

## 2,4-DIHYDROXYCHINOLIN, EIN DIREKTES ZWISCHENPRODUKT BEI DER BIOSYNTHESE DES FUROCHINOLINALKALOIDS SKIMMIANIN BEI *RUTA GRAVEOLENS*

M. COBET und M. LUCKNER

Sektion Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 402 Halle (Saale), DDR

(Received 3 August 1970)

**Abstract**—In order to demonstrate whether 2,4-dihydroxyquinoline is a direct precursor of the furoquinoline alkaloids of *Ruta graveolens*, labelled acetate, anthranilic acid, and 2,4-dihydroxyquinoline were fed under comparable conditions. It was found that the incorporation of 2,4-dihydroxyquinoline into skimmianine was considerably higher than that of anthranilic acid and acetate. The compound is incorporated without randomization and therefore is a direct intermediate in the biosynthesis of this alkaloid. By contrast, the incorporation of 2,4-dihydroxyquinoline into kokusaginine is less and randomization takes place, so that it does not seem to be a direct precursor.

### EINLEITUNG

IN ARBEITEN über die Biosynthese der Furochinolinalkaloide Dictamnin (4-Methoxyfurochinolin) und Skimmianin (4,7,8-Tri-methoxyfurochinolin) konnte gezeigt werden, daß die C-Atome 4-9 und 12 sowie der Stickstoff aus Anthranilsäure und die C-Atome 10 und 11 aus Azetat entstehen, wobei das C-Atom 10 aus der Carboxylgruppe der Essigsäure hervorgeht.<sup>1-4</sup> Die hohen spezifischen Einbauraten von 2,4-Dihydroxy-[3-<sup>14</sup>C]chinolin in die Alkaloide Dictamnin, Skimmianin, Kokusaginin (4,6,7-Tri-methoxyfurochinolin) und Platydesmin (N-Methyl-2(2'-hydroxy)iso-propyl-4-methoxydihydrofurochinolinium)<sup>5,6</sup> ließen den Schluß zu, daß diese Verbindung ein Intermediärprodukt des Biosyntheseweges ist. Die im folgenden beschriebenen Versuche hatten das Ziel, den direkten und spezifischen Einbau des 2,4-Dihydroxy-chinolins in die Furochinolinalkaloide zu beweisen.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführten Fütterungsversuche lassen erkennen, daß 2,4-Dihydroxy-[3-<sup>14</sup>C]chinolin und 2,4-Dihydroxy-[3-<sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N] chinolin mit spezifischen Einbauraten in das Alkaloid Skimmianin inkorporiert werden, die deutlich höher sind als die von [2-<sup>14</sup>C] Acetate und [<sup>14</sup>-COOH, <sup>15</sup>N] Anthranilsäure (Tabelle 1). Durch Abbau konnte nachgewiesen werden, daß die gesamte, im gebildeten Alkaloid enthaltene Radioaktivität im C-Atom 11 lokalisiert ist (Tabelle 2). Das <sup>14</sup>C/<sup>15</sup>N-Verhältnis

<sup>1</sup> M. MATSUI und Y. KASIDA, *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, **14**, 1108 (1966).

<sup>2</sup> M. MATSUI, M. YAMAZAKI und Y. KASIDA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 679 (1966).

<sup>3</sup> I. MONKOVIĆ und I. D. SPENSER, *Chem. Commun.* 205 (1966).

<sup>4</sup> I. MONKOVIĆ, I. D. SPENSER und A. PLUNKETT, *Can. J. Chem.* **45**, 1935 (1967).

<sup>5</sup> M. COBET und M. LUCKNER, *European J. Biochem.* **4**, 76 (1968).

<sup>6</sup> J. F. COLLINS und M. F. GRUNDON, *Chem. Commun.* 621 (1969).

