

Biosynteza alkaloidów tropanowych I. Esteryfikacja tropiny i kwasu tropowego

Biosynthesis of tropane alkaloids *I. Esterification of tropine with tropic acid*

J. ANDRZEJCZUK i J. KACZKOWSKI

Liczne prace nad biosyntezą alkaloidów tropanowych, będących estrami pochodnych tropanu i kwasów organicznych, ograniczały się głównie do badań nad tworzeniem się pierścienia tropanowego (Robinson 1917, Hegnauer 1959, Clarke i Mann 1959). Jednakże proponowane schematy nie zostały w całości dowiedzione eksperymentalnie. Również zagadnienie biosyntezy kwasu tropowego, związku występującego w głównych alkaloidach tej grupy, dotychczas nie zostało wyjaśnione mimo szeregu prac wykonanych w tym kierunku (Leete 1960, Goodeve i Ramstad 1961, Jindra et al. 1960).

Procesem esteryfikacji wymienionych związków do alkaloidów tropanowych zajęli się Romeike (1959), Jindra (1960) i Kączkowski (1959). Romeike w doświadczeniach z *Datura ferox*, której podawała skopinę i kwas tropowy uzyskała znaczne przyrosty skopolaminy. Jindra w badaniach in vitro, po długotrwałej inkubacji wyciągu *Datura stramonium* z mieszaniną tropiny i kwasu tropowego, uzyskiwał na chromatogramach plamy odpowiadające hyoscyjaminie z równoczesnymi ubytkami kwasu tropowego. Wreszcie Kączkowski karmiąc rośliny *Datura stramonium* mieszaniną tropiny i kwasu tropowego uzyskiwał w szeregu doświadczeń przyrosty sumy alkaloidów. Ponieważ dotychczasowe wyniki nie stanowią dostatecznego dowodu na istnienie omawianej reakcji esteryfikacji w roślinach syntetyzujących alkaloidy tropanowe, w niniejszej pracy zajęto się szczegółowym przebadaniem tego zagadnienia.

MATERIAŁ I METODY

Ponieważ w licznych badaniach dostatecznie udowodniono, że proces biosyntezy alkaloidów tropanowych zachodzi głównie, jeśli nie jedynie, w korzeniach roślin z rodzaju *Datura*, jako materiału doświadczalnego

użyto sterylnych kultur korzeniowych *Datura metel* L. Hodowlę kultur korzeniowych prowadzono w 100 ml kolbach stożkowych z szeroką szyjką na pożywce według Robbinsa i Bartley-Schmidta (1938) stosując 2% dodatek chemicznie czystej sacharozy. pH pożywki doprowadzano każdorazowo do 4,8—5,2. Wodę do pożywki destylowano 3-krotnie z aparatu szklanego (1. znad alkalicznego nadmanganianu, 2. znad wodorotlenku baru i 3. bez dodatku odczynników).

W ten sposób przygotowaną pożywkę rozlewano do kolb w ilości po 40 ml i sterylizowano w autoklawie pod ciśnieniem 2 atmosfer przez około 30 minut. W celu wyhodowania jednorodnego materiału nasiona *Datura metel* sterylizowano 1% wodą bromową przez 20 minut i podkiełkowano w warunkach jałowych. Odcięty wierzchołek korzenia długości około 8—10 mm przenoszono na pożywkę i po intensywnym jego rozgałęzieniu (3—4 tygodnie) wierzchołki wzrostu bocznych korzeni przenoszono do nowych kolb z pożywką. Kolby z korzeniami przetrzymywano w termostacie o temperaturze 28°. Do doświadczeń używano korzeni wyhodowanych z jednego nasienia, rozmnożonych w kolbach przez kilkakrotne pasażę. Korzenie dokarmiano mieszaniną tropiny i kwasu tropowego, względnie samą tropiną. Zawartość poszczególnych alkaloidów w próbach karmionych porównywano z ich zawartościami w próbach kontrolnych, hodowanych na pożywce bez dodatku wymienionych związków.

Dokarmianie przeprowadzano w następujący sposób: w kolbach stożkowych na 25 ml przygotowywano po 10 ml pożywki różniącej się od wyżej opisanej dwukrotnie mniejszą zawartością sacharozy. Do pożywek przeznaczonych do prób karmionych wprowadzano tropinę w ilości 1,7 μ moła/kolbę (0,25 mg) i kwas tropowy w ilości 1,8 μ moła/kolbę (0,3 mg) bądź tylko tropinę w podanej ilości. Tak przygotowane pożywki wyjaławiano w aparacie Kocha dwukrotnie po 45 minut w temp. 100°. Znad dobrze wyrosniętych białych korzeni usuwano w jałowych warunkach starą pożywkę i wlewano nową. Mała objętość nowej pożywki miała na celu ułatwienie dostępu powietrza do korzeni, a obniżenie stężenia sacharozy — ułatwienie włączania przez korzenie związków użytych do karmienia. Korzenie przetrzymywano w termostacie w temp. 28° w czasie od 6 godz do 10 dni, zwanym w dalszym opisie czasem inkubacji.

