

gegengewirkt werden [65]. Eigentlich gehören die Pheromone nicht zu unserem Thema, da sie nicht zu den Hormonen zu rechnen sind. Weil aber gerade die Pheromone der Insekten gut untersucht sind, sollen sie hier kurz erwähnt werden. Bezuglich der Einzelheiten muß auf die gleichzeitig erscheinende Zusammenfassung von Stamm [66] verwiesen werden.

Die bekanntesten Beispiele für Pheromone sind die Sexuallockstoffe der Schmetterlinge, die von den Weibchen in bestimmten Drüsen produziert werden und die Männchen anlocken, oft über weite Entfernung hinweg.

Der erste Lockstoff dieser Art und damit das erste Pheromon, das in chemisch reiner Form erhalten wurde, ist das von Butenandt und Mitarbeitern [67] isolierte Bombykol, der Sexuallockstoff des Seidenspinners. Über 500000 Duftdrüsen mußten verarbeitet werden, um nach langwierigen Reinigungsoperationen rund 10 mg eines Derivates des Lockstoffs in kristallisierter Form zu erhalten.

Eine eigens dazu ausgearbeitete Mikromethode der oxydativen Spaltung [68] führte zur Formel eines Hexa-

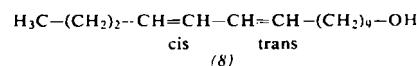
[65] A. Berthe, Naturwissenschaften 20, 177 (1932).

[66] D. Stamm, Dtsch. med. Wschr., im Druck.

[67] A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm u. E. Hecker, Z. Naturforsch. 14b, 283 (1959).

[68] A. Butenandt, D. Stamm u. E. Hecker, Chem. Ber. 94, 1931 (1961).

decadienols, die dann durch Synthese bewiesen wurde. Der Lockstoff, der den Namen Bombykol [69] erhielt, ist das 10-trans-12-cis-Hexadecadien-1-ol (8).



Bombykol gehört zu den am höchsten wirksamen Stoffen. Wird ein Glasstab mit einer Lösung von $10^{-12} \mu\text{g}/\text{ml}$ befeuchtet, so zeigt er noch Lockwirkung. Man kann ausrechnen, daß von der Antenne des Männchens noch wenige Moleküle wahrgenommen werden und die Reizwirkung auslösen können.

Außer den Sexuallockstoffen rechnen zu den Pheromonen die Königinsubstanz der Bienen, die kürzlich als Δ^2 -9-Oxo-decen-1-säure erkannt wurde [70], sowie die Spur-Markierungsstoffe der Ameisen, Termiten [71] und Bienen. Über die Chemie und Biologie dieser Stoffe haben wir an anderer Stelle [72,73] zusammenfassend berichtet (vgl. auch [66]).

Eingegangen am 14. Januar 1963 [A 280]

[69] A. Butenandt u. E. Hecker, Angew. Chem. 73, 349 (1961).

[70] C. G. Butler, R. K. Callow u. N. C. Johnston, Nature (London) 184, 1871 (1959); M. Barbier, E. Lederer, T. Reichstein u. O. Schindler, Helv. chim. Acta 43, 1682 (1960).

[71] M. Lüscher, Ann. N. Y. Acad. Sci. 89, 549 (1960).

[72] P. Karlson, Ergebn. Biol. 22, 212 (1960).

[73] P. Karlson u. A. Butenandt, Ann. Rev. Entomol. 4, 39 (1959).

Die Biosynthese von Alkaloiden I [*]

VON PROF. DR. K. MOTHES UND DOZENT DR. H. R. SCHÜTTE
DEUTSCHE AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN ZU BERLIN,
INSTITUT FÜR BIOCHEMIE DER PFLANZEN, HALLE/SAALE

Herrn Professor Dr. Adolf Butenandt aus Anlaß der 60. Wiederkehr seines Geburtstages gewidmet

1. Einleitung
2. Tropanalkaloide und ihre Verwandten
 - a) Hyoscyamin
 - b) Hygrin, Cuskygrin und Cocain
 - c) Stachydrin
 - d) Scopolamin
 - e) Tropasäure
 - f) Beteiligung des C₁-Stoffwechsels
 - g) Bildungsorte in der Pflanze
3. Pyridin- und Piperidinalkaloide
 - a) Der Pyrrolidinring des Nicotins
 - b) Der Piperidinring des Anabasins

- c) Der Pyridinring des Nicotins und Anabasins
- d) Die Methylgruppe des Nicotins
- e) Ricinin
- f) Isopelletierin, Methylisopelletierin, Pseudopelletierin
- g) Coniin
- h) Lobelin, Lobelanidin, Lobelanin
4. Pyrrolizidin- und Chinolizidinalkaloide
 - a) Pyrrolizidinalkaloide vom Laburnin-Typ
 - b) Retronecin- und Platynecinbasen
 - c) Necinsäuren
 - d) Lupinenalkaloide

weist der Organismen, in anderen aber fügt es sich in alte, längst vor der modernen Entwicklung der Biochemie begründete Ideen ein und bestätigt diese.

Im Bereich der Alkaloide war es vor allem Trier [1], der 1912 die Bildung der komplizierteren N-haltigen Basen

[*] Teil II dieser Übersicht erscheint demnächst in dieser Zeitschrift.

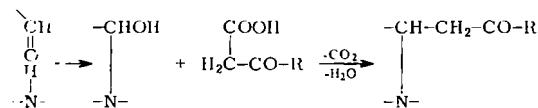
[1] G. Trier: Über einfache Pflanzenbasen und ihre Beziehungen zum Aufbau der Eiweißstoffe und Lecithine. Verlag Gebr. Bornträger, Berlin 1912, S. 117.

1. Einleitung

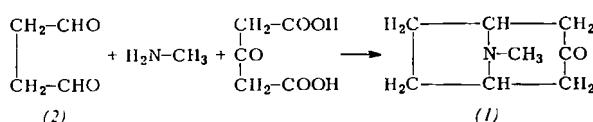
Die schnelle Entwicklung unserer Vorstellungen über die Mechanismen der Biosynthese sekundärer Pflanzenstoffe wird bald einen großen Teil der bestehenden, zweifellos oft geistreichen Hypothesen vergessen lassen, da das sich häufende experimentelle Material konkrete Entscheidungen gestattet. Dieses zwingt in verschiedenen Gebieten zu prinzipiell neuen Theorien über die Arbeits-

in den allgemeinen Stoffwechsel der Aminosäuren einzurichten versuchte und Beziehungen betonte, die nach seiner Meinung zwischen den echten (N-heterocyclischen) Alkaloiden, den einfachen Pflanzenbasen, den N-methylierten Verbindungen vom Typ der Betaine und des Cholins und den Aminosäuren bestehen. Die theoretischen Vorstellungen *Triels* waren nicht auf spezielle Fälle zugeschnitten, sie begründeten vielmehr eine Art „allgemeine Theorie“ der Alkaloidbildung und sahen in dieser nichts Außergewöhnliches, sondern nur Variationen von bereits bekannten Vorgängen des Grundstoffwechsels. Die *Trielsche Theorie* hatte damit einen hohen wissenschaftlichen Rang. Schon damals vollbrachte *Pictet* [2] chemische Reaktionen *in vitro*, die *Triels* Ideen stützten. Das tat aber später vor allem *Schöpf* [3] durch seine Synthesen mit zellmöglichen Stoffen unter zellmöglichen („physiologischen“) Bedingungen, d.h. bei Zimmertemperatur und in einem begrenzten pH-Bereich um den Neutralpunkt. Er erweiterte damit die Ideen *Robinsons*, dessen Veröffentlichungen von 1917 [4] Meilensteine in den Bemühungen der Chemiker, der Natur nahe zu kommen, darstellen. In Anlehnung an *Schöpf* darf man als die wichtigsten Reaktionen bei diesen *in-vitro*-Synthesen folgende ansehen [5]:

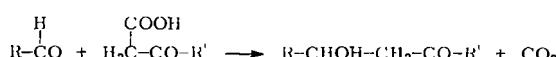
1. Aldehydammoniak-Bildung zwischen der Carbonyl-Doppelbindung eines Aldehyds oder einer $-\text{CH}=\text{N}$ -Doppelbindung und dem Wasserstoff primärer oder sekundärer Aminogruppen und Kondensation der entstandenen Carbinolamine mit aktiven Methylengruppen von Ketonen oder β -Ketosäuren:



Ein Beispiel hierfür ist die Synthese von Tropinon (1) aus Succindialdehyd (2), Methylamin und Acetondicarbonsäure bei pH-Werten zwischen 3 und 11, Zimmertemperatur und dreitägigem Stehen [6].



2. Aldolkondensation zwischen Aldehyden und β -Ketosäuren:



[2] A. Pictet, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 244, 389 trager, (1906).

[3] C. Schöpf, Angew. Chem. 50, 779, 797 (1937).

[4a] R. Robinson, J. chem. Soc. (London) 111, 762 (1917).

[4b] R. Robinson, J. chem. Soc. (London) 111, 876 (1917).

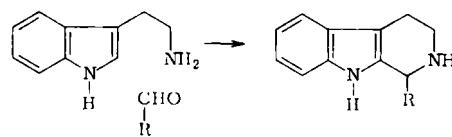
[4c] R. Robinson: The Structural Relations of Natural Products. Verlag Clarendon Press, Oxford 1955.

[5a] C. Schöpf, Angew. Chem. 61, 31 (1949).

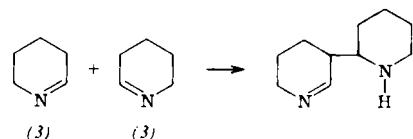
[5b] H. B. Schröter in W. Ruhland: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Verlag Springer, Berlin 1958, Bd. 8, S. 864.

[6] C. Schöpf u. G. Lehmann, Liebigs Ann. Chem. 518, 1 (1935).

3. Kondensation β -substituierten Äthylamins mit Aldehyden, die für die Bildung N-heterocyclischer Ringsysteme von besonderer Bedeutung ist, z.B.:



4. „Aldolkondensation“ zwischen der $-\text{CH}=\text{N}$ -Doppelbindung und der reaktionsfähigen Methylengruppe des Δ^1 -Piperideins (3):



Diese zellnahen *in-vitro*-Synthesen befürworteten die organische Chemie und gaben starke Anregungen für die Biochemie. Zunächst blieb es aber unklar, ob sie in jedem Fall den biosynthetischen Weg in der Pflanze repräsentieren [3]. Ein Einwand besteht u.a. in der unter natürlich vorkommenden Alkaloiden meist auftretenden optischen Aktivität, die bei den spontanen Synthesen natürlich fehlt. Man darf annehmen, daß spontane Reaktionen – wenn sie überhaupt biosynthetische Bedeutung haben – mit Enzymreaktionen gekoppelt sind [3].

Wie gering der Umfang unserer konkreten Kenntnisse noch vor wenigen Jahren war, geht wohl am treffendsten aus einer Bemerkung *Juckers* 1955 hervor, wonach wir noch weit entfernt davon seien zu wissen, wie die pflanzliche Zelle die Alkaloide tatsächlich aufbaut [7].

Neue experimentelle und analytische Möglichkeiten brachten aber einen schnellen Fortschritt. Zunächst öffnete im Bereich der Verbindungen des Grundstoffwechsels die Benutzung künstlicher Mutanten (bei dem Pilz *Neurospora*, der Bakterie *Escherichia coli* usw.) den Weg zur Klärung ganzer Reaktionsketten beim Aufbau und Umbau der wichtigsten Aminosäuren. Es wurde gezeigt, wie die von *Trier* so stark betonten basischen Aminosäuren (z.B. Ornithin, Lysin) in engstem Zusammenhang stehen mit heterocyclischen Aminosäuren (Prolin, Pipcolinsäure). Damit waren wichtige Erkenntnisse für die Entstehung echter Alkaloide gewonnen. Auch wurde durch die Prägung des Begriffes „Aminosäurenfamilie“ deutlich gemacht, wie verschiedene Naturstoffe durch z.T. reversible Reaktionen zusammengehören (z.B. besteht die Glutaminsäurefamilie aus Glutaminsäure, α -Ketoglutaräure, Ornithin, Putrescin, Prolin und γ -Aminobuttersäure), so daß sich die Möglichkeit eröffnete, von verschiedenen, aber miteinander verwandten Stoffen ausgehend auf nicht völlig gleichen Wegen zum gleichen Heterocyclus zu gelangen. So wurde es z.B. zu einem wichtigen Problem, ob in allen Fällen sämtliche hier genannten Glutaminsäure-Verwandten Vorstufe des Pyrrolidin-Systems (im Nicotin, im Tropin usw.) sein können.

Mit dieser Einführung der genetischen Methode in die Biochemie fällt zeitlich die Verwendung isotop markierter Verbindungen als Vorstufen zusammen, die höheren Pflanzen auf verschiedene Weise appliziert wurden (über

[7] E. Jucker, Chimia 9, 195 (1955).

die Wurzel, Aufsaugen durch Stengelwunden, Besprühen der Blätter usw.). Diese Isotopenmethode hat auch die Beziehungen jener Alkaloide zueinander klären lassen, die in demselben pflanzlichen Individuum (als Haupt- und Nebenalkaloide) gleichzeitig vorkommen.

Von großer Bedeutung für die Untersuchung der Bildungswege ist auch die Frage nach dem Ort und der Zeit der Biosynthese, denn es ist bekannt, daß die Alkalioide, wie viele andere Naturstoffe, nur in ganz bestimmten Organen [8] und in ganz bestimmten Phasen der Entwicklung entstehen. So sind beispielsweise im Wachstum gehemmte Reiser von *Nicotiana glauca* in der Lage, aus Putrescin (24) die Verbindungen Nicotin (31), Nor-nicotin (32) und Anabasin (33) zu bilden, während lebhaft wachsende *N.glauc*a-Sprosse das offenbar nicht können [8d]. Es ist möglich, daß die gefütterten Vorstufen aus Gründen der Permeabilität nicht immer an den Ort der Synthese gelangen. Daher sind negativ ausgehende Resultate mit großer Vorsicht zu behandeln.

Mit Hilfe dieser neuen experimentellen Möglichkeiten konnten in kurzer Frist in vielen Fällen biochemische Beziehungen zwischen bestimmten „Vorstufen“ und Alkaloiden sichergestellt werden [9]. Doch darf nicht übersehen werden, daß eine solche Feststellung noch nichts Endgültiges darüber sagt, ob die gefütterte Vorstufe auch wirklich die natürliche oder nur eine mögliche ist. Aber meist wird die künstlich gewählte der natürlichen Vorstufe zumindest nahe verwandt sein.

Im allgemeinen sind zur Zeit nur die formalen Beziehungen aufgehellt. Die Aufklärung der eigentlichen Reaktionsmechanismen dürfte den schwierigeren Teil der Aufgabe darstellen. Fraktionierte Homogenate und Enzympräparate müssen hier weiterhelfen. Die folgenden Beispiele werden nicht allein den ungemein schnellen Fortschritt unserer Erkenntnis belegen, sondern auch zeigen, daß als bisher bekannt gewordene mögliche Vorstufen nur wenige Stoffe oder deren Vorläufer in Frage kommen (in der Hauptsache Ornithin, Lysin, Phenylalanin, Tryptophan, Nicotinsäure, Anthranilsäure, Acetat, Mevalonsäure).

