

## Nachweis von Homologen des Spermidins in der Grünalge *Scenedesmus acutus* 276-3a

Amines of Unicellular Green Algae, III

Identification of Homologues of Spermidine in the Green Alga

*Scenedesmus acutus* 276-3a

H. Kneifel und I. Rolle

Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung MBH, Abteilung für Algenforschung  
und Algentechnologie, Dortmund

B. Paschold

Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie, Dortmund

(Z Naturforsch. **32 c**, 190–192 [1977]; eingegangen am 4. Januar 1977)

Green Alga, Polyamine, Trifluoroacetyl Derivatives

Two homologues of spermidine, N-(3-aminopropyl)-1,3-diaminopropane (**1**) and N-(4-aminobutyl)-1,4-diaminobutane (**2**), were identified in *Scenedesmus acutus* 276-3a. For identification, extracts of algae were trifluoroacetylated and investigated by combined gas chromatography/mass spectrometry.

### Einleitung

Bei den bis jetzt untersuchten einzelligen Grünalgen sind Putrescin (1,4-Diaminobutan) und Spermidin N-(3-Aminopropyl)-1,4-diaminobutan) die mengenmäßig überwiegenden Polyamine<sup>2,3</sup>. Oft zusammen mit Spermin auftretend, wurden diese Amine auch in nahezu allen bisher untersuchten Lebewesen gefunden, was angesichts der Funktion dieser Verbindungen im Zellstoffwechsel<sup>4</sup> verständlich erscheint.

Zum Nachweis weiterer Amine in Mikroalgen mußten empfindliche Methoden eingesetzt werden, da die Amingehalte relativ gering sind. Als hierfür geeignet erwies sich die Gas-Chromatographie trifluoracetylierter Algenextrakte. Neben hohem Trennvermögen und großer Empfindlichkeit bietet die Kombination Gas-Chromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) gleichzeitig eine gute Möglichkeit für Strukturuntersuchungen.

### Material und Methoden

#### Chemikalien

Dichlormethan, p. a.; Essigsäure, p. a.; Trifluoressigsäureanhydrid, z. S.; 1,4-Dibrombutan, z. S.;

Sonderdruckanforderungen an Dr. Helmut Kneifel, GSF, Abteilung Algenforschung und Algentechnologie, Bunsen-Kirchhoff-Str. 13, D-4600 Dortmund 1.

Tetramethyldiamin, z. S.; Phthalimid-Kalium, z. S. (alle Merck, Darmstadt); Spermidinphosphat, puriss.; Bis-(3-aminopropyl)-amin (**1**) (beide Fluka, Neu-Ulm). **2** war nicht im Handel erhältlich und mußte synthetisiert werden (s. u.).

#### Extraktion der Algen

Die Algen wurden nach dem Dortmunder Verfahren in Freilandkulturen gezüchtet<sup>5</sup> und durch Zentrifugation abgetrennt. 100 g Algenmasse wurden nach Zugabe von 40 ml 25% Essigsäure zwei Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde zentrifugiert, die überstehende gelbe Lösung bis auf etwa 10 ml im Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und anschließend mit 50% wäßriger KOH auf pH 14 gebracht. Die Extraktion der Amine erfolgte mit Chloroform (dreimal 5 ml), wobei die Phasentrennung durch Zentrifugation beschleunigt wurde. Nach Zugabe einiger Tropfen Essigsäure wurde das Chloroform im Rotationsverdampfer entfernt.

Zur Sicherung des Vorkommens der beschriebenen Substanzen in Algen wurden analoge Versuche auch mit sterilen Algen durchgeführt.

#### Derivatisierung

Der getrocknete Algenextrakt wurde in Schraubdeckelgläschen (Deckel mit Tefloneinlage) nach Zugabe von 200 µl Dichlormethan mit 50 µl Trifluoressigsäureanhydrid 30 min lang bei 40 °C zur



Reaktion gebracht. Nach Abblasen des überschüssigen Reagens und des Lösungsmittels mit Reinststickstoff wurde der Rückstand in wenig Äthanol aufgenommen.

### GC/MS

Trennung an gepackten Säulen (L.: 6 ft; i.D.: 2 mm, 3% OV 17 auf Chromosorb HP, AW, DMCS). Trägergas: 30 ml Helium/min; Temperaturprogramm: 100–280 °C, 10 °C/min. Gerät: VARIAN AEROGRAPH 2740 gekoppelt mit einem VARIAN MAT Massenspektrometer CH 7. Abtrennung des Heliums mit einem zweistufigen BIEMANN-WATSON-Separator mit Glasfritten. Bedingungen der Massenspektrometrie: Elektronenenergie: 70 eV; Ionenquelle: 200 °; Elektronenemission: 100 µA. Verarbeitung der Daten mit dem VARIAN MAT Spektrosystem 100 MS.