Doświadczenia, w których zastosowano ilości tropiny i kwasu tropowego dwukrotnie mniejsze lub dwukrotnie większe, nie wykazały żadnego efektu lub nawet wykazały obniżenie zawartości poszczególnych alkaloidów. Po odpowiednim czasie próby karmione i kontrolne (stanowiące po 12 do 20 kolb z korzeniami) pobierano do analizowania. Korzenie przemywano kilkakrotnie wodą i suszono w temp. 50—60°; pożywkę również zbierano i po oczyszczeniu oznaczano w niej zawar-

tość alkaloidów. Sucha masa korzeni w poszczególnych próbach wahała się w granicach 80—150 mg. Wysuszone korzenie rozcierano z kilkakrotną ilością węgla sodowego i ekstrahowano chloroformem w aparacie Soxhletta w ciągu około 12 godz. Surowy wyciąg alkaloidów przenoszono do rozdzielacza i oczyszczano według Kączkowskiego i Reifera (1961). Alkaloidy zawarte w oczyszczonym wyciągu chloroformowym rozdzielano chromatograficznie według Romeike (1952), a ich zawartość oznaczano po elucji z chromatogramów metodą Kączkowskiego i Reifera (1961). W szeregu przypadków sumę alkaloidów oznaczano w wyciągu chloroformowym metodą Reifera i Buchowicza (1955). Spośród uzyskanych z rozdziału alkaloidów oznaczano hyoscyjamine, skopolamine oraz nieznany alkaloid nazwany X, układający się w stosowanej fazie w pozycji o R_f około 0,35. Zawartość wszystkich trzech alkaloidów odczytywano z krzywej wzorcowej dla hyoscyjaminy i skopolaminy.

WYNIKI

Wykonano dwie serie doświadczeń:

1. Korzenie karmiono tropiną i kwasem tropowym równocześnie w ilościach w przybliżeniu równoważnych stechiometrycznie,
2. Korzenie karmiono tropiną.

W przytoczonych poniżej tablicach wyników doświadczeń obu serii zestawiono zawartości poszczególnych alkaloidów i ich sumy w mikrogramach w odniesieniu do 100 mg suchej masy korzenia *Datura metel* oraz procentowe ich przyrosty w próbach karmionych w stosunku do prób kontrolnych.

Wyniki I serii doświadczeń przedstawione są w tabelach 1, 2, 3 i 4. W tabelach tych *T* oznacza próby karmione, a *K* — próby kontrolne.

W tabelach 5 i 6 zestawiono wyniki doświadczeń, w których korze-

Tabela 1 — Table 1

Doświadczenie wstępne z czasem inkubacji 6 dni. *T* — próby karmione tropiną w ilości 1,7 μm /kolbę i kwasem tropowym w ilości 1,8 μm /kolbę, *K* — próby kontrolne

Preliminary experiments. Time of feeding — 6 days. *T* — samples fed with tropine in amount of 1,7 μm . per root and tropic acid in amount of 1,8 μm . per root, *K* — control samples

Alkaloidy	I			II		
	<i>T</i>	<i>K</i>	% przyrostu	<i>T</i>	<i>K</i>	% przyrostu
Skopolamina	707	480	+47	270	310	— 13
Alkaloid X	711	235	+202	510	155	+229
Hyoscyjamina	190	173	+ 9.8	170	149	+ 14
Suma	1608	888	+ 81	950	614	+ 55

Tabela 2 — Table 2

Doświadczenie dynamiczne z czasem inkubacji 3 i 6 dni

Symbole jak w tabeli 1

Dynamic experiment. Times of feeding 3 and 6 days

Symbols as in table 1

Alkaloidy	3 dni			6 dni		
	<i>T</i>	<i>K</i>	% przyrostu	<i>T</i>	<i>K</i>	% przyrostu
Skopolamina	470	424	+ 10	371	336	+ 9.4
Alkaloid X	380	—		332	200	+ 66
Hyoscyjamina	482	232	+108	114	144	—20,8
Suma	1332	655	+103	817	680	+ 20