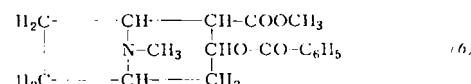
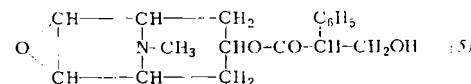
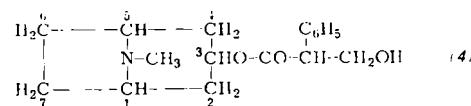
2. Tropanalkaloide [10] und ihre Verwandten

Die wichtigsten Alkaloide dieser Gruppe sind das Hyoscyamin (4), das Scopolamin (5) und das Cocain (6).

Robinsons Tropinonsynthese [4a] aus Succindialdehyd, Methyldiamin und Acetondicarbonsäure war der Ausgangspunkt für seine allgemeine Theorie zur Entstehung der Alkalioide aus Stoffwechselprodukten der Aminosäuren [4b,4c]. 1935 hat *Schöpf* das Tropinon unter zellmöglichen Bedingungen synthetisiert [6], wie oben ausgeführt worden ist.

- [8a] K. Mothes, *Angew. Chem.* **64**, 254 (1952).
 - [8b] K. Mothes u. A. Romeike in W. Ruhland: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Verlag Springer, Berlin 1958, Bd. 8, S. 989.
 - [8c] K. Mothes, *J. Pharmacy Pharmacol.* **11**, 193 (1959).
 - [8d] K. Mothes u. H. B. Schröter, *Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.* **294**, 99 (1961).
 - [9a] K. Mothes, *Pharmazie* **14**, 121, 177 (1959).
 - [9b] A. R. Battersby, *Quart. Rev. (chem. Soc., London)* **15**, 259 (1961).
 - [10] A. Romeike, *Pharmazie* **15**, 655 (1960).

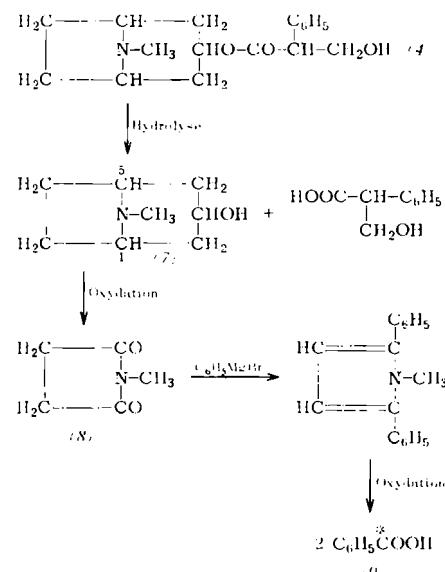
Die ersten Untersuchungen über den Bildungsweg der Tropanalkaloide an lebenden Pflanzen wurden von James [11] und Cromwell [12] durchgeführt. Sie beobachteten nach Fütterung von Arginin und Ornithin an



isolierte Atropablättter oder nach Injektion von Arginin und Putrescin in Atropa- und Daturapflanzen eine Zunahme des Alkaloidgehaltes.

a) **Hyoscyamin**

Mit radioaktiv markierten Verbindungen konnte der Einbau von Putrescin nicht bestätigt werden [13]. Andererseits ließ sich mit Ornithin-(2-¹⁴C) an *Datura stramonium*-Pflanzen zeigen, daß diese Aminosäure als biosynthetische Vorstufe des Hyoscyamins zu bewerten ist [14]. Das würde bedeuten, daß der Einbau von Ornithin nicht über das entsprechende Diamin Putrescin verläuft. Beim Abbau des isolierten Hyoscyamins (*4*) fanden die Autoren die gesamte Aktivität im Tropinteil (*7*) lokalisiert, und dort waren wiederum ausschließlich die



Schema 1. Abbau des Hyoscyamins (4).

- [11] W. O. James, *Nature* (London) **158**, 654 (1946); *New Phytologist* **48**, 172 (1949).
 - [12] B. T. Cromwell, *Biochem. J.* **37**, 722 (1944).
 - [13] D. G. M. Diaper, S. Kirkwood u. L. Marion, *Canad. J. Chem.* **29**, 964 (1951).
 - [14] E. Leete, L. Marion u. I. D. Spenser, *Canad. J. Chem.* **32**, 1116 (1954); *Nature* (London) **174**, 650 (1954).

Brückenatome C-1 und C-5 des Pyrrolidinteiles radioaktiv. Die C-Atome 1 und 5 des Tropinskeletts sind bei dem gewählten Abbau (Schema 1) gleichwertig, so daß nicht entschieden werden konnte, ob das Ornithin spezifisch eingebaut wird und damit nur eines der beiden C-Atome radioaktiv ist, oder ob eine symmetrische Zwischenstufe, wie z. B. Putrescin, durchlaufen wird, wobei sich die Radioaktivität auf beide C-Atome (1 und 5) verteilen würde.

Eine Entscheidung zugunsten des stereospezifischen, unsymmetrischen Einbaus von Ornithin ist erst seit kurzem nach Versuchen von Dawson et al. [15] und Leete [16] möglich geworden. Leete z. B. hat das nach Verfütterung von Ornithin-(2-¹⁴C) an 3 Monate alte *Datura stramonium*-Pflanzen erhaltene Hyoscyamin (4), das zur übersichtlicheren Diskussion an C-1 radioaktiv sein soll (Stern im Schema 2), einer Pyrolyse unterworfen, wobei zwei isomere Tropidine, (10a) und (10b), entstanden, die ohne Trennung in ihre Methojodide, (11a) und (11b), umgewandelt wurden. Hofmann-Eliminierung ergab die enantiomorphen α -Methyltropidine, (12a) und (12b), die mit Dibenzoyl-D-weinsäure getrennt wurden. Nach bekannten Reaktionen [17] geht (12a) bei 160 °C in β -Methyltropidin (13) über, das mit verdünnter Schwefelsäure zu 2-Cycloheptenon (14) hydrolysiert, dessen dem ursprünglichen C-Atom 1 entsprechende Carbonylgruppe nach Hydrierung (15), Umsatz mit Phenyllithium (16) und Oxydation als Benzoësäure (9) abgespalten wird. Diese Benzoësäure besaß dieselbe spezifische Radioaktivität wie das zum Abbau verwendete Hyoscyamin. Das bedeutet, daß nur eines der beiden C-Atome 1 und 5 des Hyoscyamins radioaktiv war und daß Ornithin stereospezifisch eingebaut wird [*].

Die Herkunft der C-Atome 2, 3 und 4 im Hyoscyamin (4) blieb zunächst noch offen. Radioaktiv markierte Citronensäure wurde von *Datura stramonium* nur schwach in Hyoscyamin eingebaut [18].

Kaczkowski, Schütte und Mothes [19] fütterten in der Methyl- oder in der Carboxylgruppe ¹⁴C-markiertes Acetat an Kulturen isolierter Wurzeln von *Datura metel*, und fanden, daß es zu 70 bis 80 % in den Tropinteile eingebaut wird. Nach oxydativem Abbau zu N-Methylsuccimid (8) enthielt diese dem Pyrrolidinteil entsprechende Verbindung nur 15 bis 20 % der Aktivität, so daß die restlichen 80 bis 85 % auf die C-Atome 2, 3 und 4 entfallen. Aus weiteren Abbauversuchen [20], bei denen das

[15] A. A. Bothner-By, R. S. Schutz, R. F. Dawson u. M. L. Solt, J. Amer. chem. Soc. 84, 52 (1962).

[16] E. Leete, J. Amer. chem. Soc. 84, 55 (1962).

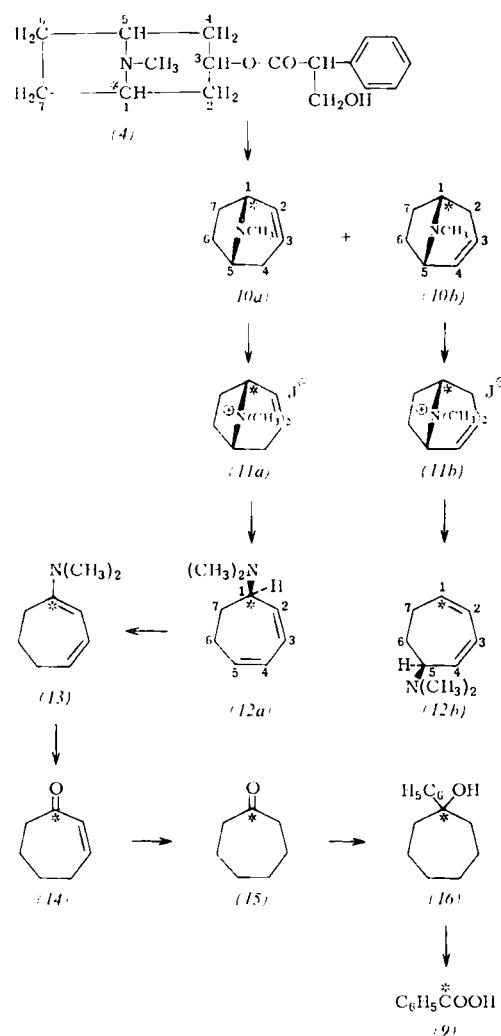
[17] G. Merling, Ber. dtsch. chem. Ges. 24, 3108 (1891).

[*] Anmerkung bei der Korrektur: Neuere Untersuchungen mit Putrescin-(1.4-¹⁴C) zeigen, daß auch diese Base als Vorstufe für Hyoscyamin und Scopolamin in isolierten Wurzelkulturen von *Datura metel* verwendet werden kann. Durch Abbau konnte bei Hyoscyamin gezeigt werden, daß die Radioaktivität des Pyrrolidinteiles ausschließlich in den zum Stickstoff benachbarten C-Atomen lokalisiert ist. (H. W. Liebisch, H. R. Schütte u. K. Mothes, unveröffentlicht).

[18] A. V. Robertson u. L. Marion, Canad. J. Chem. 38, 294 (1960).

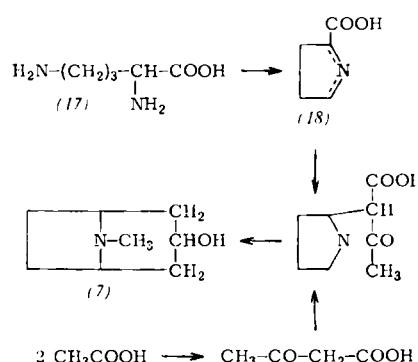
[19] J. Kaczkowski, H. R. Schütte u. K. Mothes, Naturwissenschaften 47, 304 (1960).

[20] J. Kaczkowski, H. R. Schütte u. K. Mothes, Biochim. biophysica Acta 46, 588 (1961).



Schema 2. Abbau des Hyoscyamins (4) über Tropidine.

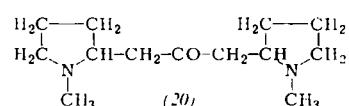
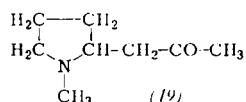
C-Atom 3 als Carboxylgruppe der Benzoësäure herausgeschält wurde, ergab sich, daß nach Verfütterung von Acetat-(1-¹⁴C) das C-Atom 3 nahezu die gesamte Radioaktivität enthielt, während nach Verfütterung von Acetat-(2-¹⁴C) dieses C-Atom praktisch inaktiv war. Diese Ergebnisse sprechen für einen spezifischen Einbau des Acetats in die C-Atome 2, 3 und 4. Möglicherweise verläuft die Synthese des Tropins über die Anlagerung von



Acetoacetat an ein sich vom Ornithin (17) ableitendes Pyrrolidin-Derivat (18), anschließenden oxydativen Ringschluß, Reduktion und Methylierung (7).

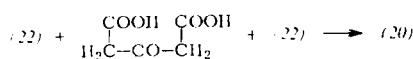
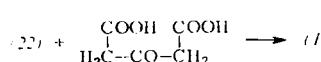
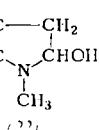
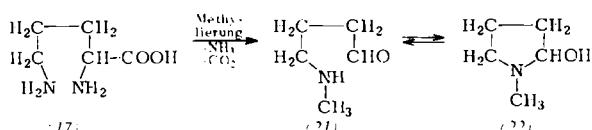
b) Hygrin, Cuskhygrin und Cocain

Dieses Biosyntheseschema würde auch die Bildung verwandter Alkalioide, wie Hygrin (19), Cuskhygrin (20) und Cocain (6), erklären. Während beim Hygrin und

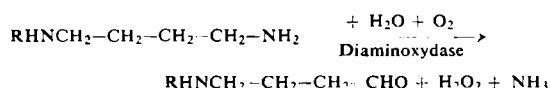


Cuskhygrin der Ringschluß zum Tropanskelett nicht auftritt, unterbleibt beim Ekgonin, dem Basenteil des Cocains (6), die Decarboxylierung.

Über die Biosynthese von Hygrin (19) und Cuskhygrin (20) liegen bisher noch keine Versuche mit markierten Vorstufen vor. Mehrere Autoren [21] haben aber diese Alkalioide nach der Theorie von Robinson [4] unter zellmöglichen Bedingungen aus γ -Methylamino-butyraldehyd (21), der sich physiologisch vom Ornithin (17) ableiten läßt, oder aus dem isomeren Carbinolamin (22) durch Umsetzung mit Acetessigsäure und Acetondicarbonsäure in guter Ausbeute darstellen können.



Hygrin [22] (19), Cuskhygrin [22] (20) und Norhygrin [23] sind auch halbenzymatisch synthetisiert worden. In Gegenwart von Diaminoxidase, die Diamine unter oxydativer Desaminierung in die entsprechenden Aminoaldehyde umwandelt, entsteht in einer auf pH = 7,6 gebufferten Mischung von N-Methylputrescin (23) und Acetessigsäure das Alkaloid Hygrin (19). Wird die Acetessigsäure durch Acetondicarbonsäure ersetzt, so bilden sich Hygrin (19) und Cuskhygrin (20). Aus Putrescin (24) entsteht unter den genannten Bedingungen mit Acetessigsäure Norhygrin. Bei diesen Reaktionen wird enzymatisch der γ -Methylamino-butyraldehyd (21) bzw.



(23), R = CH₃

(24), R = H

[21] E. Anet, G. K. Hughes u. E. Ritchie, Nature (London) 163, 289 (1949); 164, 501 (1949); F. Galinovsky, A. Wagner u. R. Weisser, Mh. Chem. 82, 551 (1951).

[22] H. Tuppy u. M. S. Faltaous, Mh. Chem. 91, 167 (1960).

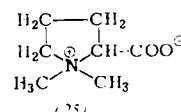
[23] A. T. Clarke u. P. J. G. Mann, Biochem. J. 71, 596 (1959).

der γ -Aminobutyraldehyd gebildet, der sich spontan cyclisiert (22) und sich mit den β -Ketoverbindungen nach dem Schema (22) \rightarrow (19) bzw. (22) \rightarrow (20) umsetzt. Wenn auch die Grundzüge dieser Reaktionen bei der Biosynthese verwirklicht sein werden, so bleibt doch offen, ob die Methylierung vor dem Ringschluß oder nach dem Aufbau des heterocyclischen Systems vor sich geht.