TABELLE 1. DER EINBAU ISOTOP MARKIERTER VERBINDUNGEN IN KOKUSAGININ UND SKIMMIANIN

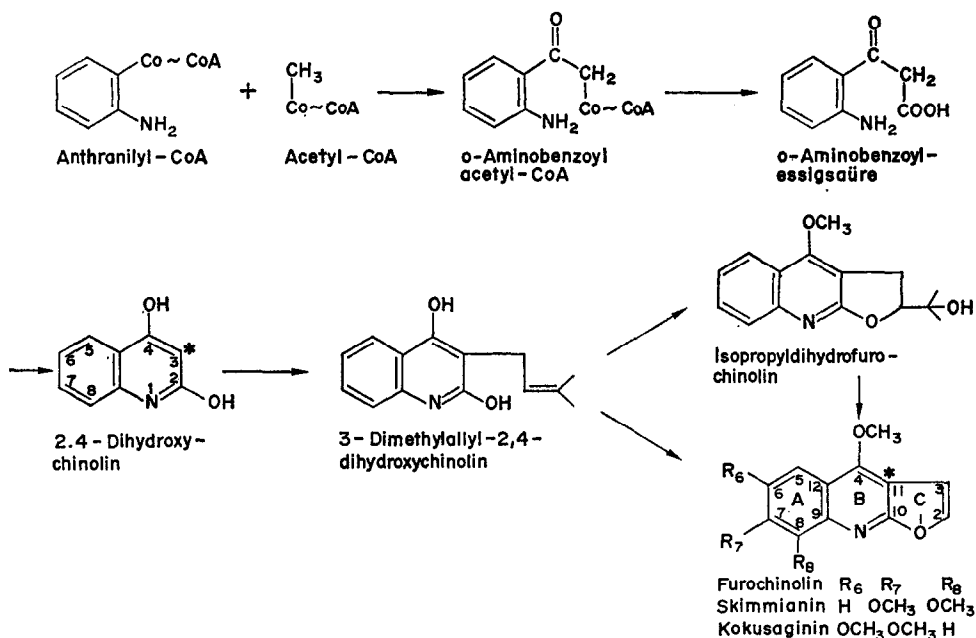
Name	Precursoren			Versuchspflanzen			Gebildete Alkaloide								
	Spez. Aktivität Imp/min mMol $\times$ $10^8$	$^{15}\text{N}$ Anreicherung %	Anzahl	Trockengewicht der Sprosse g	Menge mg	Spez. Einbau- rate %	$^{15}\text{N}$ Anreicherung Ber.*	Gef.	Menge mg	Spez. Einbau- rate %	$^{15}\text{N}$ Anreicherung Ber.*	Gef.	Spez. Einbau- rate %	$^{15}\text{N}$ Anreicherung Ber.*	Gef.
[2- $^{14}\text{C}$ ]Azetat	18,1	—	3	41	3,0	0,007			4,6	0,005					
[ $^{14}\text{COOH}$ , $^{15}\text{N}$ ]- Anthranilsäure	18,3	—	3	48	3,4	0,012			1,2	0,001					
Dihydroxy- [3- $^{14}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ] chinolin	3,5	49,0	3	46	3,2	0,094	0,046	0,064	8,0	0,016	0,007	0,008			
Dihydroxy- [3- $^{14}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ] chinolin	7,5	27,0	3	47	7,2	0,085	0,022	0,005	4,6	0,770	0,199	0,178			
Dihydroxy- [3- $^{14}\text{C}$ ]chinolin	1,6	—	5	68	11,7	0,110			3,8	1,370					

\* Die Werte werden aus der Einbaureate der Radioaktivität des Precursors berechnet.

TABELLE 2. DER ABBAU VON RADIOAKTIV MARKIERTEM SKIMMIANIN UND KOKUSAGININ GEBILDET NACH VERFÜTTERUNG VON 2,4-DIHYDROXY [3-<sup>14</sup>C]CHINOLIN (A) UND 2,4-DIHYDROXY [3-<sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N]CHINOLIN (B)

	Spez. Radioaktivität	% der spez. Radioaktivität des Alkaloids	
		gefunden	berechnet
Skimmianin (A)	1,9 · 10 <sup>5</sup>	100	
<i>p</i> -Bromphenacylacetat	3,7 · 10 <sup>3</sup>	2	0
<i>p</i> -Bromphenacylpropionat	1,6 · 10 <sup>5</sup>	83	100
Skimmianin (B)	3,4 · 10 <sup>5</sup>	100	
<i>p</i> -Bromphenacylacetat	3,2 · 10 <sup>3</sup>	weniger 1	0
<i>p</i> -Bromphenacylpropionat	3,4 · 10 <sup>5</sup>	100	100
Kokusagin (A)	1,0 · 10 <sup>5</sup>	100	
<i>p</i> -Bromphenacylacetat	2,8 · 10 <sup>3</sup>	3	0
<i>p</i> -Bromphenacylpropionat	2,3 · 10 <sup>4</sup>	24	100

