

## FÜTTERUNGSVERSUCHE ZUR BIOSYNTHESE DES DAMASCENINS IN *NIGELLA DAMASCENA* L.

### 6. MITTEILUNG ÜBER DAS DAMASCENIN<sup>1</sup>

D. MUNSCHE und K. MOTHES

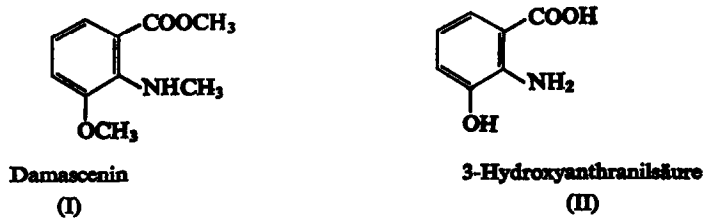
Akademie-Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle (Saale), Germany

(Received 4 February 1965)

**Abstract**—Damascenine was shown to be synthesized in the seeds of *Nigella damascena* via the shikimic acid pathway. [U-<sup>14</sup>C]Glucose, [carboxy-<sup>14</sup>C] shikimic acid, [carboxy-<sup>14</sup>C] anthranilic acid, and [carboxy-<sup>14</sup>C] 3-methoxy-anthranilic acid were incorporated in damascenine. When these acids labelled in the carboxylic group were fed, radioactivity was also recovered in the carboxylic group of damascenic acid. All the three methyl groups in damascenine can arise from administered [Me-<sup>14</sup>C] methionine. The N-methyl group showed a labelling three to four times as high as the O-methyl and ester methyl groups.

### EINLEITUNG

DAMASCENIN (I) kommt als einziges Alkaloid in *Nigella damascena* vor. Über die Analytik,<sup>2</sup> über Lokalisation in der Pflanze,<sup>1</sup> sowie über die Physiologie<sup>3,4</sup> wurde bereits berichtet, ebenso über die pharmakologische Wirkung.<sup>5</sup> Auch über Fütterungsversuche mit radioaktiven Precursoren liegen Arbeiten vor.<sup>6,7</sup> Das Alkaloid ist in der Samenschale in besonderen Zellen akkumuliert und wird auch dort gebildet. Dabei zeigen isolierte grüne Samen mit Beginn der Alkaloidbildung die Fähigkeit, aus <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> im Licht radioaktives Damascenin zu bilden. Von den übrigen Organen der Pflanze können nur noch die Blätter, wenn auch in weit geringerem Masse als die Samen, Alkaloid bilden.



Damascenin ist ein dreifach methyliertes Derivat der 3-Hydroxyanthranilsäure (II). Die biogenetische Herkunft der 3 verschieden gebundenen Methylgruppen war zu überprüfen. 3-Hydroxyanthranilsäure ist als Intermediärprodukt des Tryptophanabbaues in Tieren, niederen Pilzen und Mikroorganismen bekannt. Es musste überprüft werden, ob ein direkter

<sup>1</sup> 5. Mitteilung D. MUNSCHE, *Flora* 154, 317 (1964).

<sup>2</sup> M. L. VISHIN, H.-B. SCHRÖTER und D. MUNSCHE, *Arch. Pharm.* 296, 859 (1963).

<sup>3</sup> V. E. TYLER, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 44, 52 (1955).

<sup>4</sup> M. L. VISHIN, D. MUNSCHE und H.-B. SCHRÖTER, *Flora* 154, 299 (1964).

<sup>5</sup> E. HANNIG und M. L. VISHIN, *Planta Med.* 8, 183 (1960).

<sup>6</sup> E. LEETE, L. MARION und J. D. SPENSER, *Can. J. Chem.* 33, 405 (1955).

<sup>7</sup> M. L. VISHIN, K. MOTHES, L. ENGELBRECHT und H.-B. SCHRÖTER, *Nature* 188, 61 (1960).