Auch über die Biosynthese des Ekgonins, des Basenteiles des Cocains (6), sind bisher keine Versuche mit markierten Verbindungen bekannt. Das entsprechende Keton ist aber analog dem Tropinon unter physiologischen Bedingungen aus Acetondicarbonsäure-monomethylester mit Methylamin und Succindialdehyd bei pH = 5 erhalten worden [6]. Aus der Tatsache, daß bei der Tropinonsynthese aus Acetondicarbonsäure, Succindialdehyd und Methylamin unter spontaner Decarboxylierung direkt Tropinon entsteht, folgt Schöpf [6], daß die Veresterung mit Methanol beim Ekgonin schon vor der Bildung des Tropanskeletts vor sich geht und offenbar die Carboxylgruppe vor der Abspaltung schützt.

c) Stachydrin

Stachydrin (25) ist das Betain des Prolin und sollte wie die anderen Pyrrolidinalkaloide aus Ornithin entstehen. Aber weder Ornithin-(2-¹⁴C) [24] noch Prolin-(¹⁴C) [25],



noch Glutaminsäure-(2-¹⁴C) [26] konnten von 2 bis 3 Wochen alten Luzernepflanzen in Stachydrin eingebaut werden, obwohl Methionin-(¹⁴CH₃) [25] und Hygrinsäure-(¹⁴COOH) [27] radioaktives Stachydrin ergaben. Die Autoren nahmen an, daß aus Permeabilitätsgründen nur einige Aminosäuren (z.B. Methionin) an den Ort der Stachydrinsynthese gelangen können, während anderen, z.B. Ornithin und Prolin, dies nicht möglich ist. Spätere Versuche [28] mit ¹⁴CO₂ zeigten aber, daß *Medicago sativa*-Pflanzen im Alter von 2 bis 3 Wochen gar kein Stachydrin bilden. Erst im Alter von 5½ bis 6 Monaten, kurz vor der Blüte, konnte eine starke Alkaloidsynthese beobachtet werden; in diesem Stadium werden Prolin-(¹⁴COOH) und Ornithin-(2-¹⁴C) spezifisch in das Alkaloid eingebaut, so daß die Biosynthese von Stachydrin aus Ornithin über Prolin und Hygrinsäure bestätigt ist. Die anfänglichen Mißerfolge zeigen deutlich, wie wichtig es ist, physiologische Experimente vor den eigentlichen Untersuchungen über die Biosynthese anzustellen.

d) Scopolamin

Die Fütterungsversuche von Leete et al. [14] mit Ornithin-(2-¹⁴C) an vier Monate alten *Datura stramonium*-Pflanzen ergaben zwar radioaktiv markiertes Hyoscynam (4), das isolierte Scopolamin (5) war dagegen nicht

[24] E. Leete, L. Marion u. I. D. Spenser, J. biol. Chemistry 214, 71 (1955); A. Morgan u. L. Marion, Canad. J. Chem. 34, 1704 (1956).

[25] A. V. Robertson u. L. Marion, Canad. J. Chem. 37, 1197 (1959).

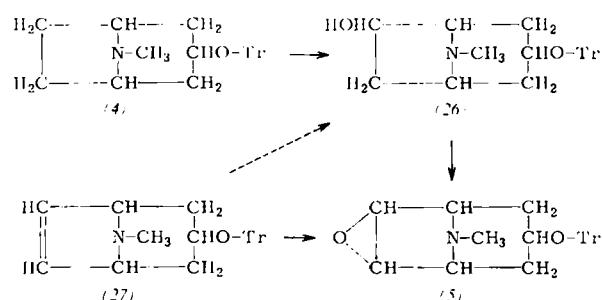
[26] G. Wiehler u. L. Marion, J. biol. Chemistry 231, 799 (1958).

[27] A. V. Robertson u. L. Marion, Canad. J. Chem. 38, 396 (1960).

[28] J. M. Essery, D. J. McCaldin u. L. Marion, Phytochemistry 1, 209 (1962).

radioaktiv. Die Annahme zweier verschiedener Synthesewege für beide Alkaloide [29] stand im Widerspruch zu anderen Arbeiten. Befunde, wonach in verschiedenen Scopolaminpflanzen der Anteil des Scopolamins am Gesamtalkaloidgehalt im Jugendstadium am größten ist [30], ließen vermuten, daß die von Leete benutzten *Datura stramonium*-Pflanzen zu alt waren und gar kein Scopolamin mehr zu bilden vermochten, was auch bewiesen werden konnte [31]. Dies ist ein schönes Beispiel dafür, daß negative Resultate vorsichtig interpretiert werden müssen.

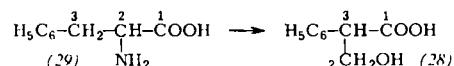
Später konnte nicht nur gezeigt werden, daß Scopolamin (5) und Hyoscyamin (4) auf dem gleichen Weg entstehen, sondern auch daß das erstere aus dem letzteren entsteht [32], und zwar unter der Mitwirkung eines sehr substratspezifischen Enzymsystems [33]. Das als Nebenalkaloid vorkommende 6-Hydroxyhyoscyamin (26) ist dabei Zwischenstufe [34].



6-Dehydrohyoscyamin (27) wird von *Datura ferox* auch in Scopolamin umgewandelt [33], vermutlich wird dabei die Stufe des 6-Hydroxyhyoscyamins (26) durchschritten.

e) Tropasäure

Für die Tropasäure (28) ist Phenylalanin (29) als Vorstufe sichergestellt.



Die C-Atome des Phenylalanins und der Tropasäure sind in den Formeln so numeriert wie sie einander biosynthetisch entsprechen. Phenylalanin-(3-¹⁴C) ergibt also eine Tropasäure, bei der die Radioaktivität am C-Atom 3 lokalisiert ist [35-37], was durch Oxydation zu

- [29] *P. Reinouts van Haga*, *Biochim. biophysica Acta* **19**, 562 (1956).

[30] *W. C. Evans u. M. W. Partridge*, *J. Pharmacy Pharmacol.* **5**, 772 (1953); *R. Hegnauer*, *Pharmac. Weekbl.* **86**, 321, 805 (1951); *A. Romeike*, *Pharmazie* **8**, 668, 729 (1953); *E. M. Trautner*, *Austral. chem. Inst. J. Proc.* **14**, 411 (1947).

[31] *L. Marion u. A. F. Thomas*, *Canad. J. Chem.* **33**, 1853 (1955); *E. Leete*, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 612 (1960).

[32] *K. Mothes u. A. Romeike*, *Naturwissenschaften* **42**, 631 (1955); *A. Romeike*, *Flora* **143**, 67 (1956); *A. Romeike u. G. Fodor*, *Tetrahedron Letters* **1960**, No. 22, S. 1.

[33] *G. Fodor, A. Romeike, G. Janzso u. I. Koczor*, *Tetrahedron Letters* **1959**, No. 7, S. 19.

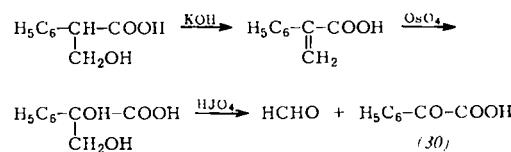
[34] *A. Romeike*, *Naturwissenschaften* **47**, 64 (1960); **49**, 281 (1962); *G. Fodor*, *Chem. and Ind.* **1961**, 1500.

[35] *E. Leete*, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 612 (1960).

[36] *E. W. Underhill u. H. W. Youngken*, *J. Pharmac. Sci.* **51**, 121 (1962).

[37] *D. Gross u. H. R. Schütte*, *Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.* **296**, 1 (1963).

Benzoesäure ermittelt wurde. Nach der Verfütterung von Phenylalanin-(2-¹⁴C) befand sich die Radioaktivität in der Hydroxymethylgruppe (C-Atom 2)[38]. Dieses C-Atom konnte als Formaldehyd herausgeschält werden:



Nach Applikation von Phenylalanin-(1-¹⁴C) konnte durch denselben Abbau und durch Decarboxylierung der Phenylglyoxylsäure (30) gezeigt werden [39], daß die Carboxylgruppe der Tropasäure aus der entsprechenden Gruppe des Phenylalanins entsteht. Die Tatsache, daß bei Verfütterung von Phenylessigsäure-(1-¹⁴C), das einem Phenylalanin-(2-¹⁴C) entspricht, die Radioaktivität der Tropasäure nicht in der Carboxylgruppe auftritt [36], bestätigt diese Ergebnisse. Aus diesen Versuchen muß eine neuartige intramolekulare Umlagerung der Phenylalanin-Seitenkette zur Biosynthese der Tropasäure angenommen werden. Ein Einbau der Radioaktivität von Tryptophan-(3-¹⁴C) in die Carboxylgruppe der Tropasäure [40] erscheint schwer verständlich.

Das Ekgonin ist im Cocain (6) mit Benzoesäure verestert. Versuche mit Phenylalanin-(3-¹⁴C) zeigten bei *Erythroxylon novogranatense* einen Einbau in das Cocain, wobei die Radioaktivität praktisch ausschließlich in der Benzoesäure lokalisiert war [37]. Danach muß Phenylalanin auch als Vorstufe der Benzoesäure angesehen werden.

f) Beteiligung des C₁-Stoffwechsels

Radioaktiv markierte Verbindungen, die am C₁-Stoffwechsel teilnehmen, wie Methionin-(¹⁴CH₃), Natriumformiat-(¹⁴C) [35, 36] und Formaldehyd-(¹⁴C) [35], tragen ausschließlich zur Radioaktivität der Tropanhälfte des Hyoscyamins und Scopolamins bei. Nach Verfütterung von Methionin-(¹⁴CH₃) war nahezu die gesamte Radioaktivität in der N-Methylgruppe lokalisiert [31, 35], so daß mit einer Transmethylierung gerechnet werden kann. Methylamin-(¹⁴C) wird von *Atropa belladonna* nicht in die Tropanalkaloide eingebaut [41].

g) Bildungsorte in der Pflanze

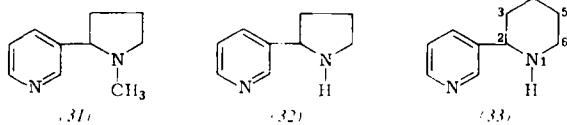
In den meisten der untersuchten Solanaceen sind die Tropantalkaloide ähnlich wie das Nicotin in erster Linie Produkte der Wurzeltätigkeit, obwohl geringe Mengen auch in jungen Sproßteilen und in sich entwickelnden Früchten gebildet werden können [42]. Auch die Veresterung zwischen Tropanteil und Tropasäure vollzieht sich vorwiegend in den

- [38] E. Leete u. M. L. Louden, Chem. and Ind. 1961, 1405.
 [39] M. L. Louden u. E. Leete, J. Amer. chem. Soc. 84, 1510 (1962);
 J. Amer. chem. Soc. 84, 4507 (1962).
 [40] A. M. Goodeve u. E. Ramstad, Experientia 17, 124 (1961).
 [41] J. R. Catch u. E. A. Evans, Nature (London) 188, 758 (1960).
 [42] K. Mothes u. A. Romeike in W. Ruhland: Handbuch der
 Pflanzenphysiologie. Springer, Berlin 1958, Bd. 8, S. 1008;
 A. Romeike, Pharmazie 8, 668, 729 (1953); Sh. Shibata, Plantae
 med. 4, 74 (1956).

Wurzeln [43], was durch den Nachweis einer Atropinesterase im Wurzelpreßsaft von *Datura stramonium* gezeigt werden konnte. Dieses Enzym katalysiert sowohl die Hydrolyse des Hyoscyamins als auch seine Synthese aus Tropin und Tropasäure. Scopin, der Basenteil des Scopolamins, und Tropasäure werden bei *Datura ferox* ebenfalls in der Wurzel verestert, während die oberirdischen Organe nicht dazu fähig sind [44]. Bei der Epoxydierungsreaktion Hyoscyamin → Scopolamin liegen die Verhältnisse umgekehrt; diese Umwandlung verläuft vorwiegend in den oberirdischen Organen [31], während die Wurzel nicht oder nur bei bestimmten Arten zur Bildung von Scopolamin aus Hyoscyamin befähigt ist [44, 45].

3. Pyridin- und Piperidinalkaloide

Das am meisten untersuchte Alkaloid dieser Gruppe ist das Nicotin (31). Es kommt nicht nur in Tabakarten vor, sondern auch in anderen Pflanzenfamilien [46]. Diese weite Verbreitung deutet darauf hin, daß es auf relativ



einfachem Wege aus ubiquitär vorhandenen Bausteinen synthetisiert werden kann. Mit dem Nicotin verwandt sind die Nebenalkaloide Noronicotin (32) und Anabasin (33).

Über die Biosynthese des Nicotins und Anabasins sind mehrere Hypothesen aufgestellt worden, von denen die bemerkenswertesten Nicotinsäure oder Lysin als Vorstufen des Pyridinringes und Ornithin als Vorstufe des Pyrrolidinringes im Nicotin postulieren [4c]. Lysin soll Vorstufe für den Piperidinring des Anabasins sein [4c].

a) Der Pyrrolidinring des Nicotins

Nach Verfütterung von Ornithin-(2-¹⁴C) (17) an *Nicotiana rustica* [47] oder *N. tabacum* [48] wurde radioaktives Nicotin (31) erhalten. Der Abbau des markierten Alkaloides zu Nicotinsäure (34) und weiter zu CO₂ (entsprechend der Carboxylgruppe der Nicotinsäure) zeigte, daß die Hälfte der Radioaktivität im C-Atom 2 des Pyrrolidinringes lokalisiert war, was auf eine Aktivitätsverteilung entsprechend den Sternen an der Formel (31) schließen läßt. Einen Beweis brachte die Untersuchung

[43] A. Jindra, S. Zadrazil u. S. Černá, Collect. czechoslov. chem. Commun. 24, 2761 (1959); J. Andrzejczuk u. J. Kaczkowski, Acta Soc. botan. polon. 31, 461 (1962); A. Jindra, S. Leblova, Z. Šipal u. A. Čihák, Planta med. 8, 44 (1960).

[44] A. Romeike, Flora 148, 306 (1959).

[45] A. Romeike, Naturwissenschaften 46, 492 (1959); Planta medica 8, 491 (1960).

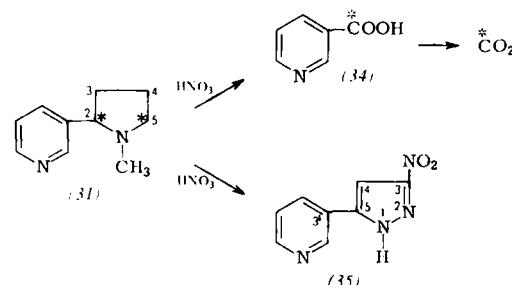
[46] K. Mothes, J. Pharmacy Pharmacol. 11, 193 (1959).

[47a] L. J. Dewey, R. U. Byerrum u. C. D. Ball, Biochim. biophysica Acta 18, 141 (1955).

