot

Vorversuche hatten zur Aufgabe, die günstigsten Bedingungen (pH, Inkubationsdauer, An- oder Abwesenheit von Katalase) für die enzymatische Synthese des *Hygrins* aus N-Methyl-putrescin und Acetessigsäure zu finden (Tab. 2). Zu diesem Zwecke wurden neutralisierte Lösungen, die 7 mg (0,04 mMol) N-Methylputrescin-dihydrochlorid und 40 mg (0,32 mMole) Natrium-acetoacetat in 1,1 ml enthielten, mit 0,4 ml Phosphatpuffer, 0,5 ml Diaminoxydase (1200 P.E./ml) und gegebenenfalls mit 50 µg krist. Katalase und 0,05 ml Äthanol vermischt, 2 Min. lang von Sauerstoff durch-

Tabelle 2. Enzymatische Synthese des Hygrins. Alle Ansätze enthielten 0,04 mMole N-Methylputrescin, 0,32 mMole Acetoacetat und 600 P. E. Diaminoxydase und hatten ein Gesamtvolum von 2 ml. Die Endkonzentration an Phosphatpuffer betrug 0,1 M.

pH	Inkubationsdauer (in Stdn.)	Katalase (µg)	Äthanol (ml)	Ausbeute an Hygrin (%)	
				Als Tetrajodo-bismutat isoliert	korr.
6,8	24	—	—	22	27
7,2	24	—	—	27	33
7,6	24	—	—	28	35
7,6	24	—	—	31	39
7,6	48	—	—	35	43
7,6	48	—	—	36	44
7,6	48	50	—	41	50
7,6	48	50	0,05	39	48

¹⁷ K. Macek, J. Hacaperkova und B. Kakáč, Pharmazie 11, 533 (1956); Z. analyt. Chem. 157, 229 (1957).

strömen gelassen und hierauf bei 37° unter Sauerstoff inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionsmischungen 20 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, durch Abzentrifugieren koagulierten Proteins geklärt und mit je 4 ml *Dragendorff*-Reagens versetzt. Nach mehrstdg. Stehen wurde der voluminöse rote Niederschlag von Hygrin-tetrajodobismutat abzentrifugiert, mit dest. Wasser gut gewaschen, getrocknet und gewogen.

N-Methylputrescin gibt mit Kaliumtetrajodobismutat unter diesen Bedingungen keinen Niederschlag. Die in der vorletzten Spalte der Tab. 2 angegebenen Ausbeuten an Hygrin sind aus dem Gewicht des gefällten und isolierten Tetrajodobismutats errechnet und haben zur Voraussetzung, daß die Fällung eine quantitative ist; diese Voraussetzung ist jedoch nicht voll erfüllt, da ein Kontrollversuch, bei dem eine Lösung von reinem Hygrinbitartrat mit *Dragendorff*-Reagens umgesetzt wurde, nur 81% der berechneten Niederschlagsmenge ergab. Die in der letzten Spalte der Tab. 2 angegebenen korrigierten Hygrin-Ausbeuten tragen der unvollständigen Fällung des Alkaloids Rechnung.

Bei den Hauptversuchen zur enzymatischen Synthese des Hygrins, Cuskhygrins, Isopelletierins und Methylisopelletierins (Tab. 2) wurden die Alkaloide als Pikrate isoliert. Als Beispiel sei hier die Darstellung des *Methylisopelletierins* eingehender beschrieben. Eine Lösung von 100 mg (0,53 mMole) N-Methyl-cadaverin-dihydrochlorid und 500 mg (4,0 mMole) Natrium-acetoacetat in 18 ml Wasser wurde neutralisiert, sodann mit 6 ml 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,6) und 6 ml Diaminoxydase-Lösung (1200 P.E./ml) versetzt, mit Sauerstoff gesättigt und 40 Stdn. lang in einer Sauerstoffatmosphäre inkubiert. Nach Ansäuern mit verd. Salzsäure und 20 Min. Erhitzen auf dem siedenden Wasserbad wurde das ausgefallene Protein abzentrifugiert, der klare Überstand im Vak eingeengt, stark alkalisch gemacht und viermal mit Äther ausgeschüttelt. Ein kleiner Teil des Ätherextraktes wurde eingedunstet, mit 0,1 N HCl aufgenommen und papierchromatographisch geprüft; beim Besprühen des Chromatogramms mit *Dragendorff*-Reagens entstand nur ein einziger roter Farbfleck, dessen R_F -Wert mit dem von Methylisopelletierinhydrochlorid übereinstimmte. Die Hauptmenge des Ätherextraktes wurde eingeengt und mit einer äther. Lösung von 60 mg Pikrinsäure versetzt. Die rohe Fällung gab beim Umkristallisieren aus Äthanol 60 mg reines Pikrat mit einem Schmp. von 158 bis 159° (Ausb. 30% d. Th.). Die Mischung mit einem authentischen Methylisopelletierin-pikrat zeigte keine Schmelzpunktserniedrigung.