Weg über Shikimisäure unter Umgehung des Tryptophans möglich ist. Durch Fütterungsversuche isolierter grüner Samen mit markierten Precursoren werden die möglichen Biosynthesewege untersucht.

## ERGEBNISSE

### 1. Herkunft der Methylgruppen

Wir fütterten grüne *Nigella*-Samen mit Methionin-( $^{14}\text{CH}_3$ ) und erhielten in Damascenin folgende Aktivitätsverteilung (Tab. 1). Diese Versuche wurden in drei Vegetationsperioden mit sehr ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Danach können bei der Biogenese des Damascenins alle drei, chemisch verschieden gebundenen Methylgruppen vom Methionin geliefert werden. In allen Versuchen war stets die *N*-Methylgruppe um ein Mehrfaches stärker markiert als *O*-Methyl und Estermethanol. Wir möchten daraus schliessen, dass *N*-Methyl biologisch besonders labil ist und ein Austausch am bereits gebildeten Damascenin stattfinden kann.

TABELLE 1. VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT IM DAMASCENIN NACH FÜTTERUNG VON METHIONIN-( $^{14}\text{CH}_3$ )

Substanz	IpM/ $\mu\text{M} \times 10^{-2}$	Prozent
Damascenin	48.8	100.0
Estermethanol	7.6	15.6
<i>N</i> -Methyl	30.6	62.7
<i>O</i> -Methyl	9.8	20.5
Carboxyl	0.1	0.2
Aromatischer Ring	0.7	1.4

TABELLE 2. VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT IM DAMASCENIN NACH FÜTTERUNG VON  $^{14}\text{CO}_2$  NACH 1 STUNDE UND NACH 2 TAGEN

Substanz	1 Stunde		2 Tage	
	IpM/ $\mu\text{M}$	Prozent	IpM/ $\mu\text{M}$	Prozent
Damascenin	100.0	100.0	91.0	100.0
Estermethanol	0	0	4.9	5.4
<i>N</i> -Methyl	87.0	87.0	36.4	40.6
<i>O</i> -Methyl	13.0	13.0	14.3	15.7
Carboxyl	0	0	11.4	12.5
Aromatischer Ring	0	0	24.0	26.5

Auch das Estermethanol kann bei der Biosynthese des Damascenins vom Methionin kommen. Die Bildung von Methylestern der Pektinsäure aus Methionin ist bekannt.<sup>8</sup>

Bei Experimenten mit  $^{14}\text{CO}_2$  fanden wir bei einer Versuchsdauer von 1 Stunde die Radioaktivität ausschliesslich in den Methylgruppen wieder. Erst nach einer Versuchsdauer von 2 Tagen wird auch der aromatische Ring markiert (Tab. 2).

Auch bei diesem Versuch kann man auf einen Austausch von *N*-Methylgruppen schliessen. Die Veresterung der Carboxylgruppe mit Methanol auf dem Weg über Methionin ist prin-

<sup>8</sup> S. S. SATO, R. U. BYERRUM und C. D. BALL, *J. Biol. Chem.* 224, 717 (1957).

zipiell möglich, doch ist nicht unwahrscheinlich, dass die Reaktionsmechanismen anderer Art sind also beim *N*- und *O*-Methyl. Das bedarf weiterer Untersuchungen. Zwischenstufen dieser Methylierungen konnten wir mit autoradiographischen Methoden nicht fassen. Die Reaktionen verlaufen wahrscheinlich sehr schnell. Erst das Endprodukt Damascenin wird in besonderen Zellen akkumuliert.

## 2. Herkunft des aromatischen Ringes

Nach den Ergebnissen der Methylierungsversuche ist 3-Hydroxyanthranilsäure als Intermediärprodukt der Biosynthese von Damascenin zu erwarten. 3-Hydroxyanthranilsäure ist als Metabolit des Tryptophanabbaues in Mikroorganismen und Säugetieren bekannt.