ist im gefütterten 2,4-Dihydroxychinolin und im isolierten Skimmianin im Rahmen der Fehlergrenze gleich (Tabelle 1). Dieser Befund, zusammen mit den unterschiedlichen Einbauraten von Acetat und Anthranilsäure in das Alkaloid, schließt aus, daß das 2,4-Dihydroxychinolin im Stoffwechsel der Pflanze zunächst in Anthranilsäure und Essigsäure gespalten wird und diese beiden Verbindungen die eigentlichen Precursoren sind. Alle diese Versuche weisen darauf hin, daß 2,4-Dihydroxychinolin ein direktes Zwischenprodukt bei der Bildung des Furochinolinalkaloids Skimmianin ist. Die Bildung dieser Verbindung könnte somit wie folgt verlaufen (Schema 1).



SCHEMA 1. WAHRSCHEINLICHER WEG FÜR DIE BILDUNG DER FUROCHINOLINALKALOIDE.

Anthranilsäure und Essigsäure werden zunächst in die CoA-Ester umgewandelt. Diese Art der Aktivierung ist für Essigsäure bekannt,<sup>7</sup> wurde für Anthranilsäure jedoch bisher nur bei Bakterien nachgewiesen.<sup>8</sup> Die aktivierten Säuren könnten dann in einer durch ein Enzym der Thiolasegruppe katalysierten Reaktion unter Abspaltung von CoA miteinander reagieren. Der hierbei entstehende *o*-Aminobenzoylessigsäure-CoA-Ester würde nach hydrolytischer Abspaltung des CoA-Restes über *o*-Aminobenzoylessigsäure durch spontanen Ringschluß in 2,4-Dihydroxychinolin übergehen und nach Reaktion mit Isopentenylpyrophosphat in 3-Dimethylallyl-2,4-dihydroxychinolin umgewandelt werden, das von Collins und Grundon<sup>6</sup> als Zwischenprodukt bei der Bildung der Furochinolinalkaloide nachgewiesen wurde. Bis jetzt ist unklar geblieben, ob die drei überzähligen C-Atome in der Seitenkette letzterer Verbindung vor oder nach der Bildung des Furanringes abgespalten werden.

Nicht gelöst werden konnte bisher weiterhin die Frage auf welcher Stufe der Biosynthese das Substitutionsmuster im Ring A der Furochinolinalkaloide festgelegt wird. Aus der im Vergleich mit Anthranilsäure hohen spezifischen Einbaurate des 2,4-Dihydroxychinolins in das Skimminin kann gefolgert werden, daß zumindestens bei einigen Alkaloiden die notwendigen Hydroxylierungen und Methylierungen verhältnismäßig spät erfolgen. Die im Vergleich mit dem Skimminin wesentlich niedrigere Einbaurate von 2,4-Dihydroxychinolin in das Kokusagin in weist möglicherweise jedoch darauf hin, daß 2,4-Dihydroxychinolin hier kein direktes Zwischenprodukt der Biosynthesekette ist. Diese Annahme wird durch den Nachweis einer Verschmierung der Radioaktivität im Molekül des Kokusagins (Tabelle 2) und durch Unterschiede im <sup>14</sup>C/<sup>15</sup>N-Verhältnis zwischen dem verfütterten Precursor und dem gebildeten Alkaloid (Tabelle 1) unterstützt. Die im Ring A des Kokusagins vorhandenen Substituenten sollten deshalb auf einer früheren Stufe des Biosyntheseweges eingeführt werden, was zur Folge hätte, daß nicht das 2,4-Dihydroxychinolin selbst sondern substituierte Derivate dieser Verbindung hier die eigentlichen Zwischenprodukte sind.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### Isotop Markierte Precursoren

[2-<sup>14</sup>C]Natriumacetat und [<sup>15</sup>N]Anthranilsäure wurden von der Firma Isocommerz-Berlin bezogen. [<sup>14</sup>COOH]Anthranilsäure wurde aus *o*-Nitrilanilin und [<sup>14</sup>C]Kaliumcyanid synthetisiert.<sup>9</sup> Die Darstellung von 2,4-Dihydroxy-[<sup>15</sup>N]chinolin erfolgte analog der Synthese von 2,4-Dihydroxy-[3-<sup>14</sup>C]chinolin<sup>5</sup> durch Verseifung des aus [<sup>15</sup>N]Anthranilsäureäthylester (vgl.<sup>10</sup>) und Essigsäureäthylester synthetisierten 2-[<sup>15</sup>N]Aminobenzoylessigsäureäthylesters (Ausbeute: 7% d. Theorie berechnet auf [<sup>15</sup>N]Anthranilsäure). Die Identitäts- und Reinheitsprüfung wurde dünn-schichtchromatographisch durchgeführt.<sup>5</sup>

Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Tricarb Flüssigkeits-Scintillations-Zähler. Der <sup>15</sup>N-Gehalt wurde durch Massenspektrometrie bestimmt.

