

2,4-DIHYDROXYCHINOLIN, EIN DIREKTES ZWISCHENPRODUKT BEI DER BIOSYNTHESSE 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 kokusaginin 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.^{1–4} Die hohen spezifischen Einbauraten von 2,4-Dihydroxy-[3-¹⁴C]chinolin in die Alkaloide Dictamnin, Skimmianin, Kokusaginin (4,6,7-Tri-methoxyfurochinolin) und Platydesmin (N-Methyl-2(2'-hydroxy)iso-propyl-4-methoxydihydrofurochinolinium)^{5,6} 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-[3-¹⁴C]chinolin und 2,4-Dihydroxy-[3-¹⁴C, ¹⁵N] chinolin mit spezifischen Einbauraten in das Alkaloid Skimmianin inkorporiert werden, die deutlich höher sind als die von [2-¹⁴C] Acetate und [¹⁴-COOH, ¹⁵N] 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 ¹⁴C/¹⁵N-Verhältnis

¹ M. MATSUO und Y. KASIDA, *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, **14**, 1108 (1966).

² M. MATSUO, M. YAMAZAKI und Y. KASIDA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 679 (1966).

³ I. MONKOVIĆ und I. D. SPENSER, *Chem. Commun.* 205 (1966).

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

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

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

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

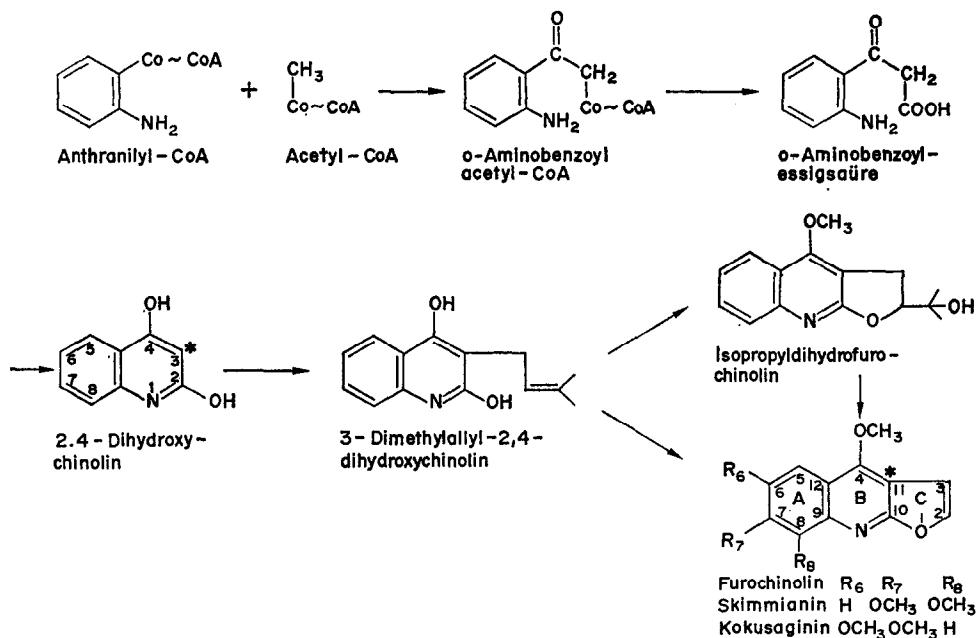
Precursoren	Versuchspflanzen				Gebildete Alkaloide					
	Name	Spez. Aktivität Imp./min $\times 10^8$	^{15}N Anreicherung %	Anzahl	Trockengewicht der Sprosse g	Kokusaginin			Skimmanin	
						Menge mg	Spez. Einbau-rate %	^{15}N Anreicherung	Menge mg	Spez. Einbau-rate %
[2- ^{14}C]Azetat	18,1	—	—	3	41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

* Die Werte werden aus der Einbaurate der Radioaktivität des Precursors berechnet.