Wir fütterten grüne Samen mit Tryptophan-(<sup>3</sup>H) und bestimmten die spezifische Einbaurate in Damascenin. Das gleiche Samenmaterial wurde noch mit anderen radioaktiven Precursoren gefüttert (Tab. 3).

TABELLE 3. EINBAURATEN VERSCHIEDENER PRECURSOREN IN DAMASCENIN

Gefütterte Substanz	IpM/ $\mu\text{M} \times 10^{-6}$	Damascenin IpM/ $\mu\text{M} \times 10^{-3}$	Einbaurate Prozent
Methionin-( <sup>14</sup> CH <sub>3</sub> )	2.8	45.0	1.61
Anthranilsäure-( <sup>14</sup> COOH)	2.7	15.0	0.55
Anthranilsäure-( <sup>3</sup> H)	13.8	21.0	0.15
3-Hydroxyanthranilsäure-( <sup>14</sup> COOH)	1.5	0.6	0.04
3-Hydroxyanthranilsäure-( <sup>3</sup> H)	58.4	18.0	0.03
Tryptophan-( <sup>3</sup> H)	1.8	0.3	0.016

Die unter vergleichbaren Bedingungen erhaltene sehr kleine Einbaurate von Tryptophan lässt vermuten, dass in *Nigella damascena* 3-Hydroxyanthranilsäure auf einem anderen Wege als dem Tryptophanabbau entsteht. Aber auch 3-Hydroxyanthranilsäure selbst wird nur in sehr geringem Masse eingebaut. Dagegen ist die relativ grosse Einbaurate von Anthranilsäure auffällig.

Vielleicht gelangt die 3-Hydroxyanthranilsäure gar nicht zum Ort der Damasceninbiosynthese. Es ist ein Unterschied, ob eine Substanz in der Zelle selbst gebildet wird, oder ob sie erst von aussen eindringen muss. 3-Hydroxyanthranilsäure ist eine sehr unbeständige Substanz, die leicht dem oxydativen Abbau unterliegt. Schon nach kurzem Stehen an der Luft färbt sich die wässrige Lösung vom Natriumsalz der 3-Hydroxyanthranilsäure braun. Gestützt wird unsere Hypothese durch Beobachtungen unter dem Fluoreszenzmikroskop, wobei ein schnelles Verschwinden der Fluoreszenz nach Fütterung von 3-Hydroxyanthranilsäure zu sehen ist. Anthranilsäure ist in Lösung wesentlich beständiger. Auch die an der sauren Hydroxylgruppe geschützte 3-Methoxyanthranilsäure ist beständiger als 3-Hydroxyanthranilsäure. Alle 3 Säuren wurden in einem vergleichbaren Versuch verfüttert<sup>9</sup> (Tab. 4).

Die Einbaurate der 3-Methoxyanthranilsäure nimmt deutlich eine Mittelstellung zwischen Anthranilsäure und 3-Hydroxyanthranilsäure ein. Bei allen 3 Versuchen fanden wir die Radioaktivität des Damascenins im Carboxylkohlenstoff lokalisiert.

Danach findet in *Nigella damascena* eine Hydroxylierung von Anthranilsäure in 3-Stellung statt. Luckner<sup>10</sup> fand eine gleiche Hydroxylierung von Anthranilsäure in *Penicillium*

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

<sup>10</sup> M. LUCKNER, Dissertation, Halle (1962).

TABELLE 4. EINBAURATEN VERSCHIEDENER SÄUREN IN DAMASCENIN

Gefütterte Substanz	IpM/ $\mu$ M $\times 10^{-6}$	Damascenin	
		IpM/ $\mu$ M $\times 10^{-3}$	Einbaurate Prozent
Anthranilsäure-( $^{14}\text{COOH}$ )	1.25	4.0	0.320
3-Methoxyanthranil-säure- $^{14}\text{COOH}$ )	1.75	0.7	0.040
3-Hydroxyanthranil-säure-( $^{14}\text{COOH}$ )	1.75	0.04	0.002

*viridicatum*. Wir konnten aber keine 3-Hydroxyanthranilsäure in den Samen nachweisen und glauben, dass die nachfolgenden Methylierungen sehr rasch verlaufen. Das stimmt mit den Ergebnissen der Methylierungsversuche überein.