### Verwendetes Pflanzenmaterial

Zu den Versuchen wurden ein Jahr alte, im Gewächshaus kultivierte Pflanzen von *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) verwendet.

### Fütterung der Versuchspflanzen

Pro Versuchspflanze wurde eine der im folgenden aufgeführten Lösungen verfüttert:

- (a) 5 mg des jeweils benutzten 2,4-Dihydroxychinolinderivates in 1 ml 3%iger Natriumkarbonatlösung.
- (b) 5 mg [<sup>14</sup>COOH, <sup>15</sup>N]Anthranilsäure in 1,6 ml 0,2 %iger Natriumkarbonatlösung.
- (c) 5 mg Natrium-[2-<sup>14</sup>C]acetat in 1 ml Wasser.

<sup>7</sup> P. BERG, *J. Biol. Chem.* **222**, 991 (1956).

<sup>8</sup> U. GEIGER und M. LUCKNER, unveröffentlicht.

<sup>9</sup> D. MUNSCH und H. R. SCHÜTTE, *Z. Chem.* **3**, 230 (1963).

<sup>10</sup> E. BAMBERGER, *Liebigs Ann. Chem.* **305**, 362 (1899).

Die Fütterung der Precursurlösung erfolgte mittels Baumwollfadentechnik (vgl.<sup>11</sup>) in den unteren Teilen des Stengels. Nach 15 h hatten die Pflanzen die radioaktiven Lösungen vollständig aufgenommen. Es wurde nun und am darauffolgenden Tag jeweils 1 ml Wasser zugegeben. Die Aufarbeitung der Pflanzen erfolgte 65 h nach Fütterungsbeginn.

#### Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Die bei 110° getrockneten oberirdischen Teile der Versuchspflanzen wurden mit Äther erschöpfend extrahiert. Von dem dabei erhaltenen Extrakt wurde der Äther abdestilliert und der Rückstand mit verdünnter Schwefelsäure aufgenommen. Die entstandene Lösung wurde filtriert und nach Alkalisierung mit verdünnter Natronlauge mit  $\text{CHCl}_3$  ausgeschüttelt. Das nach dem Abdestillieren des  $\text{CHCl}_3$  zurückbleibende Alkaloidgemisch wurde in wenig Benzol gelöst. Zur Gewinnung des Kokusaginin wurde die benzolische Lösung vorsichtig mit 10%iger HCl geschwenkt (vgl.<sup>12</sup>). Die ausfallenden Kokusagininhydrochlorid-Kristalle wurden auf einer G4 Fritte gesammelt, mit benzolgesättigter 2 %iger Salzsäurelösung gewaschen und in heißem Wasser gelöst. Durch Zusatz von 25 %iger Ammoniaklösung wurde das Kokusaginin als Base gefällt. Aus der verbliebenen benzolischen Lösung (in der Kokusaginin nur noch in Spuren nachweisbar war) wurde Skimmianin durch präparative TLC isoliert (vgl.<sup>5</sup>). Die rohen Alkaloide wurden mehrfach in 2 %iger HCl gelöst und durch Zusatz von 25 %iger Ammoniaklösung wieder ausgefällt. Sie waren danach chromatographisch rein und besaßen eine konstante spezifische Radioaktivität (Fp. Kokusaginin: 160–165°, Lit.<sup>13</sup> 168–169°; Fp. Skimmianin: 171–175,5°, Lit.<sup>14</sup> 175–178°).

TABELLE 3. CHROMATOGRAPHIE DER ALKALOIDE UND ALKALOIDABBAUPRODUKTE

Substanz	$R_F$ Wert	
	System I	System II
Kokusaginin	0,28	0,37
Skimmiamin	0,12	0,34
2-Hydroxy-3-äthyl-4,6,7-trimethoxychinolin	0,49	—
2-Hydroxy-3-äthyl-4,7,8-trimethoxychinolin	0,66	—

System I: Kieselgel G "Merck"/Toluol, Essigsäureäthylester, Ameisensäure (50:40:10).<sup>15</sup>

System II: Kieselgel G "Merck"/mit Ammoniak gesättigter Äther.<sup>16</sup>

Detektionsmittel: Muniers-Reagenz.

