

SHORT COMMUNICATION

ZUR BIOSYNTHESE DES PYRROLIDINRINGS IN PEGANIN

K. WAIBLINGER, S. JOHNE und D. GRÖGER

Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle (Saale), (DDR) des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

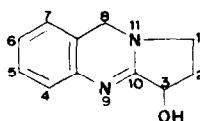
(Received 18 January 1972)

Key Word Index—*Adhatoda vasica*; Acanthaceae; Vasicine; alkaloid biosynthesis; pyrroloquinzoline; peganin; pyrrolidine ring.

Abstract—Labelled compounds were fed to young plants of *Adhatoda vasica* in order to clarify the origin of the 'non-anthranilic acid' portion of vasicine (I). Randomly-labelled I was isolated after administration of α -hydroxy- γ -aminobutyric acid-4- ^{14}C . The evidence indicates that C-3 and C-10 of I are derived from a C_2 -unit; the specific incorporation of *N*-acetyl-2'- ^{14}C -anthranilic acid- ^{15}N strongly supports this view.

EINLEITUNG

FÜR DEN Pyrrolidinring des Nicotins und der Tropanalkaloide sind Vertreter der α -Ketoglutarat-Familie (Prolin, Glutaminsäure, Ornithin) sowie nahe verwandte Verbindungen (z.B. Putrescin) spezifische Vorstufen.¹ Auch für den Nicht-Anthranilsäure-Teil der Pyrrolidinochinazoline ist ein derartiger Reaktionsweg postuliert worden.^{2,3} Liljegren^{4,5} hat nun kürzlich nach Applikation von markiertem Ornithin, Prolin, Putrescin sowie Glutaminsäure-5- ^{14}C einen mehr oder minder spezifischen Einbau in Peganin (I) bei *Peganum harmala* nachweisen können. Nach Ornithin-(2- ^{14}C)-Fütterung waren 84% der Radioaktivität zu gleichen Teilen im C-1 und C-10 von I lokalisiert. Nach Gabe von Putrescin-(1,4- ^{14}C) wurden in diesen beiden C-Atomen 69% der Radioaktivität gefunden, wobei im C-1 28% und C-10 41% lokalisiert waren.



Peganin (Vasicin) (I)

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei unseren Untersuchungen zur Peganinbiosynthese unter Verwendung von *Adhatoda vasica* als Versuchspflanze haben wir dagegen nach Applikation von Verbindungen der α -Ketoglutarat-Familie stets eine beträchtliche Verschmierung der Radioaktivität festgestellt. Wir haben daher postuliert, daß der Pyrrolidinring unter Beteiligung von Aspartat

¹ K. MOTHES und H. R. SCHÜTTE (Hrsg.), *Biosynthese der Alkaloide*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1969).

² R. ROBINSON, *The Structural Relations of Natural Products*, p. 95, Oxford University Press (1955).

³ E. LEETE, *Adv. Enzymol.* **32**, 373 (1969).

⁴ D. R. LILJEGREN, *Phytochem.* **7**, 1299 (1968).

⁵ D. R. LILJEGREN, *Phytochem.* **10**, 2661 (1971).

bzw. äquivalenten Verbindungen (C-1, C-2, N-11) sowie einem C₂-Körper (C-3, C-10) aufgebaut werden kann und erste experimentelle Untersuchungen zu dieser Problematik durchgeführt.⁶⁻⁸ Weitere Befunde seien im Folgenden mitgeteilt (*vide* Tabelle 1). Es ist bekannt,⁹ daß sich α -Hydroxy- γ -aminobutyraldehyd *in vitro* leicht mit *o*-Aminobenzaldehyd zu I umsetzen läßt. Um zu prüfen, ob eine derartige Reaktion auch *in vivo* ablaufen kann, haben wir α -Hydroxy- γ -aminobuttersäure-(4-¹⁴C) verfüttert. Bei einem spezifischen Einbau sollte die gesamte Radioaktivität im C-1 nachweisbar sein. Der Abbau von I ergab jedoch, daß dies nicht der Fall ist (Versuch 6, Tab.). Als mögliche Vorstufen für den C₂-Körper wurden Acetat-(1-¹⁴C), Acetat-(2-¹⁴C), Na-pyruvat-(3-¹⁴C) sowie Glycin-(2-¹⁴C) appliziert. Die Ergebnisse zeigen, daß durch Acetat-(2-¹⁴C) vornehmlich das C-3-Atom von I markiert wird. Die Beteiligung von Acetat bzw. einem Äquivalent wird noch deutlicher durch den Na-pyruvat-(3-¹⁴C)-Versuch. Hier ließen sich im C-3 84% der Radioaktivität nachweisen. Pyruvat dann durch oxydative Decarboxylierung in Acetyl-CoA übergehen und so die Vorstufe ständig nachliefern. Die Verschmierung ist geringer als beim Acetat-Versuch. Ähnliche Verhältnisse sind auch bei der Harminbiosynthese¹⁰ beobachtet worden.