Tabela 3 — Table 3

Doświadczenie dynamiczne z czasem inkubacji 3 i 10 dni

Symbole jak w tabeli 1

Dynamic experiment. Times of feeding 3 and 10 days

Symbols as in table 1

Alkaloidy	3 dni			10 dni		
	<i>T</i>	<i>K</i>	% przyrostu	<i>T</i>	<i>K</i>	% przyrostu
Skopolamina	344	463	— 35	475	408	+ 16.4
Alkaloid X	300	17	+1665	170	72	+136
Hyoscyjamina	590	422	+ 40	66	50	+ 32
Suma	1234	892	+ 38	711	530	+ 34

Tabela 4 — Table 4

Doświadczenie dynamiczne z czasem inkubacji 1 i 4 dni

Symbole jak w tabeli 1

Dynamic experiment. Times of feeding 1 and 4 days

Symbols as in table 1

Alkaloidy	1 dzień			4 dni		
	<i>T</i>	<i>K</i>	% przyrostu	<i>T</i>	<i>K</i>	% przyrostu
Skopolamina	597	431	+ 38	648	703	— 8
Alkaloid X	665	330	+100	601	372	+ 60
Hyoscyjamina	135	117	+ 14	38	0	
Suma	1397	878	+ 59	1287	1075	+ 19

nie karmiono tropiną. W wymienionych tabelach *Tr* oznacza próby karmione, a *K* — próby kontrolne.

W doświadczeniach obu serii, przy karmieniu tropiną i kwasem tropowym lub tylko tropiną, w większości przypadków uzyskano przyrosty

poszczególnych alkaloidów w stosunku do prób kontrolnych. Przyrosty te wahały się dla hyoscyjaminy w granicach od 10 do 100%, dla skopolaminy od 10 do 40% oraz dla alkaloidu X od 60 do ponad 600%. Najregularniejsze przyrosty obserwowano w przypadku alkaloidu X, gdyż wystąpiły we wszystkich analizowanych przypadkach, a najmniej regularne były przyrosty skopolaminy, gdyż aż w 4 przypadkach na 12 nie stwierdzono tych przyrostów, a nawet niewielkie spadki.

Tabela 5 — Table 5

Doświadczenie wstępne z czasem inkubacji 6 dni

Tr — próba karmiona tropiną w ilości 1,7 μ m/kolbę,*K* — próba kontrolna

Preliminary experiment. Time of feeding 6 days

Tr — sample fed with tropine in amount of 1,7 μ m per root,*K* — control sample

Alkaloidy	<i>Tr</i>	<i>K</i>	% przyrostu
Skopolamina	316	304	+ 4
Alkaloid X	603	80	+653
Hyoscyjamina	173	117	+ 48
Suma	1092	501	+118

Należy zwrócić uwagę na różnice występujące w wynikach uzyskanych w poszczególnych doświadczeniach, mimo stosowania w nich identycznych warunków. Przypuszczalnie wynikało to z faktu, że poszcze-

Tabela 6 — Table 6

Doświadczenie dynamiczne z czasem inkubacji 1, 2 i 4 dni

Symbole jak w tabeli 5

Dynamic experiment. Times of feeding 1, 2 and 4 days

Symbols as in table 5

Alkaloidy	1 dzień			2 dni			4 dni		
	<i>Tr</i>	<i>K</i>	% przyrostu	<i>Tr</i>	<i>K</i>	% przyrostu	<i>Tr</i>	<i>K</i>	% przyrostu
Skopolamina	330	364	+10	619	552	+12	752	590	+26
Alkaloid X	727	269	+170	1139	493	+191	981	320	+206
Hyoscyjamina	302	126	+60	175	184	—5	214	194	+11
Suma	1259	759	+65	1933	1229	+57	1947	1104	+76

gólne doświadczenia były przeprowadzane na różnych pasażach korzeni, a nawet na różnych szczepach. Pewne znaczenie mogły mieć również przypadkowe, szkodliwe czynniki zewnętrzne, trudne do uniknięcia w pracy laboratoryjnej.

DYSKUSJA

Celem niniejszej pracy miało być dostarczenie dowodów na przebieg reakcji esteryfikacji tropiny i kwasu tropowego do hyoscyjminy. We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach uzyskano znaczne przyrosty zawartości alkaloidów w próbach karmionych w stosunku do kontrolnych, wahające się w granicach od 20 do 100%.