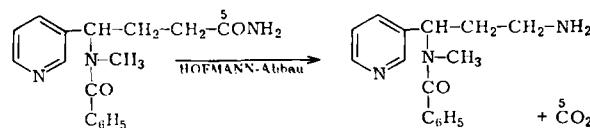
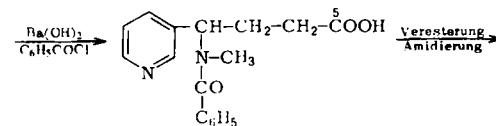
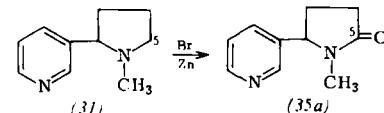
[47b] B. L. Lamberts, L. J. Dewey u. R. U. Byerrum, Biochim. biophysica Acta 33, 22 (1959).

[48] E. Leete, Chem. and Ind. 1955, 537.

eines Nebenproduktes der Salpetersäure-Oxydation von Nicotin, des 3-Nitro-5-(3'-pyridyl)-pyrazols [49] (35). In dieser Verbindung sind alle C-Atome des ursprünglichen Nicotins vorhanden außer C-5 und dem C-Atom der N-Methylgruppe. Dieses Pyrazol-Derivat enthielt die Hälfte der spezifischen Radioaktivität des Nicotins [50]. Da



die N-Methylgruppe des Alkaloides inaktiv war, muß die restliche Radioaktivität im C-Atom 5 des Pyrrolidinringes enthalten gewesen sein. Das C-Atom 5 konnte durch einen Abbau über das Cotinin (35a) [47b] auch einzeln als CO₂ isoliert werden.



Aus der Verteilung der Radioaktivität auf die C-Atome 2 und 5 des Pyrrolidinringes nach Verfütterung von Ornithin-(2-¹⁴C) muß auf ein symmetrisches Zwischenprodukt bei der Synthese dieses Teiles des Nicotins geschlossen werden.

Auch Putrescin-(1-¹⁴C) [51] (24), Prolin-(uniform-¹⁴C) [51] und Glutaminsäure-(2-¹⁴C) [51, 52] (36) dienen als Vorstufen für den Pyrrolidinring des Nicotins, wenn auch mit geringerer Einbaurate als Ornithin. Diese geringere Einbaurate kann in der Permeabilität oder in der großen Konzentration [53] an freier Glutaminsäure im Tabak begründet sein. Für alle diese Verbindungen konnte ein spezifischer Einbau in den Pyrrolidinring nachgewiesen werden; die Radioaktivität des Putrescins-(1-¹⁴C) und der Glutaminsäure-(2-¹⁴C) war gleichmäßig auf die C-Atome 2 und 5 des Pyrrolidinringes verteilt.

[49] G. R. Clemo u. T. Holmes, J. chem. Soc. (London) 1934, 1739.
[50] E. Leete u. K. Siegfried, J. Amer. chem. Soc. 79, 4529 (1957).

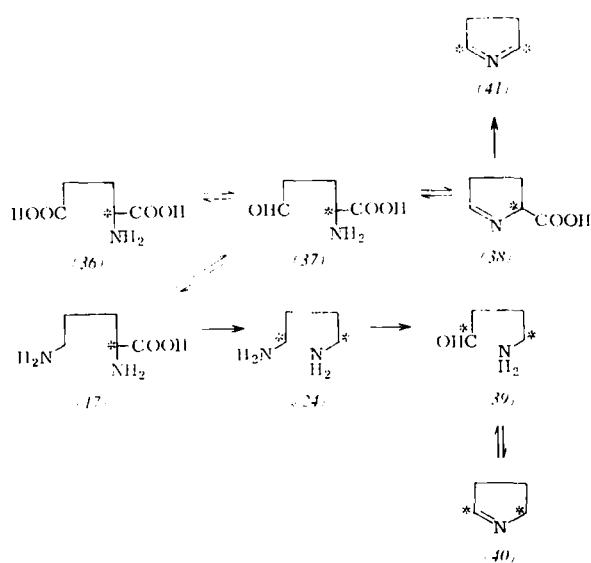
[51] E. Leete, J. Amer. chem. Soc. 80, 2162 (1958).

[51a] K. Hasse u. P. Homann, Biochem. Z. 335, 474 (1962); K. Hasse u. K. Schührer, ibid. 336, 20 (1962).

[52] B. L. Lamberts u. R. U. Byerrum, J. biol. Chemistry 233, 939 (1958).

[53] B. Commoner u. N. Varda, J. gen. Physiol. 36, 791 (1953); E. A. H. Roberts u. D. N. Wood, Arch. Biochem. Biophysics 33, 299 (1951).

Glutaminsäure, Prolin und Ornithin stehen in tierischen Systemen und in Mikroorganismen über den Glutaminsäure- γ -semialdehyd (37) und die Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure (38) in engem Zusammenhang [54]. Andererseits kann Putrescin (24) durch eine weitverbreitete Diaminoxydase zu γ -Aminobutyraldehyd (39) oxydiert werden, ders spontan zum Δ^1 -Pyrrolin (40) cyclisiert [55]. Nach diesen Ergebnissen diskutiert Leete eine Synthese des Δ^1 -Pyrrolins, bei der als symmetrische Zwischenprodukte Putrescin oder ein mesomeres Anion (41) auftreten sollten [51] (vgl. auch [51a]). Das Δ^1 -Pyrrolin sollte dann unmittelbare Vorstufe des Pyrrolidinteiles im Nicotin sein. Tatsächlich wird Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure-(5- ^{14}C) (38) von *Nicotiana rustica* spezifisch in den Pyrrolidinring des Nicotins eingebaut [56]. Den größten Teil der Aktivität haben die C-Atome 2 und 5. Die Verteilung der Radioaktivität im Pyrrolidinring des Nicotins in *Nicotiana rustica* nach Fütterung von Acetat-(1- ^{14}C), Acetat-(2- ^{14}C), Propionat-(2- ^{14}C), Propionat-(3- ^{14}C), Glycerin-(1,3- ^{14}C), Glycerin-(2- ^{14}C) und Asparaginsäure-(3- ^{14}C) läßt sich zwanglos mit der Annahme erklären, daß all diese Substanzen in den Citronensäurecyclus einmünden und über Glutamat in das Nicotin eingebaut werden [57].



b) Der Piperidinring des Anabasins

Dem Pyrrolidinring im Nicotin entspricht im Anabasin (33) ein Piperidinring. Nach der Theorie [4c] (siehe oben) sollen der Pyridinring und der Piperidinring des Anabasins aus Lysin entstehen. Tatsächlich werden Lysin-(2- ^{14}C) [58] und Cadaverin-(1,5- ^{14}C) [59] (42) von *N. glauca* in Anabasin eingebaut, aber nur in

[54] M. R. Stetten in W. D. McElroy u. H. B. Glass: Amino Acid Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 277; H. J. Vogel, ibid. S. 335.

[55] P. J. G. Mann u. W. R. Smithies, Biochem. J. 61, 89 (1955); K. Hasse u. H. Maisack, Naturwissenschaften 42, 627 (1955); Biochem. Z. 327, 296 (1955).

[56] V. Krampl u. C. A. Hoppert, Federat. Proc. 20, 375 (1961).

[57] P. H. L. Wu, T. Griffith u. R. U. Byerrum, J. biol. Chemistry 237, 887 (1962).

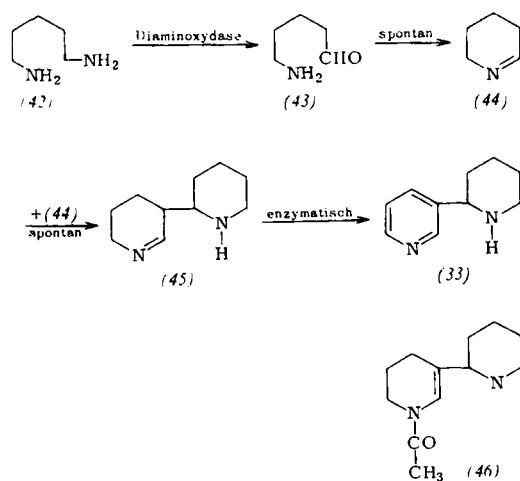
[58] E. Leete, J. Amer. chem. Soc. 78, 3520 (1956).

[59] E. Leete, J. Amer. chem. Soc. 80, 4393 (1958).

den Piperidinring. Der Pyridinring, der hypothetisch auch aus Lysin entstehen könnte [4c], war in diesen Versuchen frei von Radioaktivität. Auch Nicotin in *N. tabacum* ist nach Lysin-(2- ^{14}C)-Fütterung frei von Radioaktivität [58], so daß Lysin als Vorstufe des Pyridinringes in *Nicotiana* ausgeschlossen werden kann.

Während nach Cadaverin-(1,5- ^{14}C)-Fütterung das C-Atom 2 des Anabasins die Hälfte der Radioaktivität enthält, was auf eine Gleichverteilung zwischen C-Atom 2 und 6 entsprechend dem Putrescin-Einbau in Nicotin hinweist [59], soll nach Applikation von Lysin-(2- ^{14}C) im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Ornithin-Einbau in Nicotin die gesamte Radioaktivität im C-Atom 2 (dem Pyridinring benachbart) lokalisiert sein, so daß mit einem unterschiedlichen Mechanismus bei der Nicotin- und Anabasin-Synthese gerechnet werden müßte [58]. Möglicherweise wird ein unsymmetrisches Lysin-Abbauprodukt von der Art der Δ^1 -Piperidein-2-carbonsäure [51a] durchschritten.

Anabasin kann aber noch ganz anders entstehen. Extrakte aus Erbsen- oder Lupinenkeimlingen enthalten eine Diaminoxydase, die Cadaverin (42) zum ω -Aminovaleraldehyd (43) oxydieren kann [55]; dieser Aldehyd cyclisiert spontan zum Δ^1 -Piperidein (44), das unter bestimmten Bedingungen zu Tetrahydroanabasin (45) dimerisiert [60]. In den oben erwähnten Pflanzenextrakten findet sich ein weiterer, niedermolekularer, von Mn-Ionen abhängiger Faktor, der Tetrahydroanabasin zu Anabasin (33) zu dehydrieren vermag [61]. Diese Anabasin-Synthese, die auch mit Cadaverin-(1,5- ^{14}C) bestätigt worden ist [62], konnte bisher in intakten Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Trotzdem ist dieser



Syntheseweg von Bedeutung, weil er die erste enzymatische Alkaloidsynthese in vitro darstellt und weil in mehreren Leguminosen Tetrahydroanabasine vom Typ des Ammodendrins [63] (46) vorkommen, für das Cadaverin-(1,5- ^{14}C) in *Ammodendron conollyi* als Vorstufe dienen kann [64].

[60] Cl. Schöpf, F. Braun u. A. Komzak, Chem. Ber. 89, 1821 (1956).

[61] K. Hasse u. P. Berg, Naturwissenschaften 44, 584 (1957); Biochem. Z. 331, 349 (1959).

[62] K. Mothes, H. R. Schütte, H. Simon u. F. Weygand, Z. Naturforsch. 14b, 49 (1959).

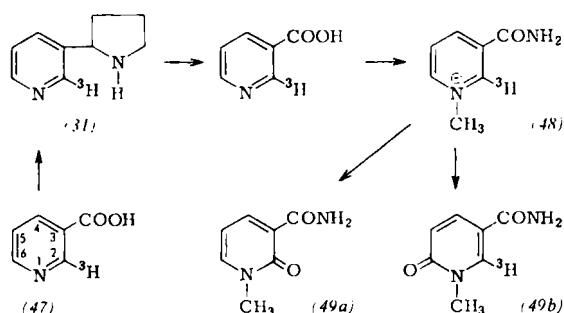
[63] H. G. Boit: Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960. Akademie-Verlag, Berlin 1961.

[64] H. R. Schütte u. K. Mothes, unveröffentlicht.

c) Der Pyridinring des Nicotins und Anabasins

Diese Anabasinsynthese, bei der der Pyridinring ebenso wie der Piperidinring aus Cadaverin entsteht, leitet über zur Frage der Bildung des Pyridinringes von Nicotin und Anabasin in *Nicotiana*-Arten. Schon Trier vermutete [4c, 65], daß Nicotin aus Nicotinsäure und Prolin gebildet wird. In der Tat scheinen Nicotinsäuregaben eine Erhöhung des Nicotingehaltes zu bewirken [66]. Nicotinsäure-(¹⁴COOH) oder deren Ester wurden jedoch nicht in Nicotin eingebaut [67]. Auch Tryptophan-(2-¹⁴C) ließ sich nicht in Nicotin inkorporieren [68]. Nach Lysin-(2-¹⁴C)-Fütterung war der Pyridinring frei von Radioaktivität [58, 69]. Im aromatischen Ring ¹⁴C-markierte oder tritium-markierte Nicotinsäure [70] ergab bei Versuchen mit sterilen Wurzelkulturen von *Nicotiana tabacum* einen Einbau in den Pyridinteil des Nicotins. Offensichtlich wird bei der Bildung des Nicotins aus Nicotinsäure die Carboxylgruppe abgespalten.

Einen tieferen Einblick in den Reaktionsverlauf bekamen Dawson et al. [70] durch Verwendung von spezifisch tritium- oder deuterium-markierter Nicotinsäure. Nicotinsäure-(2-³H), Nicotinsäure-(4-D) und Nicotinsäure-(5-³H) zeigten jeweils eine ähnliche Einbaurate, die auch mit der von uniform markierter ¹⁴C- oder ³H-Nicotinsäure übereinstimmte. Nicotin (31) aus einem Versuch mit Nicotinsäure-(2-³H) (47) wurde über die Oxydation zu Nicotinsäure hinaus zu einem Gemisch von 2- und 6-Pyridon, (49a) und (49b), abgebaut, indem die Nicotinsäure in 1-Methyl-nicotinsäureamid (48) übergeführt und dieses mit Kaliumeisen(III)-cyanid oxydiert wurde.



Dabei war das 2-Pyridon (49a) praktisch inaktiv im Gegensatz zum 6-Pyridon (49b), was für einen spezifischen Einbau der Nicotinsäure spricht und nicht für das Auftreten eines symmetrischen Zwischenproduktes. Anders liegen die Verhältnisse bei Verfütterung von Nicotin-

[65] E. Winterstein u. G. Trier: Die Alkaloide. Borntraeger, Berlin 1931, S. 1031.

[66] G. Klein u. H. Linser, Planta 20, 470 (1933); R. F. Dawson, Plant Physiol. 14, 479 (1939); R. F. Dawson, Ann. Rev. Biochem. 17, 541 (1948).

[67] R. F. Dawson, D. R. Christman u. R. C. Anderson, J. Amer. chem. Soc. 75, 5114 (1953).

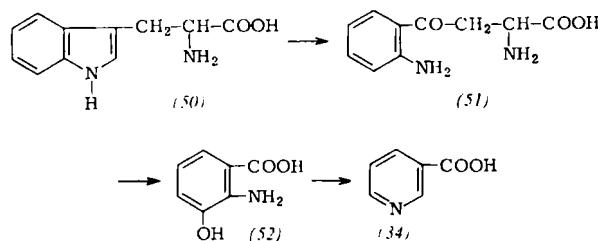
[68] P. J. Mortimer, Nature (London) 172, 74 (1953); U. Bowden, ibid. 172, 768 (1953).

