

N-METHYLORNITHIN ALS VORSTUFE DES PYRROLIDINRINGES IN NICOTIN

H.-B. Schröter und D. Neumann

Institut für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie
der Wissenschaften zu Berlin, Halle (Saale)

(Received 24 January 1966)

Tracer-Experimente, die in verschiedenen Laboratorien zur Biosynthese des Nicotins durchgeführt worden sind, gestatten folgende Aussagen über die Entstehung des N-methylierten Pyrrolidinringes:

1. Ornithin, Putrescin, Glutaminsäure und Prolin sind Vorstufen des Pyrrolidinringes. Der Mechanismus der Cyclisierung wird z.B. von MOTHES und SCHÜTTE (1), LESTIE (2) und RAPOPORT (3)(4) diskutiert;
2. die Methylgruppe stammt aus Methionin oder anderen Donatoren biologisch labiler C₁-Fragmente, wie insbesondere BYERRUM und Mitarbeiter nachgewiesen haben (1)(4). SCHRÖTER (5) hat die Frage präzisiert, ob Nornicotin direkt zu Nicotin methyliert werden kann (Weg A) oder ob die CH₃-Gruppe bereits vor der Cyclisierung in die Aminogruppe eines Pyrrolidinring-Precursors eingeführt wird (Weg B). LADESIC und TSO (6) sowie SCHRÖTER (7)(8) haben durch Experimente mit verschiedenen Nicotiana-Arten Nornicotin als Vorstufe des Nicotins nachgewiesen. Die von MIZUSAKI, KISAKI und TAMAKI (9) publizierten Resultate und die von RAPOPORT et al. (3)(4)(10) und SCHRÖTER (11) durchgeführten ¹⁴CO₂-Assimilationsversuche sprechen eher für Weg B.

Herrn Prof.Dr.K.MOTHES danken wir für mannigfache Anregungen und für die stete Unterstützung dieser Untersuchungen.

Ornithin - eine sehr effektive Vorstufe des Pyrrolidinringes - markierten wir nach dem von NEUMANN und SCHRÖTER (12) angegebenen Verfahren am α -oder am δ -N-Atom mit einer ^{14}C -Methylgruppe. Versuchsobjekte waren bewurzelte Blätter oder sterile Wurzelkulturen von *Nicotiana rustica* im Stadium lebhafter Alkaloidsynthese. Die bewurzelten Blätter nahmen wässrige Lösungen der radioaktiven Precursoren innerhalb von 2 Stunden über die Wurzeln auf und zeigten bei Abbruch der Versuche nach 4 Tagen keine äußerlich erkennbaren Schädigungen. Nach dem Trocknen des Pflanzenmaterials bei 70°C wurden die Pyridin-Alkaloide durch Wasserdampfdestillation isoliert, im Destillat spektrophotometrisch bei 259 nm bestimmt und papierchromatographisch getrennt. Etwa 95 % der Alkaloid-Gesamtmenge entfielen auf das Nicotin, welches aus den Chromatogrammen eluiert und mit jeweils 50 mg inaktivem Nicotin verdünnt wurde. Mit einem geringen Überschuß der theoretisch erforderlichen Menge Pikrinsäure wurde das Alkaloid gefällt und das Dipikrat ($F = 222-223^{\circ}\text{C}$) bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität umkristallisiert. Für die Messung benutzten wir einen Methandurchflußzähler in Verbindung mit einem Zählgerät FH 49 (FRIESECKE & HÖPFNER, Erlangen-Bruck). Zur Bestimmung der Aktivität der N-ständigen CH_3 -Gruppe wurde das Nicotindipikrat durch einen Anionenaustauscher (WOFATIT L 150) wieder in die freie Base überführt und in der Apparatur nach SIROTENKO (13) mit Jodwasserstoffsäure erhitzt. Das entstehende Methyljodid wurde mit einem Stickstoffstrom in Trimethylaminlösung eingeleitet und das Tetramethylammoniumhydroxyd als Reineckat gefällt.