Bei der Umsetzung von N-Methylputrescin (0,57 mMole) mit Aceton-dicarbonsäure (0,17 mMole) in Gegenwart von Diaminoxydase entstanden erwartungsgemäß sowohl *Cuskhyrin* als auch *Hygrin*. Wie sich papierchromatographisch nachweisen ließ, übertraf die Menge des Cuskhygrins die des Hygrins. Zur Trennung der zwei Alkaloide wurde deren Mischung, die mit Äther aus dem alkalisch gemachten Inkubationsansatz extrahiert worden war, einer Verteilungschromatographie zugeführt. In ein 34 cm langes Chromatographierrohr ($d = 1,7$ cm) wurde eine Aufschlämmung von Whatman-Cellulosepulver in Aceton eingegossen. Nachdem sich die Cellulose abgesetzt hatte, ließ man das Aceton durch ein Gemisch von 3 Volumteilen n-Butanol, 1 Teil Eisessig und 1 Teil Wasser aus der Säule verdrängen. Sodann wurde die Alkaloidmischung in 1 ml des Butanol-Eisessig-Wasser-Gemisches auf die Säule gebracht und mit dem gleichen Lösungsmittel chromatographiert. Der Säulen-Ausfluß wurde in 3 ml-Fraktionen gesammelt,

ein kleiner Teil jeder Fraktion mit Hilfe des *Dragendorff*-Reagens auf seinen Alkaloidgehalt und gegebenenfalls papierchromatographisch auf die Natur des vorhandenen Alkaloids geprüft. Die Fraktionen 27—29 erwiesen sich als hygrin-, die Fraktionen 34—42 als cuskhygrinhältig. Die letzteren wurden vereinigt und zur Trockene gebracht. Durch Aufnehmen des Rückstandes mit Wasser, Alkalisieren, Extrahieren mit Äther, Einengen des Ätherextraktes, Fällen mit einer äther. Pikrinsäurelösung und Umkristallisieren des gefällten Materials aus Wasser wurden 20 mg reines Cuskhygrindipikrat gewonnen. Sein Schmp. und der Mischschmelzpunkt mit anderweitig synthetisiertem Cuskhygrin-dipikrat lagen bei 215—216°.

Besprechung der Ergebnisse

Diaminoxydase-präparate lassen sich sowohl aus pflanzlichem als auch aus tierischem Material gewinnen. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir das in Schweinenieren vorkommende Enzym, da dieses verhältnismäßig einfach und zu allen Jahreszeiten mit guter Wirksamkeit gewonnen und weitgehend gereinigt werden kann. Auch ist die Substratspezifität der Schweinenieren-Diaminoxydase besonders gründlich erforscht, vor allem dank der Arbeiten von *Zeller* und Mitarbeitern¹⁸; auf diese Autoren geht u. a. der für die vorliegende Untersuchung überaus wichtige Befund zurück, daß nicht nur Putrescin und Cadaverin, sondern auch deren N-monomethylierte Derivate Substrate des Enzyms sind⁸.

Die Aminoaldehyde, die aus Diaminen bei der durch Diaminoxydase katalysierten Reaktion $R \cdot NH \cdot (CH_2)_n \cdot CH_2 \cdot NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow R \cdot NH \cdot (CH_2)_n \cdot CHO + NH_3 + H_2O_2$ entstehen, sind wenig stabile Verbindungen. Ihre Unbeständigkeit steht einer Verwendung zu präparativen chemischen Umsetzungen im Wege; dieser Schwierigkeit kann man jedoch dadurch begegnen, daß man die Aminoaldehyde in Gegenwart der ihnen zugesetzten Reaktionspartner entstehen und von diesen unmittelbar bei oder nach ihrer Bildung abfangen läßt. Dank der Tatsache, daß die Wirksamkeit der Diaminoxydase durch Ketosäuren wie Acetessigsäure oder Acetondicarbonsäure, die mit Aminoaldehyden unter milden Bedingungen glatt reagieren, nicht ernstlich beeinträchtigt wird, ist es uns möglich gewesen, einige Alkaloide in vitro durch gleichzeitigen Ablauf der enzymatischen Bildung von Aminoaldehyden und der nichtenzymatischen Reaktion der Aminoaldehyde mit β-Ketosäuren auf ergiebige Weise zu synthetisieren.