### Synthese von 2

N-(4-Brombutyl)-phthalimid wurde aus Phthalimid-Kalium und 1,4-Dibrombutan synthetisiert<sup>6</sup> und anschließend mit Putrescin umgesetzt<sup>7</sup>. Zur Reinigung wurden 5 g des rohen **2** (als Acetat) auf einen schwach sauren Ionenaustauscher aufgetragen (Biorex 70, H-Form, Bio-Rad, München; Säule: 50 × 1,5 cm). Zunächst wurde mit 100 ml Wasser gewaschen, anschließend mit 0,1 N HCl eluiert. Dabei wurde in den ersten Fraktionen Putrescin nachgewiesen, danach verließ dünnstichtchromatographisch reines **2** die Säule. In den letzten Fraktionen traten weitere aminartige Nebenprodukte der Synthese auf.

Das auf diese Weise erhaltene Hydrochlorid des **2** besaß die folgenden Analysenwerte:

C<sub>8</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (268,7)

	C	H	Cl	N
Ber.	35,76	9,02	39,58	15,64,
Gef.	36,37	8,91	39,31	15,45.

Schmelzpunkt: > 250 °C.

Sein IR-Spektrum stimmte mit dem veröffentlichten IR-Spektrum des Hydrochlorids von **2** überein<sup>8</sup>.

### Resultate und Diskussion

Die gaschromatographische Untersuchung der trifluoracetylierten Algenextrakte mit Hilfe eines stickstoffspezifischen Detektors ergab das Vorliegen einer Vielzahl von stickstoffhaltigen Verbindungen. Durch gekoppelte GC/MS konnten β-Phenylethylamin,

Putrescin, Spermidin, Cadaverin und Piperazin nachgewiesen werden, von denen die beiden letzteren erst vor kurzem für Algen beschrieben worden waren<sup>1</sup> (s. Abb. 1). Die Massenspektren von drei benachbarten Peaks (A, B, C) zeichneten sich durch große Ähnlichkeit aus (s. Tab. I). Der mittlere Peak

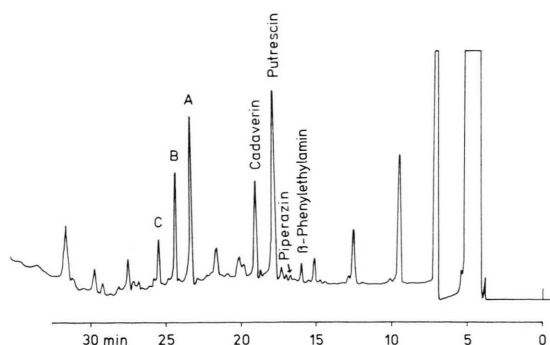


Abb. 1. Gas-Chromatogramm eines trifluoracetylierten Extraktes von *Scenedesmus acutus* 276-3a (Ordinate: Totalionenstrom).

Tab. I. Hauptmassen der Massenspektren der Trifluoracetyl-derivate des Spermidins und seiner Homologen.

TFA-Amine	B (Spermidin)		A		C	
	m/e	%	m/e	%	m/e	%
M <sup>+</sup>	433	<0,5	419	<0,5	447	<0,5
M <sup>+</sup> - 69 <sup>a</sup>	364	19,3	350	15,1	378	8,5
M <sup>+</sup> - 97 <sup>b</sup>	336	25,1	322	21,0	350	9,4
M <sup>+</sup> - 99 <sup>c</sup>	334	9,9	320	12,9	348	0,8
M <sup>+</sup> -112 <sup>d</sup>	321	4,1	307	2,7	335	1,6
M <sup>+</sup> -113 <sup>e</sup>	320	10,5	306	8,0	334	4,8
M <sup>+</sup> -126 <sup>f</sup>	307	12,5	293	7,0	321	9,7
	223	26,5		<0,5		19,1
	209	13,4		37,2		2,9
	168	32,5		1,3		36,0
	167	14,9		4,6		14,2
	166	49,0		2,1		55,7
	154	80,8		100		7,3
	153	3,8		5,2		1,0
	152	26,1		26,3		5,0
	140	31,4		22,0		9,5
	126	100		73,4		64,0
	114	12,0		2,3		17,6
	98	9,1		3,2		9,2
	84	9,5		9,4		11,2
	69	40,7		31,4		23,9
	55	77,6		7,0		100

<sup>a</sup> MZ 69 ≙ CF<sub>3</sub>.

<sup>b</sup> MZ 97 ≙ COCF<sub>3</sub>.

<sup>c</sup> MZ 99 ≙ COCF<sub>3</sub>+2 H.

<sup>d</sup> MZ 112 ≙ HNCOCF<sub>3</sub>.

<sup>e</sup> MZ 113 ≙ H<sub>2</sub>NCOCF<sub>3</sub>.

<sup>f</sup> MZ 126 ≙ CH<sub>2</sub>NHCOCF<sub>3</sub>.