#### Abbau von Kokusaginin und Skimmianin

Der Abbau der Furochinolinalkaloide erfolgte durch katalytische Hydrierung mit Platinoxid und anschließender Kuhn-Roth-Oxydation (vgl.<sup>17</sup>).

0,1 mMol des betreffenden Alkaloids wurden in 2 ml absolutem Äthanol gelöst und nach Zusatz von 50 mg Platinoxid bei 25° und normalem Druck hydriert. Die benötigten 0,2 mMol Wasserstoff wurden in ca. 2 h aufgenommen. Anschließend wurde die Mischung unter Wasserstoffatmosphäre 12 h stehen gelassen. Die Vollständigkeit der Hydrierung zum entsprechenden 2-Hydroxy-3-äthyl-4-methoxychinolinderivat wurde dünnenschichtchromatographisch geprüft.

Nach Abtrennung des Katalysators durch Filtration wurde das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand nach Kuhn-Roth oxidiert. Nach Zusatz einer heißen Lösung von 4 g Chrom (VI) oxyd in 15 ml Wasser und 8 ml konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wurde eine Wasserdampfdestillation durchgeführt, bis etwa 200 ml Destillat vorlagen. Durch Erhitzen des Reaktionskolbens auf 100° mittels eines Ölbad es wurde eine Verdünnung des Reaktionsgemisches verhindert.

Das Destillat wurde mit 0,1 n NaOH neutralisiert und auf 2 ml eingengt. Die Veresterung der in der Lösung vorliegenden Kalisalze der Essig- und Propionsäure zu ihren p-Bromphenacylestern erfolgte nach

<sup>11</sup> J. EUW und T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta* **47**, 719 (1964).

<sup>12</sup> B. BORKOWSKI und J. MASIAKOWSKI, *Planta Med.* **13**, 48 (1965).

<sup>13</sup> T. R. GOWINDACHARI und V. N. SUNDARATAN, *J. Sci. Ind. Res.* **20B**, 298 (1961).

<sup>14</sup> T. OHTA und T. MIYAZAKI, *J. Pharm. Soc. Japan* **78**, 538 (1958).

<sup>15</sup> I. NOVÁK, G. BUZÁS, E. MINKER, M. KOLTAI und K. SZENDREI, *Planta Med.* **15**, 132 (1967).

<sup>16</sup> G. SCHNEIDER, *Planta Med.* **13**, 425 (1965).

<sup>17</sup> T. OHTA und T. MIYAZAKI, *Chem. Pharm. Bull. Tokyo*, **1**, 181 (1953).

Zusatz von 3 ml Äthanol und 1,05 Äquivalenten *p*-Bromphenacylbromid durch 2 stündiges Kochen am Rückfluß. Das Estergemisch wurde aus der kalten Mischung mit Wasser ausgefällt.

Die Trennung des Estergemisches erfolgte durch präparative TLC an Kieselgel PF<sub>254</sub> "Merck". Als Laufmittel diente zunächst Benzol und nach Trocknung der Platten bei Zimmertemperatur ein Gemisch aus Benzin (60–70°) 50 ml, Benzol 30 ml, CHCl<sub>3</sub> 20 ml und EtoAc 10 ml. Die beiden Zonen (*p*-Bromphenacylacetat: *R<sub>F</sub>*-Wert 0,43; *p*-Bromphenacylpropionat: *R<sub>F</sub>*-Wert 0,60) wurden von dem Chromatogramm abgekratzt und mit heißem Methanol eluiert.

Die Reinigung der Ester bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität erfolgte durch Sublimation (*p*-Bromphenacylacetat: 65 bis 70°, 10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-3</sup> Torr; *p*-Bromphenacylpropionat: 45–50°, 10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-3</sup> Torr). Zur quantitativen Bestimmung wurde die Lichtabsorption in äthanolischer Lösung bei 257 nm bestimmt.

Mittlere Ausbeute berechnet auf das eingesetzte Alkaloid: *p*-Bromphenacylacetat: 4,7 mg, 18,5% d. Theorie; *p*-Bromphenacylpropionat: 3,5 mg, 13,0% d. Theorie.

*Anerkennung*—Herrn Prof. Dr. E. Leete, University of Minnesota, Division of Organic Chemistry, Minneapolis, danken wir für die Durchführung der <sup>15</sup>N-Bestimmung.