[69] A. A. Bothner-By, R. F. Dawson u. D. R. Christman, Experientia 12, 151 (1956).

[70a] R. F. Dawson, D. R. Christman, A. F. D'Adamo, M. L. Solt u. A. P. Wolf, J. Amer. chem. Soc. 82, 2628 (1960); Chem. and Ind. 1958, 100.

säure-(6-³H). Hier fanden die Autoren [70] nur etwa ein Zehntel der mit anders markierten Nicotinsäuren erreichten Einbauraten. Die Position 6 der Nicotinsäure wird danach beim Übergang von der Nicotinsäure zum Nicotin verändert. Welcher Art die dabei auftretende Zwischenstufe ist, kann noch nicht entschieden werden. Es werden ein 6-Pyridon und eine 1,6-Dihydropyridiniumverbindung diskutiert. Gegen die erste Möglichkeit spricht die Tatsache, daß 6-Hydroxynicotinsäure-(¹⁵N) nicht in Nicotin eingebaut wird [70]. Auch 6-Oxo-1-methylnicotinsäureamid-(2-³H) wird nicht in nennenswertem Maße inkorporiert [70]. Der Pyridinring von Anabasin wird in der gleichen Weise gebildet wie der im Nicotin [71].

Woher stammt die Nicotinsäure? Für Tiere und einige Mikroorganismen konnte gezeigt werden, daß Nicotinsäure (34) über Kynurenin (51) und 3-Hydroxyanthranilsäure (52) aus Tryptophan (50) gebildet wird [72].



In höheren Pflanzen [73] und in einigen Bakterien [74] ließ sich aber bisher in Versuchen mit ¹⁴C- oder tritium-markiertem Tryptophan keine Umwandlung in Nicotinsäure beobachten. Radioaktives Acetat, und zwar vorwiegend methyl-markiertes, wurde in hohem Maße von *N. tabacum* [75–78] in Nicotin und von *N. glauca* in Anabasin inkorporiert [76]. In Gegenwart von inaktiver Nicotinsäure ist der Einbau von Acetat-(2-¹⁴C) wesentlich geringer als ohne Zugabe von Nicotinsäure. Die inaktive Nicotinsäure drängt offensichtlich die Biosynthese von radioaktiver Säure aus Acetat zurück [76].

Beim Einbau des Anabasins aus einem Versuch mit Acetat-(2-¹⁴C) (ohne Zugabe inaktiver Nicotinsäure) zeigte sich, daß nahezu 95 % der Radioaktivität im

[70b] R. F. Dawson, D. R. Christman, R. C. Anderson, M. L. Solt, A. F. D'Adamo u. U. Weiss, J. Amer. chem. Soc. 78, 2645 (1956).

[71] M. L. Solt, R. F. Dawson u. D. R. Christman, Plant Physiol. 35, 887 (1960).

[72] A. H. Mehler in W. D. McElroy u. H. B. Glass: Amino Acid Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 882; C. Yanofsky, ibid. S. 930.

[73a] E. Leete, L. Marion u. I. D. Spenser, Canad. J. Chem. 33, 405 (1955).

[73b] S. Aronoff, Plant Physiol. 31, 355 (1956).

[73c] E. Leete, Chem. and Ind. 1957, 1270.

[73d] J. Grimshaw u. L. Marion, Nature (London) 181, 112 (1958).

[73e] L. M. Henderson, J. F. Someroski, D. R. Rao, P. H. L. Wu, T. Griffith u. R. U. Byerrum, J. biol. Chemistry 234, 93 (1959).

[74] C. Yanofsky, J. Bacteriol. 68, 577 (1954).

[75] G. S. Iljin, Ber. Akad. Wiss. UdSSR 119, 544 (1958).

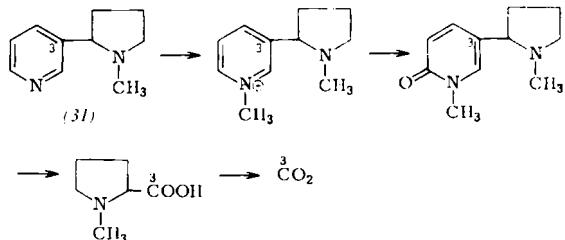
[76] E. Leete, Chem. and Ind. 1958, 1477.

[76a] E. G. Bilinski u. W. B. McConnell, Canad. J. Biochem. Physiol. 35, 357 (1957).

[77] T. Griffith u. R. U. Byerrum, Science (Washington) 129, 1485 (1959); T. Griffith u. R. U. Byerrum, Federat. Proc. 18, 942 (1959).

[78] T. Griffith, K. P. Hellmann u. R. U. Byerrum, J. biol. Chemistry 235, 800 (1960); T. Griffith u. R. U. Byerrum, Federat. Proc. 18, 942 (1959).

Pyridinring lokalisiert waren [76], während im Nicotin die Radioaktivität auf den Pyridinring und den Pyrrolidinring verteilt war [76, 77]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse für Nicotin und Anabasin sind verständlich, weil der Pyrrolidinring des Nicotins über die Glutaminsäure-Ornithin-Prolin-Familie und den Krebs-Cyclus enger mit dem Acetat zusammenhängt als dies für das Lysin, die Vorstufe des Piperidinringes im Anabasin, der Fall ist [76a]. Acetat-(1-¹⁴C) wird in 7 Tage währenden Versuchen von *N. rustica* ausschließlich in den Pyrrolidinring des Nicotins eingebaut [77]. Brenztraubensäure-(1-¹⁴C) wird sehr wenig inkorporiert, während Brenztraubensäure-(3-¹⁴C), die einem Acetat-(2-¹⁴C) entspricht, einen hohen Einbau zeigt [77]. Uniform markierte Asparaginsäure-(¹⁴C) wird auch in den Pyridinring von Nicotin inkorporiert, aber die Einbaurate ist nicht sehr viel höher als die von Acetat [76]. Asparaginsäure-(3-¹⁴C) wird sehr stark in den Pyridinring eingebaut; dabei ist etwa die Hälfte der Radioaktivität im C-Atom 3 des Pyridinringes lokalisiert, wie mit dem im Schema 3 skizzierten Abbau gezeigt werden konnte [79]. Während Propionat-(1-¹⁴C) praktisch nicht in Nicotin eingebaut wird, zeigen Propionat-(2-¹⁴C) und Glycerin-(1.3-¹⁴C) eine viel größere Einbaurate als Acetat-(2-¹⁴C) [78]. Mit einem spezifischen Abbau konnten wir das C-Atom 3 des Pyridinringes herausschälen. Die Verteilung der Radioaktivität im Pyrrolidinring entspricht nach Propionat-(2-¹⁴C)- und Glycerin-(1.3-¹⁴C)-Fütterung derjenigen nach Acetat-(2-¹⁴C)-Einbau. Propionat-(1-¹⁴C) wird nur sehr wenig inkorporiert. Es ist bekannt,



Schema 3. Abbau von Nicotin

dass Propionat einerseits [80] zu Methylmalonat carboxyliert werden kann, das sich dann zu Bernsteinsäure umlagert und andererseits [81] durch β -Oxydation und anschließende Abspaltung der ursprünglichen Carboxylgruppe zu Acetat metabolisiert werden kann. In beiden Fällen mündet sein Stoffwechsel in den Krebszyklus. Auch Glycerin-(1.3-¹⁴C) kann über die Glykolyse zu Acetat-(2-¹⁴C) abgebaut werden, so dass die Ähnlichkeit der Radioaktivitätsverteilung bei diesen drei Versuchen verständlich erscheint.

39 % der Propionat-(2-¹⁴C)-Aktivität und 57 % der Glycerin-(1.3-¹⁴C)-Aktivität sind in den Pyridinring eingegangen, wobei 50 % der Pyridinaktivität des Propionat-(2-¹⁴C)-Versuches, wie auch des Acetat-(2-¹⁴C)-Versuches im C-Atom 3 lokalisiert sind [78, 79]. Obwohl diese

[79] T. Griffith, K. P. Hellmann u. R. U. Byerrum, Biochemistry 1, 336 (1962).

[80] M. Flavin, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, Nature (London) 176, 823 (1955); M. Flavin u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 229, 965 (1957).

[81] J. Giovannelli u. P. K. Stumpf, J. Amer. chem. Soc. 79, 2652 (1957); J. biol. Chemistry 231, 411 (1958).

Aktivitätsverteilung auch bei einem Übergang des Propionates in Acetat und Bernsteinsäure zu erwarten wäre, schließen die Autoren [78] aus der verglichen mit Acetat-(2-¹⁴C) höheren Einbaurate des Propionates-(2-¹⁴C) in Nicotin und aus der im Gegensatz zur Acetat-(2-¹⁴C)-Aktivität (40 % im Pyridinring) größeren Anreicherung der Glycerin-(1.3-¹⁴C)-Aktivität im Pyridinring (60 %), daß nicht der Krebszyklus durchlaufen wird, sondern daß diese beiden Verbindungen auf dem direkten Syntheseweg des Pyridinringes liegen [82]. Die Carboxylgruppe der Propionsäure ergibt dabei die der Nicotinsäure. Diese geht aber bei der Nicotinsynthese verloren, wodurch der geringe Einbau der Propionat-(1-¹⁴C)-Aktivität erklärt werden kann. Aber auch beim Durchlaufen des Krebszyklus über Acetat oder Bernsteinsäure würde die Carboxylgruppe verloren gehen.

Die Hypothese des direkten Einbaues von Propionat in die Nicotinsäure wurde durch einen Versuch mit Propionat-(3-¹⁴C) widerlegt. Diese Verbindung gibt keine Aktivität an den Pyridinring des Nicotins ab, so daß man annehmen muß, daß Propionat über Acetat in den Krebszyklus einmündet, wobei ein Propionat-(3-¹⁴C) einem Acetat-(1-¹⁴C) entspricht [79].

Für einen direkten Einbau von Glycerin in den Pyridinring des Nicotins spricht, daß Glycerin-(1.3-¹⁴C) die gleiche Einbaurate wie Glycerin-(2-¹⁴C) zeigt [79]. Würde Glycerin über Glykolyse und Krebszyklus eingebaut, so müßte Glycerin-(2-¹⁴C) ein Acetat-(1-¹⁴C) bilden, das aber nach früheren Versuchen nur in geringem Maße inkorporiert wird [77]. In anderen Versuchen wurde für Glycerin-(2-¹⁴C) eine doppelt so hohe Einbaurate gefunden wie für Glycerin-(1.3-¹⁴C) [83].

Weitere Versuche müssen noch verschiedene Unklarheiten beseitigen. In Tieren ist β -Alanin, das aus Propionsäure und aus Asparaginsäure entstehen kann [84], eine Vorstufe der mit der Nicotinsäure verwandten Chinolinsäure (53) [85]. Bei Versuchen mit *Escherichia coli* konnten Glycerin und Bernsteinsäure als Vorstufen der Nicotinsäure gefunden werden [86], wobei die Radioaktivität in einem Versuch mit Glycerin-(1.3-¹⁴C) und inaktiver Bernsteinsäure sowie in einem solchen mit Bernsteinsäure-(2.3-¹⁴C) und inaktivem Glycerin nur im Pyridinring inkorporiert wird, während nach Applikation von Bernsteinsäure-(1.4-¹⁴C) und inaktivem Glycerin der Pyridinring der Nicotinsäure inaktiv war, und die gesamte Radioaktivität in der Carboxylgruppe gefunden wurde [87]. In Versuchen an *Mycobacterium tuberculosis*, Stamm BCG, konnte nach Asparaginsäure-(4-¹⁴C)-Gabe die gesamte Aktivität in der Carboxylgruppe der Nicotinsäure nachgewiesen werden. Nach Fütterung von Asparaginsäure-(1.4-¹⁴C¹⁵N) war ebenfalls nur die Carboxylgruppe radioaktiv; das Isotopenverhältnis ¹⁴C : ¹⁵N in der Nicotinsäure besaß nahezu den theoretisch zu erwartenden Wert unter der Annahme, daß ein Molekül Asparaginsäure – einschließlich ihres Aminostickstoffes – unter Verlust der α -Carboxylgruppe in die Nicotinsäure eingebaut wird [88]. Die Tatsache, daß in

[82] T. Griffith u. R. U. Byerrum, Federat. Proc. 18, 942 (1959).

[83] R. F. Dawson u. D. R. Christman (1961), zitiert nach [79].

[84] F. P. Kupiecki u. M. J. Coon, J. biol. Chemistry 229, 743 (1957).

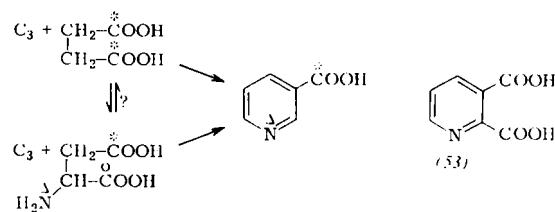
[85] L. V. Hankes u. M. A. Schmaeler, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2, 468 (1960).

[86] M. V. Ortega u. G. M. Brown, J. Amer. chem. Soc. 81, 4437 (1959).

[87] M. V. Ortega u. G. M. Brown, J. biol. Chemistry 235, 2939 (1960).

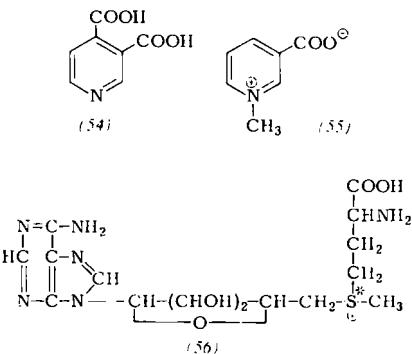
[88] E. Mothes, D. Gross, H. R. Schütte u. K. Mothes, Naturwissenschaften 48, 623 (1961); D. Gross, H. R. Schütte, G. Hübler u. K. Mothes, Tetrahedron Letters 1963, im Druck.

E.coli Propionat-(2-¹⁴C) in Gegenwart inaktiver Bernsteinäure nur wenig oder gar nicht in Nicotinsäure eingebaut wird [87], spricht gegen Propionat als unmittelbare Vorstufe in gewissen Bakterien, so daß nach den bisherigen Ergebnissen eine C₄-Säure und ein C₃-Körper als Vorstufe angenommen werden müssen. Nicotinsäure-Mangelmutanten von *Lactobacillus arabinosus* und *E.coli* zeigten in Nicotinsäure-



freiem Medium nach Zugabe verschiedener Substanzen nur mit Cinchomeronsäure (54) Wachstum [89]. Daß diese Säure in den Bakterien eine echte Vorstufe der Nicotinsäure ist, konnte durch Isolierung von Cinchomeronsäure aus den Kulturfiltraten einer Nicotinsäure-Mangelmutante wahrscheinlich gemacht werden [83].