Am Beispiel der Hygrinsynthese aus N-Methylputrescin und Acetessigsäure wurde der Einfluß einiger veränderlicher Reaktionsbedingungen auf den Syntheseablauf untersucht (Tab. 2). Im pH-Bereich zwischen 6,8 und 7,6 stieg die Hygrin-Ausbeute mit sinkender Acidität an. Die Geschwindigkeit des Reaktionsprozesses

¹⁸ E. A. Zeller in „The Enzymes: Chemistry and Mechanism of Action“, ed. by J. B. Sumner and K. Myrbäck, Vol. II, Part 1, p. 544 (Acad. Press 1951).

Tabelle 3. Enzytatische Synthese von Hygrin, Cuskygrin, Isopelleterin und Methylisopelleterin. Die Inkubationsdauer betrug stets 48 Std. Die Ausbeute an reinem Pikrat ist bei der Synthese des Hygrins, Isopelleterins und Methylisopelleterins auf die eingesetzte Menge Diamins bezogen, bei der des Cuskygrins auf die verwendete Menge von Acetondicarbonsäure

Diamin	Ketosäure	Diaminoxydase (P.E.)	Katalase μg	Volum der Inkubationsmischung	pH	Molarität des Phosphatpuffers	Gewonnenes Alkaloid	Schmp. des Pikrats	Ausbeute an reinem Pikrat (% d.Th.)
N-Methylputrescin 0,34 mMol	Acetessigsäure 2,4 mMol	5000	750	24 ml	7,6	0,1 M	Hygrin	149—150° (aus Äthanol)	26%
Cadaverin 0,57 mMol	Acetessigsäure 4,0 mMol	14400	—	30 ml	7,6	0,08 M	Isopelleterin	148—149° (aus Äthanol)	36%
N-Methylcadaverin 0,53 mMol	Acetessigsäure 4,0 mMol	7200	—	30 ml	7,6	0,08 M	Methylisopelleterin	158—159° (aus Äthanol)	30%
N-Methylputrescin 0,57 mMol	Acetondicarbon-säure 0,17 mMol	9600	1250	24 ml	7,2	0,1 M	Cuskygrin	215—216° (aus Wasser)	17%

war offenbar nicht hoch, da eine Verlängerung der Inkubationsdauer von 24 auf 48 Std. eine (allerdings nur geringe) Verbesserung der Ausbeute bewirkte. Als günstig erwies sich ein Zusatz von Katalase zu den Ansätzen, sei es mit oder ohne gleichzeitige Zugabe von Alkohol; Katalase und Äthanol beseitigen das im Verlaufe der Aminoxydation gebildete und nicht unschädliche Wasserstoffperoxyd durch eine gekoppelte peroxydatische Reaktion^{7, 19}. Im Verlaufe einer 48stdg. Inkubation von N-Methylputrescin mit Acetessigsäure in Gegenwart von Diaminoxydase und Katalase bei 37° und pH 7,6 entstand Hygrin in einer Ausbeute, die 50% der theoretisch erreichbaren betrug.

Wie die Tab. 3 zeigt, konnten durch enzymatisch-chemische Synthese aus den Diaminen N-Methylputrescin, Cadaverin und N-Methylcadaverin einerseits und Acetessigsäure andererseits in 26 bis 36proz. Ausbeute Hygrin, Isopelletierin und Methylisopelletierin in Form ihrer reinen Pikrate gewonnen werden. Die wenig befriedigende Ausbeute an Cuskygrin bei der in Gegenwart von Diaminoxydase vorgenommenen Umsetzung von N-Methylputrescin und Acetondicarbonsäure ist die Folge größerer Verluste bei der chromatographischen Aufarbeitung des Reaktionsansatzes.

Es ist vernünftig anzunehmen, daß die Biosynthese des Isopelletierins in der Pflanze analog verläuft wie die hier beschriebene zweistufige in vitro-Synthese. Für diese Annahme spricht es, daß im Pflanzenreich sowohl Aminosäure-decarboxylasen vorkommen, die Lysin und Ornithin in Cadaverin und Putrescin, als auch Diaminoxydasen, die Cadaverin und Putrescin in Aminoaldehyde verwandeln. Zweifelhafter ist es, ob die am Stickstoff methylierten Alkaloide Hygrin, Cuskygrin und Methylisopelletierin in der Pflanze ebenfalls auf die hier in vitro erprobte Art entstehen. Unseres Wissens ist ein natürliches Vorkommen von N-Methylputrescin und -cadaverin bisher nicht erwiesen. Es läßt sich derzeit noch nicht entscheiden, ob die Einführung von Methylgruppen der letzte Schritt der Biosynthese der genannten Alkaloide ist oder aber in der Pflanze bereits früher, etwa nach der Decarboxylierung der Aminosäuren Lysin und Ornithin zu Diaminen, stattfindet.

¹⁹ D. Keilin und E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. [London] B **119**, 141 (1936).