Nach den beschriebenen Versuchen nehmen wir Anthranilsäure als Intermediärprodukt der Biosynthese von Damascenin an, und es ergibt sich die Frage nach ihrer biogenetischen Herkunft. Die beiden wichtigsten Wege der Biosynthese aromatischer Ringe sind der über Shikimisäure und der aus Acetateinheiten. Für die Anthranilsäure ist dieser zweite Weg nicht wahrscheinlich. Auch unsere eigenen Vorversuche mit markiertem Acetat haben keine Hinweise geliefert. Dagegen ist bekannt, dass bei Mikroorganismen der Weg zur Bildung von Anthranilsäure über Shikimisäure führen kann. Wir fütterten biosynthetisch  $^{14}\text{C}$ -universal markierte Shikimisäure.<sup>11</sup> Diese wurde auch relativ gut in Damascenin eingebaut (Tab. 5).

TABELLE 5. EINBAURATEN VERSCHIEDENER PRECURSOREN IN DAMASCENIN

Gefütterte Substanz	IpM/ $\mu$ M $\times 10^{-6}$	Damascenin	
		IpM/ $\mu$ M $\times 10^{-3}$	Einbaurate Prozent
Methionin-( $^{14}\text{CH}_3$ )	2.8	9.8	0.343
Anthranilsäure-( $^{14}\text{COOH}$ )	1.25	2.8	0.224
Shikimisäure-( $^{14}\text{C}$ )	0.17	0.09	0.053
Glucose-( $^{14}\text{C}$ ) im Dunkeln	2.0	0.86	0.043
Glucose-( $^{14}\text{C}$ ) im Hellen	2.0	0.56	0.028
Bernsteinsäure-( $^{14}\text{C}$ -1,4)	2.8	0.09	0.007
Asparaginsäure-( $^{14}\text{C}$ -4)	2.2	0.028	0.0026
Fumarsäure-( $^{14}\text{C}$ -1,4)	1.8	0.029	0.0017
Glutaminsäure-( $^{14}\text{C}$ -2)	3.2	0.007	0.0002

Um zu sehen, ob Shikimisäure als ganzes Molekül in Damascenin eingeht, decarboxylierten wir die  $^{14}\text{C}$ -universal markierte Shikimisäure und bestimmten das Verhältnis  $^{14}\text{COOH}$ /Shikimisäure-( $^{14}\text{C}$ ). In der Damasceninsäure fanden wir ein gleiches Verhältnis wieder (Tab. 6).

Dieses Ergebnis macht es sehr wahrscheinlich, dass das Kohlenstoffskelett der Shikimisäure unverändert in Damascenin eingebaut wird. Auch Glucose wird ähnlich Shikimisäure relativ gut in Damascenin eingebaut (Tab. 5). Die Einbaurate nach Glucosefütterung im Dunkeln ist grösser als im Hellen. In den grünen Samen findet Photosynthese statt,<sup>4</sup> wodurch die applizierte radioaktive Glucose verdünnt wird. Dadurch ergibt sich bei Fütterungsversuchen im Hellen eine kleinere Einbaurate als bei Fütterung im Dunkeln. Die Verteilung der Radioaktivität im Damascenin nach Glucosefütterung (Tab. 7) lässt auf

<sup>11</sup> L. H. WEINSTEIN, C. A. PORTER und H. J. LAURENCOT, *Contribs. Boyce Thompson Inst.* 21, 439 (1962).