Für Trigonellin (55), das Betain der Nicotinsäure, ist bisher nur gezeigt worden, daß ¹⁴C-markiertes Tryptophan [73a,73e] oder 3-Hydroxyanthranilsäure-(7-¹⁴C) nicht eingebaut [73b]



werden und daß es aus Nicotinsäure entsteht [90,91]. Extrakte aus Erbsenkeimlingen vermögen die Synthese von Trigonellin aus Nicotinsäure und S-Adenosylmethionin (56) zu katalysieren [91].

d) Die Methylgruppe des Nicotins

Die Herkunft der Methylgruppe des Nicotins ist intensiv untersucht worden. Mehrere ¹⁴C-markierte C₁-Donatoren konnten inkorporiert werden, wobei die Radioaktivität vorwiegend oder ausschließlich in der N-Methylgruppe lokalisiert war: Ameisensäure-(¹⁴C) [92,93], Formaldehyd-(¹⁴C) [94], Serin-(3-¹⁴C) [94], Methionin-(¹⁴CH₃) [92,95,96], Cholin-(¹⁴CH₃) [95], Betain-(¹⁴CH₃) [97],

[89] F. Lingens, Angew. Chem. 72, 920 (1960).

[90] F. C. J. Zeijlemaker, Acta bot. neerl. 2, 123 (1953); Cl. O. Blaka, Amer. J. Bot. 41, 231 (1954); J. Brüggemann, G. Drepper u. U. Hadeler, Biochem. Z. 322, 426 (1952).

[91] J. G. Joshi u. P. Handler, J. biol. Chemistry 235, 2981 (1960).

[92] St. A. Brown u. R. U. Byerrum, J. Amer. chem. Soc. 74, 1523 (1952).

[93] R. U. Byerrum, L. J. Dewey, R. L. Hamill u. Ch. D. Ball, J. biol. Chemistry 219, 345 (1956).

[94] R. U. Byerrum, R. L. Ringler, R. L. Hamill u. Ch. D. Ball, J. biol. Chemistry 216, 371 (1955).

[95] R. U. Byerrum u. R. E. Wing, J. biol. Chemistry 205, 637 (1954).

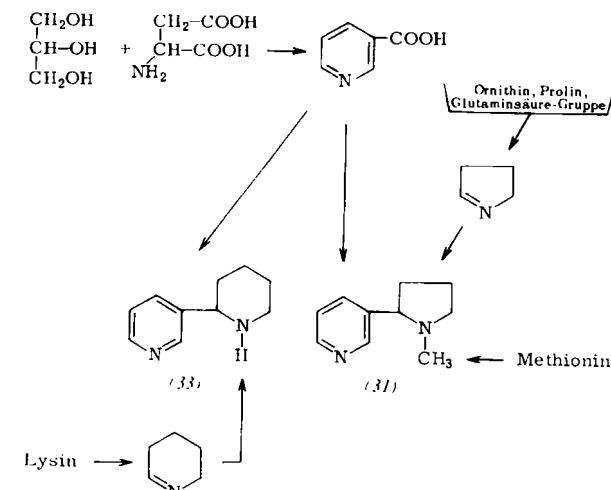
[96] L. J. Dewey, R. U. Byerrum u. Ch. D. Ball, J. Amer. chem. Soc. 76, 3997 (1954).

[97] R. U. Byerrum, C. S. Sato u. Ch. D. Ball, Plant Physiol. 31, 374 (1956).

Glykolsäure-(2-¹⁴C) [93,98] und Glycin-(2-¹⁴C) [99]. Wahrscheinlich ist die Methylierung eine Transmethylierung mit aktivem Methionin (56) (S-Adenosylmethionin), denn bei Verwendung doppelt markierten Methionins-(¹⁴CD₃) ist das Isotopenverhältnis ¹⁴C:D in der Methylgruppe des Nicotins das gleiche wie im Methionin, d. h. die Methylgruppe wird als Ganzes übertragen [96]. L-Methionin dient erwartungsgemäß wesentlich stärker als Methylgruppen-Donator als das D-Isomere [100]. Ob es auch eine primäre Methylierung direkt über das Folsäuresystem geben kann, ist unbekannt.

Damit ist noch nicht geklärt, ob Nornicotin die Vorstufe von Nicotin oder Nicotin die Vorstufe von Nornicotin ist oder ob beide Alkaloide auf parallelen Wegen gebildet werden [9a]. Eine Entmethylierung des Nicotins ist jedenfalls möglich [9a,101]; nach Verabreichung von Nicotin-(¹⁴CH₃) an Tabakpflanzen bildet sich Cholin-(¹⁴CH₃) [102].

Aus den geschilderten Resultaten kann man für die Biogenese von Nicotin (31) und Anabasin (33) in *Nicotiana*-Arten das Schema 4 aufstellen.



Schema 4. Biosynthese von Nicotin (31) und Anabasin (33) in *Nicotiana*-Arten

e) Ricinin

Das Ricinin (57) aus *Ricinus communis* enthält einen Pyridonring. Die O- und N-Methylgruppen können von Methionin [103] oder Formiat [104,106] geliefert werden. Carboxylmarkierte Nicotinsäure wird in Ricinin eingebaut, wobei die Aktivität in der Cyangruppe lokalisiert ist [105–107].

[98] R. U. Byerrum, L. J. Dewey u. Ch. D. Ball, Plant Physiol. 30, XVI (1955).

[99] R. U. Byerrum, R. L. Hamill u. Ch. D. Ball, J. biol. Chemistry 210, 645 (1954).

[100] B. Ladesic, Z. Devide, N. Pravdic u. D. Keglevic, Arch. Biochem. Biophysics 97, 556 (1962).

[101] K. Mothes, L. Engelbrecht, K. H. Tschöpe u. G. Hutschenreuter-Treffitz, Flora 144, 518 (1957).

[102] E. Leete u. V. M. Bell, J. Amer. chem. Soc. 81, 4358 (1959).

[103] M. Dubeck u. S. Kirkwood, J. biol. Chemistry 199, 307 (1952).

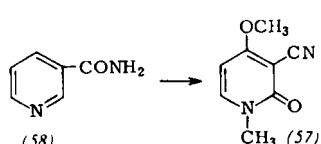
[104] G. Boeckh-Behrens, Dissertation, Universität Tübingen, 1960.

[105] E. Leete u. F. H. B. Leitz, Chem. and Ind. 1957, 1572.

[106] G. R. Waller u. L. M. Henderson, J. biol. Chemistry 236, 1186 (1961).

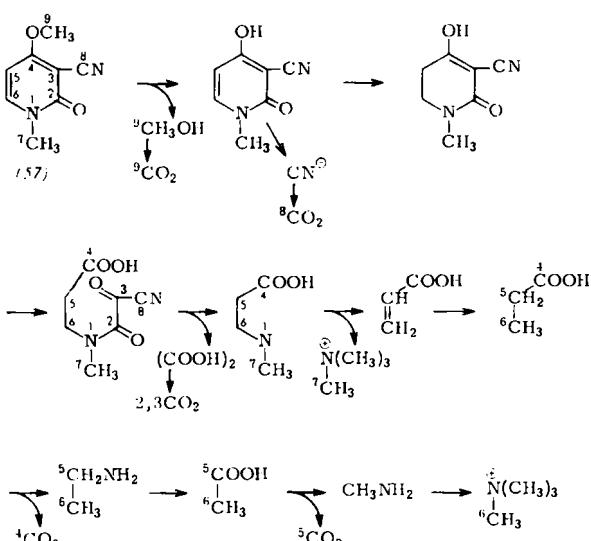
[107] G. R. Waller u. L. M. Henderson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 5 (1961).

Versuche mit doppeltmarkierter Nicotinsäure (^3H und $^{14}\text{COOH}$) und Nicotinsäureamid (58) (^3H und $^{15}\text{NH}_2$) zeigen, daß Nicotinsäure über das Amid als Ganzes in das Ricinin eingebaut wird [106]. Die Nitrilgruppe entsteht aus dem Carboxyamidrest.



Damit besteht biosynthetisch eine enge Beziehung dieses Pyridonalkaloïdes zu den Pyridinabkömmlingen, wie dem Nicotin. Andererseits muß die Biosynthese des Ricinins wichtige Anhaltspunkte für die der Nicotinsäure in höheren Pflanzen liefern.

Tryptophan-(7a- ^{14}C) wird in Ricinin nicht eingebaut [106]. Vielmehr sprechen auch hier alle Versuchsergebnisse dafür, daß der Pyridinring aus kleineren Bausteinen entsteht. So wurden von mehreren geprüften markierten Verbindungen [76, 104, 106–108] lediglich die Radioaktivitäten von Glycin-(2- ^{14}C), Glutaminsäure-(2- ^{14}C) und -(1- ^{14}C), Bernsteinsäure-(2.3- ^{14}C) und (1.4- ^{14}C), Natriumpropionat-(1- ^{14}C), -(2- ^{14}C) und -(3- ^{14}C), Natriumacetat-(1- ^{14}C) und -(2- ^{14}C), Glycerin-(1.3- ^{14}C) und -(2- ^{14}C), β -Alanin-(1- ^{14}C) und -(2- ^{14}C) sowie Asparaginsäure in nennenswertem Maße eingebaut. Nur in wenigen Fällen ist ein übersichtlicher Abbau durchgeführt worden (Schema 5).



Schema 5. Abbau des Ricinins (57)

So wird die Radioaktivität nach Glutaminsäure-(2- ^{14}C) Angebot vorwiegend in C-8 eingebaut [104, 108], während Glutaminsäure-(1- ^{14}C) und Acetat-(1- ^{14}C) eine vorzugsweise Markierung in C-6 und 8 des Ricinins ergeben, wobei die absolute Einbaurate des Acetat-(1- ^{14}C) größer ist als die der Glutaminsäure-(1- ^{14}C).

[108] R. A. Anwar, T. Griffith u. R. U. Byerrum, Federat. Proc. 20, 374 (1961).

[108a] P. F. Juby u. L. Marion, Biochem. biophysic. Res. Commun. 5, 461 (1961).

[108b] J. Essery, P. F. Juby, L. Marion u. E. Trumbull, J. Amer. chem. Soc. 84, 4597 (1962).

[104, 108]. Asparaginsäure-(3- ^{14}C) wird in sehr starkem Maße eingebaut; die Radioaktivität ist hauptsächlich im C-Atom 3 des Alkaloides gefunden worden [104]. Acetat-(2- ^{14}C) wird noch stärker in das Ricinin eingebaut als Asparaginsäure-(3- ^{14}C), wobei die Hauptaktivität in C-2 oder C-3 lokalisiert war [104, 108]. Daraus schließt die Autorin, daß eine N-freie C₄-Säure als unmittelbare Ricininvorstufe zu vermuten ist (vgl. unten), aus der aber nicht die C-Atome 4 und 5 entstehen [104]. Im Glyoxylsäurecyclus, der in Ricinus-Keimlingen neben dem Citronensäurecyclus eine große Rolle spielt [109], führt Acetat-(2- ^{14}C) zu einer 2.3- ^{14}C -markierten C₄-Säure. Die Radioaktivität von Propionat-(1- ^{14}C) und -(3- ^{14}C) wird vorwiegend in den Nitrilkohlenstoff eingebaut, während die von Propionat-(2- ^{14}C) hauptsächlich im Pyridonring lokalisiert war. Danach ist anzunehmen, daß Propionat nicht direkt in die Nicotinsäure eingebaut wird, sondern durch β -Oxydation und Abspaltung der Carboxylgruppe zu Acetat [81] umgesetzt wird und in den Citronensäurecyclus einmündet. Dabei entspricht Propionat-(1- ^{14}C) und -(3- ^{14}C) einem Acetat-(1- ^{14}C), wie es die Versuche zeigen [108].

Bernsteinsäure-(2.3- ^{14}C) wird relativ stark eingebaut, stärker als Acetat-(2- ^{14}C), wobei die Radioaktivität nur im Pyridonring nachgewiesen werden konnte [107]. Die Radioaktivität der mit geringerer Einbaurate inkorporierten Bernsteinsäure-(1.4- ^{14}C) verteilte sich zu 25 % auf die Cyangruppe und zu 75 % auf den Pyridonring.

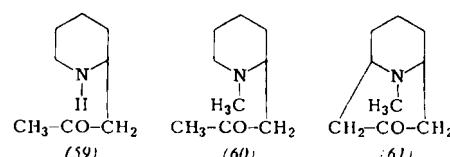
Nach Glycerin-(1.3- ^{14}C)-Gabe wurden vorsugsweise die C-Atome 4 und 6 radioaktiv [108a], während nach Glycerin-(2- ^{14}C)-Applikation der Hauptanteil der Radioaktivität im C-Atom 5 lokalisiert war [108b].

Nach Verfütterung von Lysin-(2- ^{14}C) wurde ein Ricinin-(6- ^{14}C) und nach Applikation von α -Aminoadipinsäure-(ε- ^{14}C) ein Ricinin-(2.6- ^{14}C) erhalten [110]. Obwohl in Versuchen ohne radioaktive Markierung Lysin eine Zunahme des Riciningerhaltes der Pflanzen bewirkt [111], fanden andere Autoren [104, 106] nur eine sehr geringe Einbaurate von Lysin-(2- ^{14}C), so daß diese Aminosäure als unmittelbare Vorstufe nicht diskutiert wird.

Damit scheint eine C₄-Säure wie Bernsteinsäure oder Asparaginsäure sowie ein C₃-Körper wie Glycerin als natürliche Vorstufen in Frage zu kommen, was den Experimenten zur Biosynthese der Nicotinsäure durchaus entspricht.

f) Isopelletierin, Methylisopelletierin, Pseudopelletierin

Homologe des Norhygrins, Hygrins (19) und Tropinons (1) mit einem Piperidinring statt des Pyrrolidinringes sind Isopelletierin (59), Methylisopelletierin (60) und Pseudopelletierin (61); diese Alkaloide kommen in Pu-

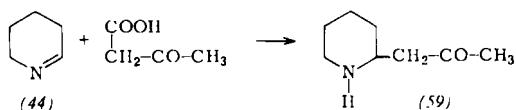


[109] H. L. Kornberg u. H. Beevers, Nature (London) 180, 35 (1957).

[110] H. Tamir u. D. Ginsburg, J. chem. Soc. (London) 1959, 2921.

[111] O. V. Bogdashevskaja, Ber. Akad. Wiss. UdSSR 99, 853 (1954).

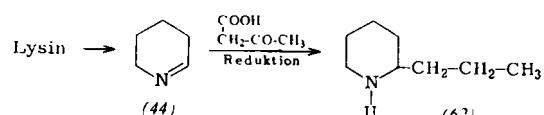
nica granatum, dem Granatapfelbaum, vor. Sie leiten sich theoretisch vom Lysin ab [4]. Pseudopelletierin (61) ist analog dem Tropinon synthetisiert worden, nur daß an Stelle des Succindialdehyds Glutardialdehyd verwendet wurde [112]. Die Synthese gelingt auch unter zellmöglichen Bedingungen [6]. Das Isopelletierin (59) ist ebenfalls unter ähnlichen Voraussetzungen erhalten worden. Dabei gingen mehrere Autoren [21, 113] vom Δ^1 -Piperidein (44) aus, dessen Chemie Schöpf [60] eingehend aufgeklärt hat, und das mit Acetessigsäure oder Acetondicarbonsäure Isopelletierin (59) bildet. Daß Δ^1 -Piperidein (44) möglicherweise in der Zelle auftritt, ist oben [(42) \rightarrow (44)] gezeigt worden.