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

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

Antrhanilsäure und Essigsäure werden zunächst in die CoA-Ester umgewandelt. Diese Art der Aktivierung ist für Essigsäure bekannt,⁷ wurde für Antrhanilsäure jedoch bisher nur bei Bakterien nachgewiesen.⁸ Die aktivierte 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 Grundon⁶ 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 Antrhanilsäure hohen spezifischen Einbauraten des 2,4-Dihydroxychinolins in das Skimmianin kann gefolgert werden, daß zumindestens bei einigen Alkaloiden die notwendigen Hydroxylierungen und Methylierungen verhältnismäßig spät erfolgen. Die im Vergleich mit dem Skimmianin wesentlich niedrigere Einbaurate von 2,4-Dihydroxychinolin in das Kokusaginin 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 Kokusaginins (Tabelle 2) und durch Unterschiede im ¹⁴C/¹⁵N-Verhältnis zwischen dem verfütterten Precursor und dem gebildeten Alkaloid (Tabelle 1) unterstützt. Die im Ring A des Kokusaginins 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

[2-¹⁴C]Natriumacetat und [¹⁵N]Antrhanilsäure wurden von der Firma Isocommerz-Berlin bezogen. [¹⁴COOH]Antrhanilsäure wurde aus *o*-Nitranilin und [¹⁴C]Kaliumcyanid synthetisiert.⁹ Die Darstellung von 2,4-Dihydroxy-[¹⁵N]chinolin erfolgte analog der Synthese von 2,4-Dihydroxy-[3-¹⁴C]chinolin⁵ durch Verseifung des aus [¹⁵N]Antrhanilsäureäthylester (vgl.¹⁰) und Essigsäureäthylester synthetisierten 2-[¹⁵N]Aminobenzoylessigsäureäthylesters (Ausbeute: 7% d. Theorie berechnet auf [¹⁵N]Antrhanilsäure). Die Identitäts- und Reinheitsprüfung wurde dünnenschichtchromatographisch durchgeführt.⁵

Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Tricarb Flüssigkeits-Scintillations-Zähler. Der ¹⁵N-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 [¹⁴COOH, ¹⁵N]Antrhanilsäure in 1,6 ml 0,2%iger Natriumkarbonatlösung.
- (c) 5 mg Natrium-[2-¹⁴C]acetat in 1 ml Wasser.

⁷ P. BERG, *J. Biol. Chem.* **222**, 991 (1956).

⁸ U. GEIGER und M. LUCKNER, unveröffentlicht.

⁹ D. MÜNSCHE und H. R. SCHÜTTE, *Z. Chem.* **3**, 230 (1963).

¹⁰ E. BAMBERGER, *Liebigs Ann. Chem.* **305**, 362 (1899).

Die Fütterung der Precursorlösung erfolgte mittels Baumwollfadentechnik (vgl.¹¹) 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 hr 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 CHCl_3 ausgeschüttelt. Das nach dem Abdestillieren des CHCl_3 zurückbleibende Alkaloidgemisch wurde in wenig Benzol gelöst. Zur Gewinnung des Kokusaginin wurde die benzolische Lösung vorsichtig mit 10%iger HCl geschwenkt (vgl.¹²). 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.⁵). Die rohen Alkalioide 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.¹³ 168–169°; Fp. Skimmianin: 171–175,5°, Lit.¹⁴ 175–178°).

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, Ameisenäure (50:40:10).¹⁵

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

Detektionsmittel: Muniers-Reagenz.

Abbau von Kokusaginin und Skimmianin

Der Abbau der Furochinolinalkalioide erfolgte durch katalytische Hydrierung mit Platinoxyd und anschließender Kuhn-Roth-Oxydation (vgl.¹⁷).

0,1 mMol des betreffenden Alkaloids wurden in 2 ml absolutem Äthanol gelöst und nach Zusatz von 50 mg Platinoxyd 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 oxydiert. Nach Zusatz einer heißen Lösung von 4 g Chrom (VI) oxyd in 15 ml Wasser und 8 ml konzentrierter H_2SO_4 wurde eine Wasserdampfdestillation durchgeführt, bis etwa 200 ml Destillat vorlagen. Durch Erhitzen des Reaktionskolbens auf 100° mittels eines Ölbades wurde eine Verdünnung des Reaktionsgemisches verhindert.

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

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

¹² B. BORKOWSKI und J. MASIĘKOWSKI, *Planta Med.* **13**, 48 (1965).

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

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

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

¹⁶ G. SCHNEIDER, *Planta Med.* **13**, 425 (1965).

¹⁷ 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 PF₂₅₄ "Merck". Als Laufmittel diente zunächst Benzol und nach Trocknung der Platten bei Zimmertemperatur ein Gemisch aus Benzin (60–70°) 50 ml, Benzol 30 ml, CHCl₃ 20 ml und EtoAc 10 ml. Die beiden Zonen (*p*-Bromphenacylacetat: *R*_F-Wert 0,43; *p*-Bromphenacylpropionat: *R*_F-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°, 10⁻² bis 10⁻³ Torr; *p*-Bromphenacylpropionat: 45–50°, 10⁻² bis 10⁻³ 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 ¹⁵N-Bestimmung.