TABELLE 6. IN DER CARBOXYLGRUPPE LOKALISierter TEIL DER GESAMT-RADIOAKTIVITÄT VON SHIKIMISÄURE-( $^{14}\text{C}$ ) UND DARAUS ERHALTENER DAMASCENINSÄURE-( $^{14}\text{C}$ )

	IpM/ $\mu\text{M}$ $\times 10^{-3}$	BaCO <sub>3</sub> IpM/ $\mu\text{M}$ $\times 10^{-3}$	Prozent COOH
Shikimisäure	12.41	1.52	12.3
Damasceninsäure	0.088	0.011	12.5

TABELLE 7. VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT IM DAMASCENIN NACH FÜTTERUNG VON GLUCOSE-( $^{14}\text{C}$ ) IM HELLEN UND IM DUNKELN

	im Hellen		im Dunkeln	
	IpM/ $\mu\text{M}$	Prozent	IpM/ $\mu\text{M}$	Prozent
Damascenin	371	100.0	638	100.0
Estermethanol	0	0	0	0
N-Methyl	36	9.7	75	11.7
O-Methyl	47	12.7	52	8.1
Carboxyl	33	9.0	69	10.8
Aromat. Ring	255	68.6	442	69.4

eine Gleichverteilung schliessen. Ausgenommen davon ist das Estermethanol, was auch auf einen besonderen Bildungsmechanismus hinweist.

Weiterhin war noch auf eine Beteiligung von Asparaginsäure analog der Nicotinsäurebildung in *Mycobacterium tuberculosis*<sup>12</sup> zu prüfen. Die Einbautraten von gefütterter Asparaginsäure, Bernsteinsäure und Fumarsäure, sowie der ebenfalls applizierten Glutaminsäure sind jedoch relativ zu anderen Precursoren sehr klein. Bei Fütterung von Asparaginsäure-( $^{14}\text{C}$ -4) wäre eine vorwiegende Lokalisation der Radioaktivität im Carboxylkohlenstoff des Damascenins zu erwarten, ebenso bei Fütterung von Bernsteinsäure-( $^{14}\text{C}$ -1,4) und Fumarsäure-( $^{14}\text{C}$  1, 4)-Nach den durch Decarboxylierung von Damasceninsäure erhaltenen Werten ist das jedoch nicht der Fall (Tab. 8).

TABELLE 8. IN DER CARBOXYLGRUPPE DES DAMASCENINS LOKALISierter TEIL DER GESAMTAKTIVITÄT NACH FÜTTERUNG  $^{14}\text{C}$ -CARBOXYLMARKIERTER SÄUREN

	Prozent $^{14}\text{COOH}$
Asparaginsäure-( $^{14}\text{C}$ -4)	15.6
Bernsteinsäure-( $^{14}\text{C}$ -1,4)	14.0
Fumarsäure-( $^{14}\text{C}$ -1,4)	18.7

Eine direkte Beteiligung von Asparaginsäure und verwandten Dicarbonsäuren an der Biosynthese von Damascenin ist danach nicht wahrscheinlich.

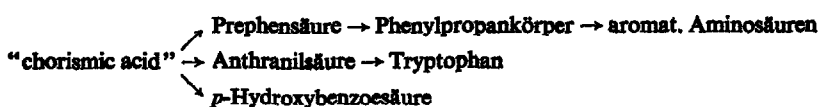
<sup>12</sup> E. Mothes, D. Gross, H. R. Schütte und K. Mothes, *Naturwiss.* 48, 623 (1961).

## DISKUSSION

Die dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass Damascenin aus dem Zuckerstoffwechsel über Shikimisäure gebildet wird. Anthranilsäure kann dabei ein Zwischenprodukt sein.