Ebenso vgl. ref. <sup>9</sup>.

konnte nach Aufnahme eines Vergleichs-Massenspektrums als Tris-TFA-Spermidin identifiziert werden. Verglichen mit dem Massenspektrum des Tris-TFA-Spermidins zeigten die beiden anderen Peaks ähnliche Massenverteilung im Bereich niedriger Massen, aber auch eine charakteristische Verschiebung um 14 Masseneinheiten im oberen Massenbereich. Gleichzeitig lag der Molekülpeak der früher eluierten Substanz (A) um 14 Masseneinheiten niedriger, der der später eluierten Substanz (C) um 14 Masseneinheiten höher als der Molekülpeak des Spermidinderivates.

Auf Grund dieser Massenunterschiede wurden die beiden unbekannten Substanzen als Homologe des Spermidins gedeutet. Die Massenverteilung gab gleichzeitig Hinweise auf eine symmetrische Struktur und damit auf das Vorliegen von sym-Norspermidin (N-(3-Aminopropyl)-1,3-diaminopropan; **1**; Peak A) und sym-Homospermidin (N-(4-Aminobutyl)-1,4-diaminobutan; **2**; Peak C).

Zur endgültigen Sicherung der Struktur wurden von den entsprechenden Vergleichssubstanzen die Massenspektren der TFA-Derivate mittels kombinierter GC/MS aufgenommen. Hierbei stimmten sowohl die Retentionszeiten der GC als auch die Massenspektren überein.

Homologe des Spermidins wurden in der Natur bisher selten aufgefunden. Während **1** in einigen Pflanzenviren<sup>10</sup> und neuerdings auch in einem thermophilen Bakterium nachgewiesen wurde<sup>11</sup>, konnte **2** bisher lediglich aus den Blättern des Sandelbaumes, *Santalum album* L., isoliert werden<sup>8</sup>. Das symmetrische N,N,N',N'-Tetramethyl-N-palmitoyl- und das analoge N-palmitenoylderivat von **2** konnten ebenfalls in einer Pflanze, *Solanum tripartitum*, aufgefunden werden<sup>12</sup>. Beide Derivate zeigten tumorhemmende Wirksamkeit. Da bei den bisherigen Untersuchungen der Polyaminzusammensetzung verschiedener Organismen häufig Trennmethode mit relativ geringer Auflösung eingesetzt wurden, erscheint es möglich, daß das Vorkommen der Homologen des Spermidins in manchen Fällen übersehen wurde. Untersuchungen über die Verbreitung dieser Homologen des Spermidins bei Algen verschiedener systematischer Gruppen sind zur Zeit im Gange.

Wir danken dem Bundesministerium für Forschung und Technologie für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Hobucher danken wir für die technische Mitarbeit sowie Herrn Dr. Stengel und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung von Algenmaterial.

<sup>1</sup> Teil II: I. Rolle, H.-E. Hobucher, H. Kneifel, B. Paschold, W. Riepe u. C. J. Soeder, *Analytic. Biochem.* **77**, 103 [1977].

<sup>2</sup> T. Kanazawa, T. Yanagisawa u. H. Tamiya, *Z. Pflanzenphysiol.* **54**, 57 [1966].

<sup>3</sup> I. Rolle, R. Payer u. C. J. Soeder, *Arch. Mikrobiol.* **77**, 185 [1971].

<sup>4</sup> Eine Zusammenfassung der neueren Literatur bietet: C. W. Tabor u. H. Tabor, *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 285 [1976].

<sup>5</sup> E. Stengel, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **83**, 589 [1970].

<sup>6</sup> Weygand-Hilgetag, „Organisch Chemische Experimentierkunst“, Verlag Johann Ambrosius Barth Leipzig, 4. Aufl., 1970, S. 462 (dort analoge Vorschrift für  $\beta$ -Bromäthylphthalimid).

<sup>7</sup> J. G. N. Drewitt u. M. B. Green, *Brit. Pat.* 597 253 (1948), s. C. A. **42**, 4604 h [1948].

<sup>8</sup> R. Kuttan, A. N. Radhakrishnan, T. Spande u. B. Witkop, *Biochemistry* **10**, 361 [1971].

<sup>9</sup> A. Zeman u. I. P. G. Wirotama, *Z. Anal. Chem.* **247**, 158 [1969].

<sup>10</sup> M. W. Johnson u. R. Markham, *Virology* **17**, 276 [1962].

<sup>11</sup> M. De Rosa, S. De Rosa, A. Gambacorta, M. Carteni-Farina u. V. Zappia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**, 253 [1976].

<sup>12</sup> S. M. Kupchan, A. P. Davies, S. J. Barboutis, H. K. Schnoes u. A. L. Burlingame, *J. Amer. Chem. Soc.* **89**, 5718 [1967].