Dodatek do pożywki tropiny i kwasu tropowego razem, względnie tylko tropiny, umożliwiał korzeniom przeprowadzenie ostatniej reakcji w cyklu biosyntezy alkaloidów tropanowych, czego efektem był przyrost zawartości tych związków. Dlatego też na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że w korzeniach *Datura metel* przebiega reakcja esteryfikacji tropiny i kwasu tropowego. Uzyskane wyniki stanowią więc dodatkowy argument przemawiający za istnieniem reakcji esteryfikacji w organizmach roślinnych, syntetyzujących alkaloidy tropanowe. Jednakże dowód ostateczny można by uzyskać w przekonujących doświadczeniach enzymatycznych *in vitro*.

Co prawda największe przyrosty obserwowano w przypadku alkaloidu X, na którego charakter estrowy brak dotychczas dowodów. Nieznana budowa nie upoważnia do włączania tego związku do sumy alkaloidów powstałych na skutek reakcji esteryfikacji. Analiza wyników wykazuje jednakże, że suma zawartości hyoscyjminy i skopolaminy w 10 przypadkach na 12 na skutek karmienia wzrastała w granicach od 40 do 230 μg , podczas gdy w dwóch pozostałych przypadkach stwierdzono spadki powyższej sumy o około 20 μg na 100 mg suchej masy korzenia. Analiza ta potwierdza więc wyżej sformułowany wniosek o przebiegu reakcji esteryfikacji w analizowanych organach *Datura metel*.

Omówione wnioski są w zasadzie zgodne z nielicznymi wynikami, uzyskanymi przez Romeike (1959) i Jindrę (1960). Ten ostatni przeprowadził wprawdzie badania nad esteryfikacją *in vitro*, lecz reakcja ta przebiegała z bardzo niską wydajnością, a zbyt małe różnice w manometrycznych pomiarach ubytków kwasu tropowego nie są dostatecznie przekonujące.

Ważnym i zarazem ciekawym faktem w przeprowadzonych doświadczeniach było wspomniane uprzednio stwierdzenie występowania w korzeniach *Datura metel* nieznanego alkaloidu X, o R_f około 0,35 w stosowanym w niniejszych badaniach układzie. Szczególnie duże ilości tego związku stwierdzono w próbach karmionych, gdzie przyrosty jego w stosunku do kontroli dochodziły do kilkuset procent. Fakt ten pozwala przypuszczać, że alkaloid X leży w łańcuchu biosyntezy na drodze pomiędzy tropiną i hyoscyjminą. Na potwierdzenie podanego wniosku można również przytoczyć badania Kączkowskiego (1961) nad włączaniem ^{14}C -octanów do poszczególnych alkaloidów, podczas ich bio-

syntezy w korzeniach *Datura metel*. Po 4 dniach inkubacji autor uzyskał w alkaloidzie X najwyższą radioaktywność właściwą, co świadczyłoby o pierwszeństwie jego powstawania w stosunku do hyoscyjaminy, a tym bardziej skopolaminy.

Pewne przypuszczenie na temat budowy alkaloidu X można by po- dać na podstawie faktu, że związek ten nie oznacza się metodą Reife- ra i Buchowicza (1955). Nie przytoczone w niniejszej pracy ozna- czenia porównawcze sumy alkaloidów, wykonane w szeregu przypadków wymienioną metodą, dały wartości, odpowiadające w przybliżeniu sumie zawartości skopolaminy i hyoscyjaminy, oznaczonych metodą Kąc- kowskiego i Reifera (1961). Mogłoby to świadczyć, iż cząstecz- ka tego alkaloidu nie zawiera kwasu tropowego.

Nieznamość struktury alkaloidu X była powodem odczytywania jego ilości z dowolnie przyjętej krzywej wzorcowej dla hyoscyjaminy i skopolaminy. Może to nie odpowiadać absolutnym ilościom tego związku w badanych próbach, w związku z czym sumy wykazane w przyto- czonych tabelach, jak również procenty przyrostu sum alkaloidów na- leży traktować z pewnym przybliżeniem.

W doświadczeniach długotrwałych (do 10 dni) zaobserwowano inte- resujący fakt spadku zawartości poszczególnych alkaloidów w próbach po 6 i 10 dniach karmienia, w stosunku do ich zawartości po 3 dniach. Zjawiska tego nie można tłumaczyć wzajemnymi przemianami alkalo- idów, ponieważ suma ich również znacznie maleje. A ponieważ nie stwierdzono również działania drobnoustrojów, jedynym tłumaczeniem wydaje się przemiana tych substancji w ogólnym metabolizmie do związków o charakterze niealkaloidowym.