Der Biosyntheseweg Kohlenhydrate  $\rightarrow$  Shikimisäure  $\rightarrow$  aromatische Aminosäuren wurde in Bakterien mit Hilfe der Mutantenblock-Methode gefunden.<sup>13</sup> Aber auch in der höheren Pflanze ist dieser Weg verwirklicht. Die Umwandlung von Shikimisäure in Phenylalanin und Tyrosin wurde für *Salvia splendens*, *Triticum vulgare* und *Fagopyrum* nachgewiesen.<sup>14</sup> Weinstein, Porter und Laurencot<sup>15</sup> fanden, dass 9 Spezies höherer Pflanzen Chinasäure in Shikimisäure, Phenylalanin und Tyrosin umwandeln können. Auch wir fanden autoradiographisch radioaktiv markiertes Tyrosin und Phenylalanin in den Samen von *Nigella damascena* nach Fütterung von Shikimisäure-(<sup>14</sup>C). Für eine ganze Reihe anderer Verbindungen ist der Syntheseweg über Shikimisäure bekannt, Zusammenfassung bei Neish.<sup>16</sup>

Bei der Biosynthese von Tryptophan in Bakterien und in Bäckerhefe wurde Anthranilsäure als Intermediärprodukt gefunden. Durch weitere Arbeiten mit Mikroorganismen ergab sich die Synthesefolge: Shikimisäure  $\rightarrow$  Shikimisäure-5-phosphat  $\rightarrow$  3-Enolpyruvylshikimisäure-5-phosphat<sup>17</sup>  $\rightarrow$  "chorismic acid"<sup>18-21</sup>  $\rightarrow$  Anthranilsäure. "Chorismic acid" wird als Verzweigungsstelle angesehen (Schema 1).



SCHEMA 1. VERZWEIGUNG DES STOFFWECHSELS BEI "CHORISMIC ACID"

Über die Herkunft des Stickstoffs in der Anthranilsäure liegen nur Ergebnisse von Experimenten mit Mikroorganismen vor. Srinivasan<sup>22</sup> fand Anthranilsäure in dem zellfreien Extrakt einer *E. coli*-Mutante nach Zugabe von Shikimisäure-5-phosphat und L-Glutamin. Ebenfalls im zellfreien Extrakt einer *Aerobacter aerogenes*-Mutante wird Anthranilsäure-(<sup>15</sup>N) aus "chorismic acid" und L-Glutamin-(Amid-<sup>15</sup>N) gebildet. Auch Ammoniumionen werden als N-Quelle genutzt.<sup>23</sup> Lingens, Lück und Goebel<sup>24</sup> zeigten die Beteiligung von Glutamin an der Biosynthese von Anthranilsäure in Mutanten der Bäckerhefe.

In der höheren Pflanze wurde die Umwandlung von Shikimisäure in Tryptophan in Gerstenkeimlingen gefunden.<sup>25</sup> Für Bohnenblätter konnte dies nicht bestätigt werden.<sup>26</sup>

In den grünen Samen von *Nigella damascena* wird Damascenin auf dem Wege Kohlenhydratstoffwechsel  $\rightarrow$  Shikimisäure  $\rightarrow$  Anthranilsäure  $\rightarrow$  Damascenin gebildet. Gegen eine

<sup>13</sup> B. D. DAVIS, in W. D. McELROY und B. GLASS, *A Symposium on Amino Acid Metabolism*, Baltimore, S. 799 (1955).

<sup>14</sup> A. C. NEISH, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **11**, 55 (1960).

<sup>15</sup> L. H. WEINSTEIN, C. A. PORTER und H. J. LAURENCOT, *Contribs. Boyce Thompson Inst.* **21**, 201 (1961).

<sup>16</sup> A. C. NEISH, in J. B. HARBORNE, *Biochemistry of Phenolic Compounds*, S. 295, London (1964).

<sup>17</sup> A. RIVERA und P. R. SRINIVASAN, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **48**, 864 (1962).

<sup>18</sup> F. GIBSON und L. M. JACKMAN, *Nature* **198**, 388 (1963).

<sup>19</sup> M. I. GIBSON und F. GIBSON, *Biochem. J.* **90**, 248 (1964).

<sup>20</sup> F. GIBSON, *Biochem. J.* **90**, 256 (1964).