TABELLE 1Einbau von α -Methylornithin-(N- 14 CH $_3$) α -Methylornithin-(N- 14 CH $_3$): $1.02 \cdot 10^9$ Imp/min/mMol

	spez. Aktivität Imp/min/mMol	Spez. Einbaurrate %	Anteil der CH $_3$ -Gruppe an d. Gesamt- aktivität(%)
Bewurzelte Blätter			
Nicotin	$2.1 \cdot 10^6$	0.2	
N-CH $_3$ -Gruppe	$1.0 \cdot 10^6$		57
Wurzelkulturen			
Nicotin	$5.1 \cdot 10^6$	0.5	
N-CH $_3$ -Gruppe	$2.6 \cdot 10^6$		51

TABELLE 2Einbau von δ -Methylornithin-(N- 14 CH $_3$) δ -Methylornithin-(N- 14 CH $_3$): $9.4 \cdot 10^8$ Imp/min/mMol

	spez. Aktivität Imp/min/mMol	spez. Einbaurrate %	Anteil der CH $_3$ -Gruppe an d. Gesamt- aktivität(%)
Bewurzelte Blätter			
Nicotin	$4.6 \cdot 10^5$	0.05	
N-CH $_3$ -Gruppe	$6.4 \cdot 10^4$		14
Wurzelkulturen			
Nicotin	Einbau zu gering; nicht mehr meßbar.		

TABELLE 3Einbau von α -Methyllysin-(N- 14 CH $_3$) in Nicotin α -Methyllysin-(N- 14 CH $_3$): $2.1 \cdot 10^9$ Imp/min/mMol

	spez. Aktivität Imp/min/mMol	spez. Einbaurrate %	Anteil der CH $_3$ -Gruppe an d. Gesamt- aktivität(%)
--	------------------------------------	---------------------------	--

Bewurzelte Blätter

Nicotin	$1.86 \cdot 10^5$	0.008	
N-CH $_3$ -Gruppe	nicht meßbar		-

Die Tabellen 1 und 2 enthalten die Werte typischer Versuche: α -Methylornithin-(N- 14 CH $_3$) wird stets wesentlich besser in den Pyrrolidinring des Nicotins inkorporiert als δ -Methylornithin-(N- 14 CH $_3$). Dieser Befund und die Tatsache, daß die Methylgruppe des α -Methyllysins-(N- 14 CH $_3$) nicht transmethyliert wird (Tabelle 3) stimmen mit unseren analogen Versuchen zur Biogenese des Pyrrolidinringes in Tropanalkaloiden (14) überein. Die Feststellung, daß jeweils nur etwa die Hälfte der in das Nicotin eingebauten Aktivität in der Methylgruppe wiedergefunden wird, erfordert weitere Untersuchungen, mit denen wir beschäftigt sind. Sehr wahrscheinlich ist jedoch, daß die CH $_3$ -Gruppe bereits vor der eigentlichen Cyclisierung in eine Vorstufe des Nicotin-Pyrrolidinringes eingeführt werden kann und daß es somit vielleicht zwei Biosynthese-Wege gibt, die zu demselben Ringsystem führen. Es ist nicht auszuschließen, daß beide Reaktionen nebeneinander ablaufen und daß vor allem der physiologische Zustand der Pflanzen darüber entscheidet, auf welchem Wege die Hauptmenge des Nicotins synthetisiert wird. Scheinbar widersprechende Resultate würden sich mit dieser Hypothese zwanglos erklären lassen.

L i t e r a t u r

1. K.MOTHES und H.R.SCHÜTTE, *Angew.Chem.*75, 265 (1963)
2. E.LEETE, E.G.GROS und T.J.GILBERTSON, *Tetrahedron Letters* No.11, 587 (1964)
3. W.L.ALWORTH, R.C.DREKELMS und H.RAPOFORT, *J.Am.Chem.Soc.*
86, 1608 (1964)
4. H.RAPOFORT, 3.Internationales Symposium "Biochemie und Physiologie der Alkaloide", Halle/S. 1965 (im Druck)
5. H.-B.SCHRÖTER, Actes du 2^{ème} Congrès Scientifique International du Tabac,Brüssel,426 (1958)
6. B.LADESIC und T.C.TSO, *Phytochemistry* 3, 541 (1964)
7. H.-B.SCHRÖTER, *Wiss.Z.Univ.Halle,Math.-Nat.* X/5, 1135 (1961)
8. H.-B.SCHRÖTER, 3.Internationales Symposium "Biochemie und Physiologie der Alkaloide",Halle/S. 1965 (im Druck)
9. S.MIZUSAKI, T.KISAKI und F.TAMAKI, *Agr.Biol.Chem.*29, 719 (1965)
10. W.L.ALWORTH, A.A.LIEBMAN und H.RAPOFORT, *J.Am.Chem.Soc.*
86, 3375 (1964)
11. H.-B.SCHRÖTER, nicht publiziert
12. D.NEUMANN und H.-B.SCHRÖTER, *Z.Chem.* 5, 385 (1965)
13. A.A.SIROTENKO, *Mikrochim.Acta (Wien)* 1955, 1
14. D.NEUMANN und H.-B.SCHRÖTER (im Druck)