Isopelletierin (59) [23] und Methylisopelletierin (60) [22] sind auch analog den entsprechenden Pyrrolidinbasen halbenzymatisch mit Diaminoxydase aus Cadaverin bzw. N-Methylcadaverin erhalten worden. An *Punica granatum*-Pflanzen konnte gezeigt werden, daß Cadaverin-(1,5-¹⁴C) in Pelletierinalkaloide eingebaut wird [114]. Ein Abbau steht noch aus.

g) Conjin

Strukturell und daher sicher auch biogenetisch [4c] verwandt mit dem Isopelletierin (59) ist das Coniin (62), das Hauptalkaloid des gefleckten Schierlings. Es enthält statt der Carbonylgruppe eine Methylengruppe.



Uniform markiertes Lysin ergibt radioaktives Coniiin [115], was für eine Bildung über Δ^1 -Piperidein (44) spricht.

b) Lobelin, Lobelanidin, Lobelanin

Auch die Alkaloide aus *Lobelia inflata* sind mit den Pelletierinen strukturell verwandt. Die wichtigsten sind Lobelin (63), Lobelanidin (64) und Lobelanin (65). Die beiden ersten sind Reduktionsprodukte des Lobelanins. Dieses konnten Schöpf et al. unter zellmöglichen Bedingungen (2 Tage bei 25 °C, pH = 4) aus Glutardialdehyd, Methylamin und 2 Mol Benzoylessigsäure mit 80 % Ausbeute synthetisieren [6]. Verwendet man statt der reinen Benzoylessigsäure in dieser Synthese ein Gemisch aus Benzoylessigsäure und Acetessigsäure, so entsteht neben den beiden symmetrischen Basen, Diphenyl-lobelidion (65) und Dimethyl-lobelidion (66), das unsymmetrische 8-Methyl-10-phenyl-lobelidion (67)

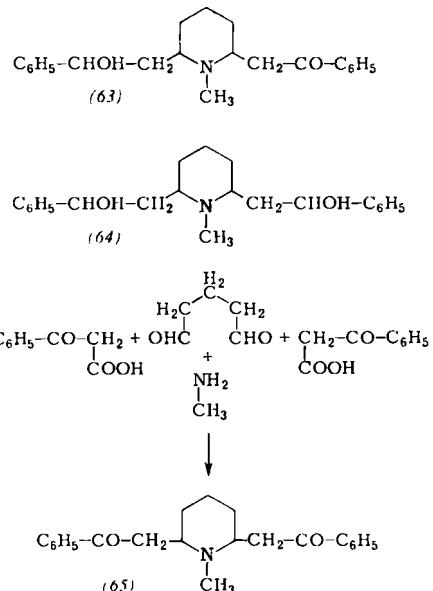
[112] R. Ch. Menzies u. R. Robinson, J. chem. Soc. (London) 125, 2163 (1924).

[113a] *C. Schöpf, F. Braun, K. Burkhardt, G. Dummer u. H. Müller, Liebigs Ann. Chem. 626, 123 (1959).*

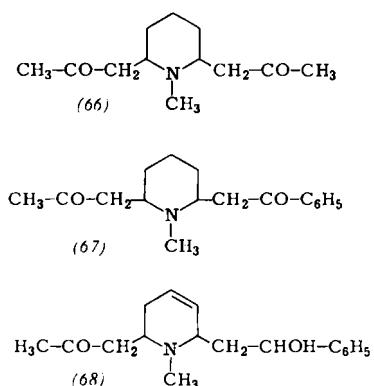
[113b] Vgl. auch *Cf. Schöpf, Angew. Chem.* 69, 69 (1957).

[113] Vgl. auch C. Schöppf, Angew. Chem. 69, 69 (1957).

[115] U. Schiedt u. H. G. Höss, Z. Naturforsch. 13b, 691 (1958).

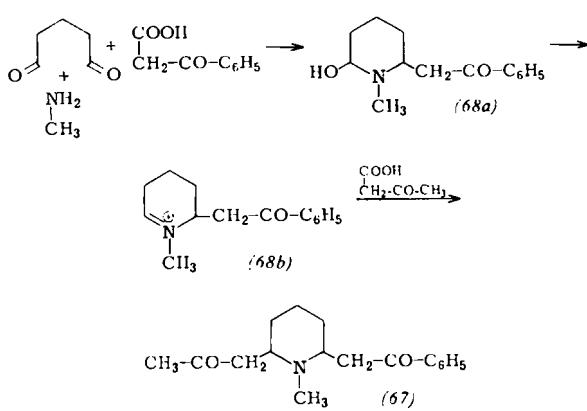


[116, 117], von dem sich u. a. das in *Sedum acre* vorkommende Alkaloid Sedinin (68) ableitet. Franck [116] konnte das 8-Methyl-10-phenyl-lobelidion (67) unter zellmöglichen Bedingungen in zwei Stufen synthetisieren, worin er einen Hinweis sieht, daß das einfach substituierte



Zwischenprodukt (68) stabil genug ist, um sich in der Pflanze in einem anderen Zellbereich anreichern zu können, wo die Reaktion mit einem zweiten Molekül β -Ketosäure verläuft.

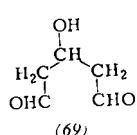
Das wäre eine Erklärung dafür, daß in *Sedum acre* nur unsymmetrisch substituierte Lobelidion-Abkömmlinge gefunden werden.



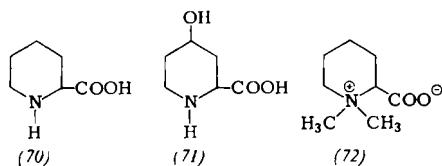
[116] B. Franck, Chem. Ber. 93, 2360 (1960).

[117] *Ci. Schöpf u. Th. Kauffmann*, Liebigs Ann. Chem. 608, 88 (1957).

den wurden [118]. Es ist aber wahrscheinlicher, daß diese spontan möglichen Reaktionen enzymatisch gesteuert werden. β -Hydroxyglutaraldehyd (69) als mögliche Vorstufe des Sedinins läßt sich unter zellmöglichen Bedingungen nicht mit Benzoylessigsäure und Methylamin kondensieren, so daß



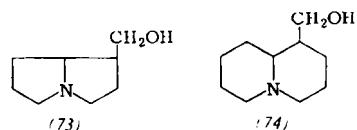
dieser Aldehyd als Biosynthese-Zwischenstufe fraglich erscheint [119]. Möglicherweise wird der fertige Piperidinring spezifisch zu einer Hydroxyverbindung oxydiert, wie das für die Bildung von 4-Hydroxypipecolinsäure (71) aus Pipecolinsäure (70) gezeigt werden konnte [120]. Diese könnte dann unter Wasserabspaltung das ungesättigte Sedinin bilden. In *Lobelia inflata* gibt es Hinweise für das Auftreten solcher Hydroxyverbindungen [117].



In Analogie zum Stachydrin (25) wird Lysin-(2- ^{14}C) von 2 Wochen alten Luzerne-Pflanzen nicht in Homo-stachydrin (72), das Betain der Pipecolinsäure, eingebaut [121], obwohl letztere aus Lysin entstehen kann [122]. Vielleicht ist wie beim Stachydrin in älteren Pflanzen ein Einbau möglich.

4. Pyrrolizidin- und Chinolizidinalkaloide

Die Pyrrolizidin- und Chinolizidinalkaloide besitzen homologe Strukturen, wie es an der Gegenüberstellung von Laburnin (73) als Pyrrolizidinderivat und Lupinin (74) als Vertreter der Chinolizidine gezeigt wird.



a) Pyrrolizidinalkaloide vom Laburnin-Typ

Die Pyrrolizidinalkaloide gehören offenbar zur Ornithin-Familie. Diese Aminosäure soll über die Stufe eines Iminodialdehydes (76) das Gerüst der Pyrrolizidinalkaloide (73) bilden [4c, 123]. Nach diesem Biogenese-schema ist eine Synthese des Pyrrolizidin-Ringsystems unter zellmöglichen Bedingungen durchgeführt worden

[118] B. Franck, Chem. Ber. 91, 2803 (1958).

[119] B. Franck u. M. Schiebel, Naturwissenschaften 48, 717 (1961).

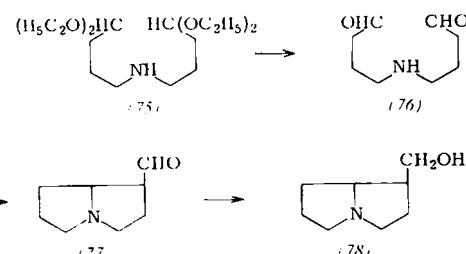
[120] W. Schenk, H. R. Schütte u. K. Mothes, Flora 152, 590 (1962).

[121] A. V. Robertson u. L. Marion, Canad. J. Chem. 37, 1043 (1959).

[122] P. H. Lowy, Arch. Biochem. Biophysics 47, 228 (1953); L. Fowden, J. exp. Bot. (London) 11, 302 (1960).

[123] Cl. Schöpf, Chimia 2, 206, 240 (1948).

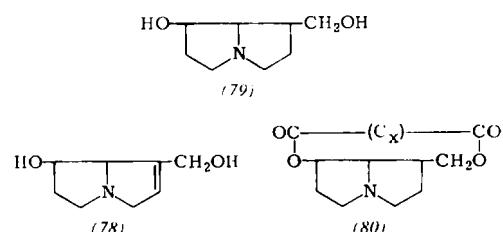
[124]. Der Iminodialdehyd (76) aus dem entsprechenden Acetal (75) bildete innerhalb von 7 Tagen bei pH = 7 ein Pyrrolizidinderivat (77), das sich nach Hydrierung mit 52 % Ausbeute in ein Gemisch stereoisomerer 1-Hydroxymethylpyrrolizidine (73) (Laburnin, Trachelanthamidin) überführen ließ.



Mit Ornithin-(2- ^{14}C) wurde in *Crotalaria spectabilis* reaktives Monocrotalin erhalten, dessen Radioaktivität fast ausschließlich im Retronecin (78) lokalisiert war [125].

b) Retronecin- und Platynecinbasen

Interessanter als die einfachen Pyrrolizidinalkaloide vom Typ des Laburnins (73) ist die große Mannigfaltigkeit der Pyrrolizidinalkaloide – vor allem aus *Senecio*- oder *Crotalaria*-Arten –, die sich in vielen Fällen vom Retronecin (78) oder Platynecin (79) ableiten und nach Formel (80) mit Dicarbonsäuren verestert sind, deren Gerüst aus 5, 6, 7, 8 oder 10 Kohlenstoffatomen besteht.



Für die Biosynthese dieser Retronecin- und Platynecinbasen wird analog der Entstehung von Laburnin (73) aus Ornithin eine Bildung aus einem Hydroxy-ornithin angenommen [4c]. Diese Aminosäure, die bisher unseres Wissens noch nicht in der Natur gefunden worden ist, könnte (entsprechend der Synthese von Ornithin aus Glutaminsäure) aus einer in Proteinen nachgewiesenen 2-Hydroxyglutaminsäure gebildet werden. Der Einbau von Ornithin-(^{14}C) in *Crotalaria*-Alkaloide spricht aber für eine nachträgliche Oxydation, wie das auch für die ungesättigten Sedum-Alkaloide (siehe oben) und die 4-Hydroxypipecolinsäure angenommen wird.

c) Necinsäuren

Über die Biosynthese der Necinsäuren, wie die Säurekomponenten der veresterten Pyrrolizidinalkaloide genannt werden, liegen nur wenige Untersuchungen vor. Man nimmt an [126], daß diese Säuren die Produkte

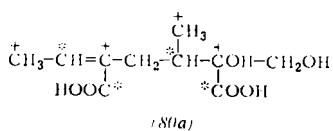
[124] N. J. Leonard u. St. W. Blum, J. Amer. chem. Soc. 82, 503 (1960); K. Babor, I. Jezo, V. Kalac u. M. Karvas, Chem. Zvesti 13, 163 (1959); Chem. Zbl. 133, 5300 (1962).

[125] E. Nowacki u. R. U. Byerrum, Life Sciences, 5, 157 (1962).

[126] R. Adams u. M. Gianturco, Angew. Chem. 69, 5 (1957).

mehrfacher Kondensierungen von Acetat-Einheiten mit sich selbst oder mit einfachen Dreikohlenstoffeinheiten sind.

Tatsächlich werden Acetat-(1-¹⁴C) und Acetat-(2-¹⁴C) von *Senecio isatideus* in großem Maße in die Retronec-Säure (80a) des Senecioalkaloïdes Retrorsin eingebaut, während Mevalonsäure-(2-¹⁴C) unter gleichen Umständen praktisch keine Inkorporierung zeigt [127]. Der Abbau dieser Säure durch Kuhn-Roth-Oxydation, Bleitetraacetat-Oxydation und Ozonisation ergab, daß vier Moleküle Acetat zu ihrem Aufbau verwendet werden. Die Formel (80a) zeigt die Radioaktivitätsverteilung nach Acetat-(1-¹⁴C)-Einbau (Sterne) und nach Acetat-(2-¹⁴C)-Einbau (Kreuze). Aus den Untersuchungen schließen die Autoren, daß dieser Säuretyp aus zwei

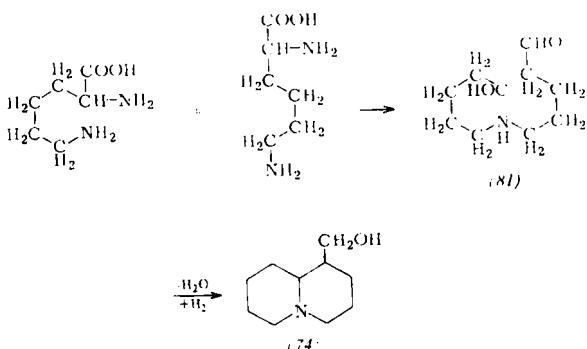


Molekülen Acetessigsäure entsteht, an die vorher jeweils ein C₁-Körper ankondensiert worden ist. Durch verschiedene Kondensation dieser C₅-Einheit (Acetessigsäure + C₁) mit einer zweiten solchen C₅-Einheit oder mit einer Propionsäureeinheit läßt sich die Bildung der verschiedenen Necinsäuren erklären [127]. Die Ergebnisse sind aber auch mit der Annahme vereinbar, daß ein Molekül Acetat mit einem Molekül Malonat zu der C₅-Einheit kondensiert.