<sup>21</sup> F. LINGENS und W. LÜCK, *Angew. Chem.* **76**, 51 (1964).

<sup>22</sup> P. R. SRINIVASAN, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1772 (1959).

<sup>23</sup> J. M. EDWARDS, F. GIBSON, L. M. JACKMAN und J. S. SHANNON, *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 78 (1964).

<sup>24</sup> F. LINGENS, W. LÜCK und W. GOEBEL, *Z. Naturforschg.* **18b**, 851 (1963).

<sup>25</sup> F. WIGHTMAN, M. P. CHISHOLM und A. C. NEISH, *Phytochem.* **1**, 30 (1961).

<sup>26</sup> L. H. WEINSTEIN, C. A. PORTER und H. J. LAURENCOT, *Nature* **194**, 205 (1962).

Entstehung analog der Salicylsäure, — Phenylpropankörper  $\xrightarrow[\text{o-Hydroxylierung}]{\beta\text{-Oxydation}}$  Salicylsäure-, spricht der Befund, dass Shikimisäure als ganzes Molekül eingebaut wird. Bei dem Weg über einen Phenylpropankörper würde auf der Stufe der Prephensäure die Carboxylgruppe der Shikimisäure durch Decarboxylierung eliminiert werden.

Anthranilsäure- $(^{14}\text{COOH})$  wird in den grünen Samen in Damascenin eingebaut. Dabei erfolgt wahrscheinlich eine Hydroxylierung in 3-Stellung. Eine solche Hydroxylierung von Anthranilsäure wurde in *Penicillium viridicatum* von Luckner<sup>10</sup> gefunden. Nair und Vaidyanathan<sup>27</sup> isolierten aus Blättern von *Tecomastan* ein Enzym, das Anthranilsäure in 3-Hydroxyanthranilsäure überführt. Dabei ist 3-Hydroxyanthranilsäure ein Intermediärprodukt der Oxydation von Anthranilsäure zu Catechin.

*o*- und *p*-Hydroxylierungen finden im Gewebe der höheren Pflanze leicht statt.<sup>28</sup> *m*-Hydroxylierung scheint sehr selten zu sein.

Die Möglichkeit einer Bildung von 3-Hydroxyanthranilsäure über *o*-Pyrocatechusäure muss noch überprüft werden. Weiterhin ungeklärt ist die Frage, ob auch in der höheren Pflanze der Weg von Shikimisäure zu Anthranilsäure → Damascenin über "chorismic acid" führt. Das kann nur durch Fütterungsversuche mit einer spezifisch markierten "chorismic acid" entschieden werden. Experimente über die Herkunft des Stickstoffs im Damascenin sind im Gange.

## METHODEN

### 1. Material

*Nigella damascena* wurde im Freiland kultiviert. Für die Versuche wurden grüne Samen von möglichst gleichem Entwicklungsstadium verwendet. Die Kontrolle des Entwicklungsstadiums erfolgte unter einem Stereomikroskop im u.v.-Licht, da mit Beginn der Alkaloidbildung die blaue Fluoreszenz des Damascenins auftritt.<sup>1</sup>

### 2. Fütterungsversuche

Bei Fütterung mit  $^{14}\text{CO}_2$  wurden die Samen in eine geschlossene Glaskammer gebracht. Das aus Bariumcarbonat mit Phosphorsäure freigesetzte  $\text{CO}_2$  brachten wir mit einer Membranpumpe durch die Klüvette in einen Kreislauf. Bei Fütterung fester Substanzen wurden die Samen in einer Petrischale in eine entsprechende Lösung gelegt, 1 ml Lösung pro 1 g Samen. Nach einigen Stunden war die Lösung aufgesaugt, und nach Spülen mit Wasser blieben die Samen ca. 2–3 Tage bis zur Lufttrockene liegen.