TABELLE 1. EINBAU VERSCHIEDENER MARKIERTER VORSTUFEN IN PEGANIN

Vorstufe	Spez. Einbau- rate in Peganin %	Radioaktivitätsverteilung in den Abbauprodukten in %, Peganin jeweils 100%						
		4-Chinazolon 3-essigsäure	C-3 (Differenz)	Anthranil- säure	C-10 (Differenz)	Glycin C-1 + C-2	HCHO- Dimedon C-1	C-2 (Differenz)
1. Acetat-(1- ¹⁴ C)	0,51	76,1	23,9	37,7	31,4	7,0	4,6	2,4
2. Acetat-(2- ¹⁴ C)	0,23	44,3	55,7	26,6	0	17,8	14,4	3,4
3. Na-pyruvat-(3- ¹⁴ C)	0,046	16	84	7,2	6,8	2	n.b.	n.b.
4. Glycin-(2- ¹⁴ C)	0,12	52,8	47,2	22,1	n.b.	n.b.	7,6	n.b.
5. N-Acetyl-(2'- ¹⁴ C)- anthranilsäure-(¹⁵ N)*	0,32	2,2	97,8	0	0	0	0	0
6. α -Hydroxy- γ -amino- buttersäure-(4- ¹⁴ C)	0,15	81	19	67,3	1,7 n.b. = nicht bestimmt	12	10,7	1,3

Die Versuche 5 und 6 wurden zweimal durchgeführt. Es wurden jeweils prinzipiell die gleichen Werte beim Abbau erhalten.

* N-Acetyl-(2'-¹⁴C)-anthranilsäure-(¹⁵N); ¹⁴C: $9,88 \times 10^7$ dpm/mMol.; ¹⁵N-Uberschuß: 52%. Spezifische Einbauraten ¹⁵N bezogen auf 1 N-Atom: 0,34%; ¹⁵N/¹⁴C-Verhältnis: 1,06.

Nicht so deutlich sind die Ergebnisse bei Acetat-(1-¹⁴C)-Applikation. Immerhin sind 31% dieser stoffwechselaktiven Verbindung im C-10 lokalisiert. Der Einbau von Glycin-(2-¹⁴C) wäre via Serin \rightarrow Pyruvat denkbar, aber auch eine Transaminierung von Glycin und der Einbau von Glyoxylsäure in I ist nicht ausgeschlossen. Der überzeugendste Beweis für die Beteiligung eines C₂-Körpers lieferte die Verfütterung von N-Acetyl-(2'-¹⁴C)-anthranilsäure-(¹⁵N). Beim Abbau von I wurde praktisch inaktive 4-Chinazolon-3-essigsäure erhalten. Somit war die gesamte Radioaktivität im C-3 lokalisiert. Da das ¹⁵N/¹⁴C-Verhältnis im Peganin = 1 ist, muß die N-Acetylanthranilsäure als Ganzes inkorporiert worden sein. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei *Adhatoda vasica* ein Weg zur Synthese von Peganin vorhanden ist, der mit dem bei *Peganum harmala* gefundenen^{4,5} nicht übereinstimmt.

⁶ S. JOHNE und D. GRÖGER, *Phytochem.* **7**, 429 (1968).

⁷ S. JOHNE, D. GRÖGER und G. RICHTER, *Arch. Pharmaz.* **301**, 721 (1968).

⁸ S. JOHNE und D. GRÖGER, *Z. Pflanzenphysiol.* **61**, 353 (1969).

⁹ N. J. LEONARD und M. J. MARTELL, JR., *Tetrahedron Letters* **44** (1960).

¹⁰ K. STOLLE und D. GRÖGER, *Arch. Pharmaz.* **301**, 561 (1968).

EXPERIMENTELLES

Die radioaktiven Vorstufen wurden jeweils an 10 Pflanzen (6–8 Wochen alt) von *Adhatoda vasica* über die Wurzeln appliziert. Fütterungsdauer 48 hr.

Radioaktive Verbindungen. (1) Na-acetat-(1- ^{14}C), 15 mg; $3,08 \times 10^9$ dpm/mMol. (2) Na-acetat-(2- ^{14}C), 12,3 mg; $1,52 \times 10^9$ dpm/mMol. (3) Na-pyruvat-(3- ^{14}C), 12,4 mg; $3,8 \times 10^9$ dpm/mMol. (4) Glycin-(2- ^{14}C), 10,5 mg; $1,95 \times 10^9$ dpm/mMol. (5) N-Acetyl-(2'- ^{14}C)-anthranilsäure-(^{15}N), 35 mg (*vide* Tabelle 1). (6) α -Hydroxy- γ -amino-buttersäure-(4- ^{14}C), 30 mg; $1,05 \times 10^8$ dpm/mMol, synthetisiert nach.¹¹ Die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials und der Abbau des bis zur konstanten spez. Radioaktivität kristallisierten I erfolgte in Anlehnung an.^{6,8} Die Abbauprodukte 4-Chinazolon-3-essigsäure, Anthranilsäure, Glycin sowie HCHO-Dimedon wurden durch mehrfache DC und Umkristallisation rigoros gereinigt. Die Radioaktivitätsbestimmungen erfolgten im Tricarb-Flüssigkeitsscintillationsspektrometer Modell 3365. Der ^{15}N -Überschuß wurde nach Trockenverbrennung auf spektroskopischem Wege nach Munsche¹² bestimmt.

¹¹ L. P. BOUTHILLIER, J. J. PUSHAPATADAM und Y. BINETTE, *Can. J. Biochem.* **44**, 171 (1966).

¹² D. MUNSCHE, *Kernenergie* **8**, 32 (1965).