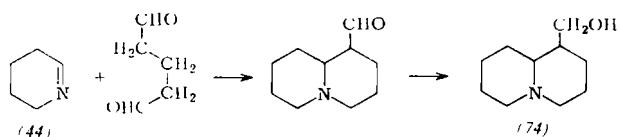
In *Crotalaria spectabilis* wird Acetat (1^{14}C) und Propionat (1^{14}C) vorwiegend in die entsprechende Necinsäure inkorporiert [125].

d) Lupinenalkaloide

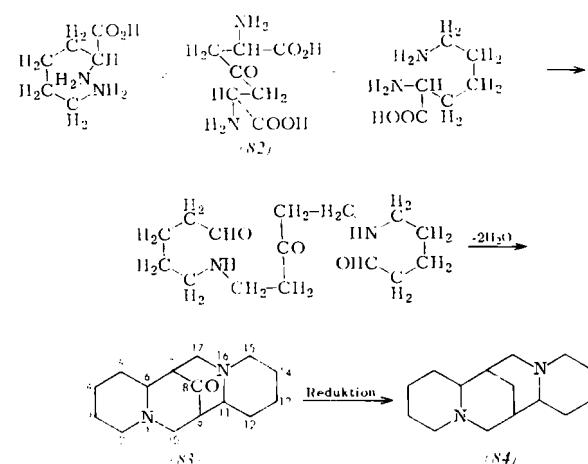
Die Lupinenalkaloide gehören zur Lysin-Familie. So nahm Schöpf [4c, 128] schon 1931 an, daß Lupinin(74) aus zwei Molekülen Lysin oder einem biochemischen Äquivalent über einen Iminodialdehyd (81) entsteht. Diese Synthese gelang auch im Laboratorium [129].



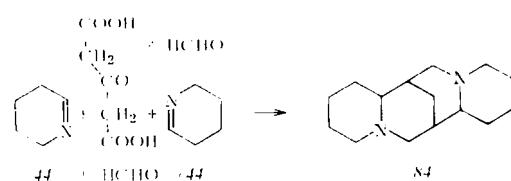
Schöpf [5a] diskutierte aber auch die Möglichkeit einer Biosynthese von Lupinin aus Δ^1 -Piperidein (44) und einem C₅-Körper wie Glutardialdehyd oder dessen α -Carbonsäure.



Für Spartein (84), das aus zwei Chinolizidinringen besteht, wird auch angenommen [4c], daß drei Moleküle Lysin oder zwei Moleküle Lysin und ein Molekül Kettendiaminopimelinsäure (82) an der Synthese beteiligt sind. Die Reaktion ginge über 8-Ketospartein (83) [130].



Eine entsprechende Synthese unter zellmöglichen Bedingungen aus ω -Aminovaleraldehyd, Acetondicarbonsäure und Formaldehyd [131], die zuerst nicht bestätigt werden konnte [132], gelang kürzlich aus Δ^1 -Piperidein (44), Acetondicarbonsäure und Formaldehyd unter veränderten Bedingungen [113b], wobei allerdings nach Reduktion des primär entstandenen Ketons das stereoisomere α -Isospartein entstand.



Eine Laboratoriumssynthese nach den oben genannten biogenetischen Vorstellungen ist ausgeführt worden [133].

Die oxidierten Lupinenalkaloide vom Sparteintyp, wie Lupanin (85), Hydroxylupanin (86) und Anagyrin (87), kann man sich durch Oxydation aus Spartein (84) entstanden denken.

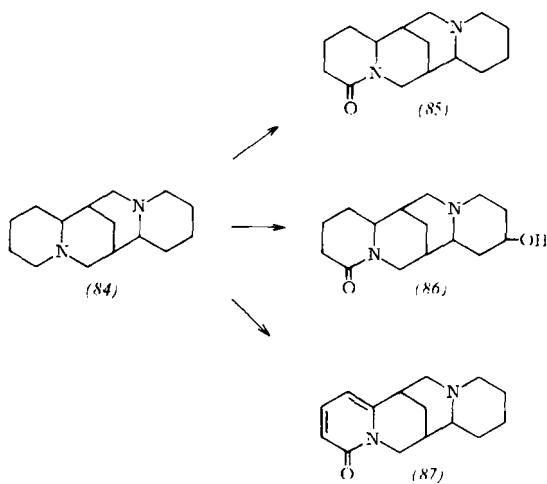
Andererseits werden Cytisin (88), Rhombifolin (89) und eventuell Angustifolin (90) auch als Oxydationsprodukte des Sparteins angesehen [4c]. N-Methylcytisin (91) entsteht sicher in der Pflanze durch Methylierung der sekundären Aminogruppe des Cytisins; diese Umwandlung von Cytisin in Methylcytisin, die in Keimlingen von

[130] E. Wenkert, Experientia 15, 165 (1959).

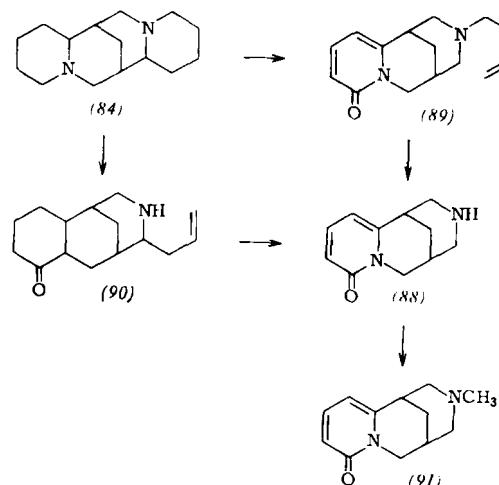
[131] E. Anet, G. K. Hughes u. E. Ritchie, Nature (London) 165, 35 (1950).

[132] *Cl. Schöpf, G. Benz, F. Braun, H. Hinkel u. R. Rokohl, Angew. Chem. 65, 161 (1953).*

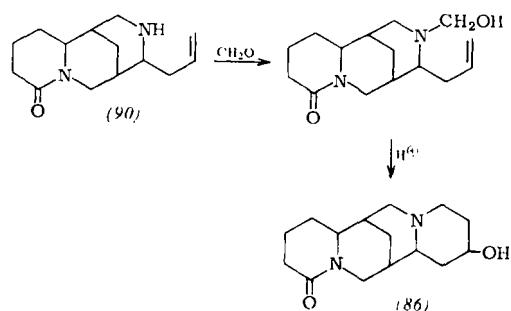
[133] E. E. van Tamelen u. R. L. Foltz, J. Amer. chem. Soc. 82, 2400 (1960).



Cytisus laburnum intensiv verläuft, wird als Entgiftung gedeutet, da junge Pflänzchen zwar empfindlich gegenüber Cytisin, aber unempfindlich gegenüber Methylcytisin sind [134].



Andererseits wird auch der biosynthetische Übergang von Angustifolin in Lupanin diskutiert. Einmal kommen diese beiden Alkaloide vergesellschaftet in *L. angustifolius* und anderen Lupinen vor, und zum anderen läßt sich *in vitro* unter physiologischen Bedingungen Angustifolin (90) mit Formaldehyd in Hydroxylupanin (86) (allerdings in epi-Hydroxylupanin) überführen [135].



Natriumformiat-(¹⁴C) und Formaldehyd-(¹⁴C) als C₁-Körper werden aber von *L. angustifolius* nur in geringem Maße in Hydroxylupanin und Lupanin eingebaut [136].

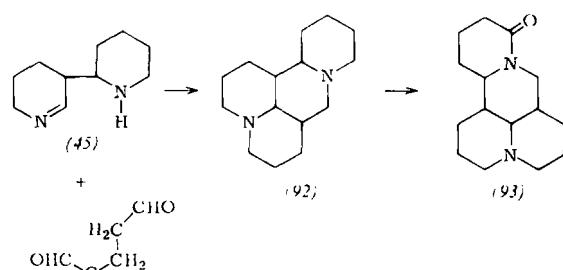
[134] M. Pöhm, Mh. Chem. 90, 58 (1959).

[135] F. Bohlmann u. E. Winterfeldt, Chem. Ber. 93, 1956 (1960).

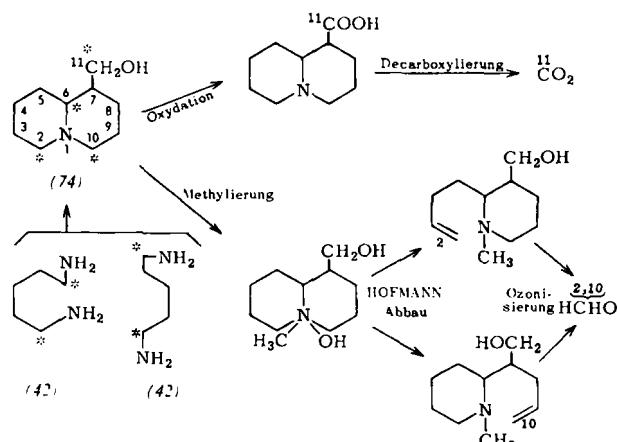
[136] H. R. Schütte, E. Nowacki u. Ch. Schäfer, unveröffentlicht.

Epi-hydroxylupanin ist kürzlich in *Ormosia jamaicensis* nachgewiesen worden [137].

Matrin (93), auch ein Papilionaceenalkaloid, ist ein Isomeres des Lupanins. Schöpf [60, 138] postuliert als Zwischenprodukt für die Matrinbiogenese das Tetrahydroabasin (45), das mit einem Molekül Glutardialdehyd das Matringerüst (92) bilden kann.



Tatsächlich werden Cadaverin-(1.5-¹⁴C) und Lysin-(2-¹⁴C) mit großer Einbaurate in Lupinin [139, 140], Spartein [139–141], Lupanin [142, 143], Hydroxylupanin [142], Matrin [144] und Methylcytisin [144] inkorporiert. Nach Fütterung mit Cadaverin-(1.5-¹⁴C) (42) konnten im Lupinin (74) durch Abbau in den C-Atomen 2, 10 und 11 jeweils $\frac{1}{4}$ der Gesamtradioaktivität des Alkaloides nachgewiesen werden [140, 145], so daß wahr-



scheinlich die mit Sternen gekennzeichnete Aktivitätsverteilung (74) vorliegt; danach kann Lupinin in *Lupinus luteus* aus 2 Molekülen Cadaverin (42) entstehen. Im Spartein (84) wurden 9 von 15 C-Atomen auf ihre Aktivitätsverteilung untersucht [146], wie es im Schema 6 abgeleitet und im Schema 7 dargestellt ist.

[137] C. H. Hassall u. E. M. Wilson, Chem. and Ind. 1961, 1358.

[138] Cl. Schöpf, H. Arm, G. Benz u. H. Krimm, Naturwissenschaften 38, 186 (1951).

[139] H. R. Schütte u. E. Nowacki, Naturwissenschaften 46, 493 (1959).

[140] H. R. Schütte, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 293, 1006 (1960).

[141] F. Jaminet, Pharmazie 15, 194 (1960).

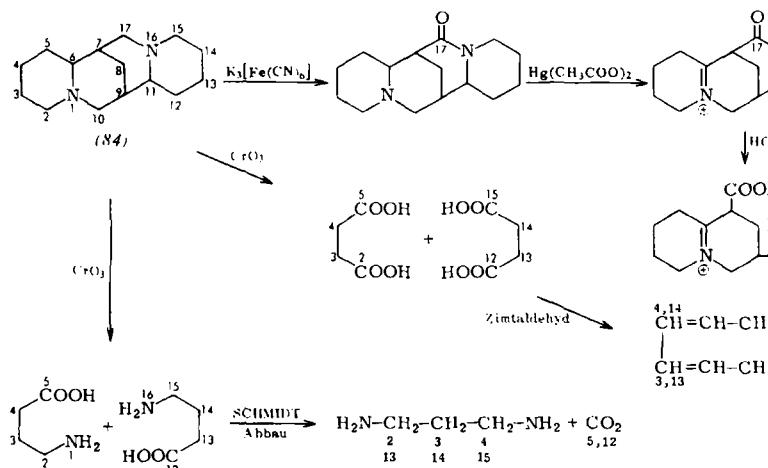
[142] H. R. Schütte, E. Nowacki u. Ch. Schäfer, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 295, 20 (1962).

[143] E. Nowacki u. R. U. Byerrum, Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 58 (1962).

[144] H. R. Schütte, H. Aslanow u. Ch. Schäfer, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 295, 34 (1962).

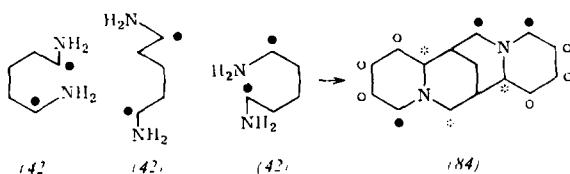
[145] M. Soucek u. H. R. Schütte, Angew. Chem. 74, 901 (1962).

Jedes der drei radioaktiven C-Atome enthielt $\frac{1}{6}$ der Radioaktivität des Sparteins. Bei einer vermutlichen Verteilung der Restaktivität entsprechend den Sternen im Schema 7 kann eine Biogenese von Spartein (84) aus drei Molekülen Cadaverin (42) angenommen werden.



Schema 6. Abbau des Sparteins (84).

Im Lupanin (85) [142], Hydroxylupanin (86) [142] und Matrin (93) [144] wurde nach Cadaverin-(1.5-¹⁴C)-Fütterung die Carbonylgruppe mit Lithiumphenyl und

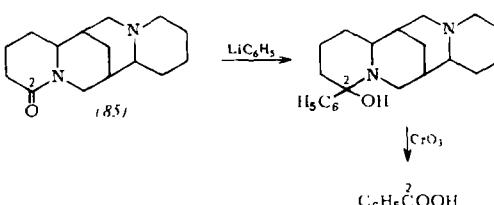


Schema 7. Verteilung der Radioaktivität im Spartein (84) nach der Biosynthese aus Cadaverin-(1.5-¹⁴C) (42).

● radioaktiv; ○ inaktiv; * vermutete Restaktivität

anschließender Oxydation als Carboxylgruppe der Benzoesäure herausgespalten.

Diese Benzoesäure enthielt in jedem Fall $\frac{1}{6}$ der spezifischen Aktivität von Lupanin, Hydroxylupanin und



genese aus drei Molekülen Cadaverin angenommen werden kann. Berücksichtigt man noch die Tatsache, daß Spartein-(³H) in *L. angustifolius* radioaktives Lupanin und Hydroxylupanin und Lupanin-(³H) radioaktives Hydroxylupanin geben können [148], und daß Lupinin-

(¹⁴C) von *L. luteus* bis zu einem gewissen Grad in Spartein umgewandelt wird, während Spartein keine Vorstufe des Lupinins ist [149], so darf nach den bisherigen

Matrin. Auch die nach Chromsäureoxydation analog dem Spartein aus Lupanin erhaltene Bernsteinsäure enthielt $\frac{1}{6}$ der Radioaktivität des ursprünglichen Alkaloides [147], so daß auch für diese Verbindungen eine Bio-

[146] H. R. Schütte, F. Bohlmann u. W. Reusche, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 294, 610 (1961).

[147] H. R. Schütte u. Ch. Schäfer, Naturwissenschaften 48, 669 (1961).

Schema 8. Biosynthese der Papilionaceen-Alkaloide.

Kenntnissen das Schema 8 für die Biogenese der Lupinen- und Papilionaceen-Alkaloide aufgestellt werden, wobei jedoch noch unklar ist, ob die Stufe des Cadaverins bei der Biosynthese aus Lysin immer durchschritten werden muß.

Eingegangen am 28. Januar 1963 [A 284]

[148] H. R. Schütte, E. Nowacki, H. P. Kovacs u. H. W. Liebisch, Arch. Pharmaz., Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 296 (1963), im Druck.

[149] H. R. Schütte, Atompraxis 7, 91 (1961).