### 3. Isolierung des Damascenins

Die Samen wurden mit Quarzsand zerrieben und im Soxhlet mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung schüttelten wir mit 12 Prozentiger HCl aus. Der saure Auszug wurde unter Kühlung mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  alkalisch gemacht und das Damascenin mit Äther ausgeschüttelt. Nach Waschen, Trocknen und Einengen des Äthers fällten wir das Damascenin mit ätherischer Pikrinsäurelösung als Pikrat. Damasceninpikrat: F. 161–162°.

### 4. Abbau des Damascenins

Aus dem Damasceninpikrat wurde die Base mit konzentriertem  $\text{NH}_4\text{OH}$  freigesetzt und mit Äther ausgeschüttelt.

<sup>27</sup> P. M. NAIR und C. S. VAIDYANATHAN, *Phytochem.* 3, 513 (1964).

<sup>28</sup> R. K. IBRAHIM und G. H. N. TOWERS, *Nature* 184, 1803 (1959).

(a) *Damasceninsäure-HCl*. Damascenin wird 20–30 Minuten in 6*N*-HCl unter Rückfluss gekocht und die Lösung anschliessend auf dem Wasserbad stark eingeeengt. Beim Abkühlen kristallisiert Damasceninsäure-HCl aus. Es wird abgesaugt und mit kalter 6*N*-HCl gewaschen. Damasceninsäure-HCl: F. 208–209°.

Die Radioaktivität des Estermethanols wurde als Differenz zwischen Damascenin und Damasceninsäure-HCl berechnet. In einigen Fällen verseiften wir das Damascenin in einem evakuierten Kolben, destillierten das wässrige Methanol ab und verbrannten es in neutraler wässriger Lösung mit Dichromat/Jodat/Schwefelsäure nach der Vorschrift von Boeckh-Behrens<sup>29</sup> zu CO<sub>2</sub>, welches als BaCO<sub>3</sub> zur Messung gebracht wurde.

(b) *Carboxyl-Kohlenstoff*. Damasceninsäure-HCl wurde in Chinolin mit der gleichen Menge Kupferchromitkatalysator bei 240–260° decarboxyliert und das CO<sub>2</sub> in Bartylaug als BaCO<sub>3</sub> aufgefangen.

(c) *Isolierung der Methylgruppen*. Zur Isolierung von *O*-Methyl wurde Damasceninsäure-HCl in der Apparatur nach Sirotenko<sup>30</sup> 2 Stunden in HJ gekocht und das Methyljodid in 5 Prozentiger alkoholischer Trimethylaminlösung, die mit Trockeneis/Alkohol gekühlt wurde, aufgefangen. Nach Stehen über Nacht wurde die Lösung mit KOH alkalisch gemacht und zur Entfernung von überschüssigem Trimethylamin mehrfach eingedampft. Der mit Wasser aufgenommene Rückstand wurde neutralisiert und das Tetramethylammoniumjodid mit konzentrierter wässriger Reineckesalzlösung als Reineckat gefällt. Das Reineckat kristallisierten wir aus Aceton/Wasser bis zur konstanten Radioaktivität um.

Zur Isolierung des *N*-Methyls gaben wir anschliessend noch 50 mg NH<sub>4</sub>J in das Reaktionskölbchen, setzten das Sammelgefäss in die Apparatur ein und erhitzen 2 mal auf 360°. Das Methyljodid wurde wieder in Trimethylaminlösung aufgefangen, die Aufarbeitung zum Reineckat erfolgte wie beim *O*-Methyl.

(d) *Die Radioaktivität im aromatischen Ring ergibt sich als Differenz der Aktivitäten von Damascenin und Kohlenstoff 7–10.*

5. *Alle Messungen der Radioaktivität wurden mit einem Methandurchflusszähler ausgeführt.*

<sup>29</sup> U. SCHIEDT und G. BOECKH-BEHRENS, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **330**, 68 (1962).

<sup>30</sup> SIROTENKO, zitiert nach Pregl-Roth, *Quantitative organische Mikroanalyse*, S. 289, Wien (1958).