Według badań Romeike (1956, 1958, 1959, 1960) skopolamina jest wtórnym alkaloidem w stosunku do hyoscyjaminy i tworzy się przez epoksydację tej ostatniej. Proces ten zdaniem wymienionej autorki mo- że przebiegać tylko w organach nadziemnych *Datura metel*. Dane przy- toczone w niniejszej pracy wykazują na ogół przyrosty zawartości sko- polaminy w próbach karmionych, w stosunku do kontrolnych, a w do- świadczeniach dynamicznych obserwowano przyrosty tego alkaloidu w czasie, zarówno w próbach karmionych, jak i kontrolnych. Podobne przyrosty obserwowano również w badaniach Kargoli i innych (1962). Fakty te sugerowałyby przebieg procesu epoksydacji hyoscyjaminy również i w korzeniach *Datura metel*.

Panu Profesorowi Dr. I. Reiferowi autorzy składają serdeczne podzię- kowanie za cenne rady udzielane w czasie wykonywania niniejszej pracy.

SUMMARY

Root cultures of *Datura metel* fed with tropine and tropic acid showed significant increases of tropane alkaloids as compared with control roots. This fact can be considered as the further proof, that the esterification of these two compounds takes place in plants producing tropane alkaloids.

The unknown alkaloid X was found in all samples of investigated roots. This base appeared in larger amounts in roots fed, than in control ones. In dynamic experiments its increase was the largest during the first three days of investigation. This fact indicates that this base can be a precursor of hyoscyamine and is probably produced directly from tropine.

The data obtained suggest the possibility of the reaction of epoxydation of hyoscyamine to scopolamine also in roots of *Datura metel*.

Department of Biochemistry
Warsaw Agricultural University

LITERATURA

- Clarke A. J., Mann P. J. G., 1959, Plant Enzyme Reactions Leading to the Formation of Heterocyclic Compounds, *Biochem. J.* 71: 596—609.
- Goodeve A. M., Ramstad E., 1961, Tryptophan, Precursor of Tropic Acid in *Datura stramonium*, *Experientia* 17: 124—125.
- Hegnauer R., 1959, Chemotaxonomische Beschouwingen, 8. Nicotine en Anabasine en de Alkaloidfamilies van de Ornithine en van de Lysine, *Pharm. Tijdschr. voor België* 36: 35—44.
- Jindra A., Leblova S., Sipal Z., Čihák A., 1960, Beitrag zur Kenntnis der Biosynthese von Tropanalkaloiden, *Planta Med.* 8: 44—48.
- Kargol Z., Andrzejczuk J., Kączkowski J., 1962, Biosynteza alkaloidów tropanowych, II. Rola putrescyny — (w przygotowaniu).
- Kączkowski J., 1959, Badania nad biologicznym rozkładem alkaloidów tropanowych w powiązaniu z drogami ich biosyntezy, Praca doktorska wykonana w Katedrze Biochemii SGGW.
- Kączkowski J., 1961, Dane nie opublikowane.
- Kączkowski J., Reifer I., 1961, Nephelometric Microdetermination of Tropane Alkaloids, *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol.* 11: 247—250.
- Leete E., 1960, The Biogenesis of Tropic Acid and Related Studies on the Alkaloids of *Datura stramonium*, *J. Amer. Chem. Soc.* 82: 612—614.
- Munier R., Macheobeuf M., 1951, Modifiziertes Dragendorff Reagenz, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33: 846—856.
- Reifer I., Buchowicz J., 1955, Mikrometoda oznaczania alkaloidów tropanowych w materiale roślinnym, *Acta Biochim. Polon.* 2: 187—198.
- Robbins W. J., Bartley-Schmidt M. A., 1938, Growth of Excised Roots of the Tomato, *Bot. Gaz.* 99: 671—728.
- Robinson R., 1917, The Structural Relations of Natural Products, *J. Chem. Soc.* 111: 762—780.
- Romeike A., 1952, Beitrag zur papierchromatographischen Trennung von Alkaloiden, *Pharmazie* 7: 496—497.

- Romeike A., 1956, Ueber die Mitwirkung des Sprosses bei der Ausbildung des Alkaloidspektrums. Epoxydbildung beim Hyoscyamine durch *Datura ferox*, Flora 143: 67—86
- Romeike A., 1958, Hyoscyamine Epoxydierung bei einer Artkreuzung von *Datura*, Planta Med. 6: 426—427.
- Romeike A., 1959, Ueber die Mitwirkung des Sprosses bei der Ausbildung des Alkaloidspektrums. II. Bildungsstätte und Biogenese des Scopolamins in *Datura ferox* L., Flora 148: 306—320.
- Romeike A., 1960, Die Rolle von Spross und Wurzel bei der Umwandlung des Hyoscyamins in verschiedenen *Datura*-Arten, Planta Med. 8: 491—496.