ACTA SOCIETATIS
BOTANICORUM POLONIAE
Vol. XXXIV — nr 2
1965

Enzymatyczne przemiany niektórych alkaloidów *Lupinus albus in vitro* i *in vivo*

Część II. Przemiany *in vivo**

Enzymatic transformations in vitro and in vivo of alkaloids of Lupinus albus

Part. II. Transformations in vivo

E. NALBORCZYK

W przeprowadzonych *in vitro* badaniach (Nalborczyk 1964) stwierdzono, że charakterystyczne dla gatunku *Lupinus albus* alkaloidy — sparteina, lupanina, hydroksylupanina i angustifolina — w obecności enzymatycznych ekstraktów z roślin zarówno gorzkiej, jak i pastewnej odmiany tego gatunku ulegają przekształceniom do innych zasad. W przypadku zastosowania w charakterze substratu sparteiny i lupaniny, powstałe *in vitro*, zasady zidentyfikowano jako dehydrosparteinę i dehydrolupaninę. Również produkty enzymatycznych przekształceń hydroksylupaniny i angustifoliny stanowią najprawdopodobniej odpowiednie dehydroformy tych zasad. W odróżnieniu od wyników badań *in vivo* (Birecka, Sebyła, Nalborczyk 1959; Birecka, Rybicka, Szymańska 1960; Birecka, Sebyła 1960) produktem przemiany określonego alkaloidu *in vitro* — przy zastosowaniu odpowiednio oczyszczonego preparatu enzymatycznego — była tylko jedna zasada.

Dotychczasowe dane (niepełne) dotyczące składu jakościowego alkaloidów badanego gatunku nie dawały odpowiedzi na pytanie, czy w roślinach występują również zasady analogiczne do powstałych *in vitro* oraz jaka może być ich ewentualna rola w przemianach tych związków. Zagadnienia te były przedmiotem niniejszych badań. Ponieważ zaistniała konieczność zastosowania do badań alkaloidów o wysokiej radioaktywności właściwej, w pracy uwzględnione zostały zagadnienia dotyczące biosyntezy tych zasad z ^{14}C-kadaweryny i ^{3}H-sparteiny.

---

* Część niniejszych badań wykonano w ramach współpracy z Wydziałem Nauki Departamentu Rolnictwa USA.

METODYKA BADAŃ

A. Otrzymywanie znakowanych ^{14}C i ^{3}H alkaloidów łubinu białego

1. Synteza ^{14}C-kadaweryny. Syntezę w skali 2mM przeprowadzono według Mothesa i in. (Mothes, Schütte, Simon, Weygand 1959) z nitrylu kwasu ω-bromomasłowego i $K^{14}CN$ otrzymanego na drodze syntezy z Ba $^{14}CO_3$ (Murray, Williams 1958). Uzyskana wydajność reakcji wyniosła 62% teoretycznej wydajności w stosunku do zastosowanej ilości $Ba^{14}CO_3$, radioaktywność właściwa 2 mC/mM. Oznaczona temperatura topnienia chlorowodorku kadaweryny odpowiadała 243°C. Chromatograficznie w układzie rozwijającym n-butanol:kwas octowy:woda (R_f kadaweryny 0,20) nie stwierdzono obecności innych związków *.

2. Synteza ^{3}H-sparteiny **. Do probówki ze szkła Supremax (dł. 180 mm, ⌀ 14 mm) wprowadzono 25 mg chlorowodorku sparteiny, 25 mg świeżo zredukowanego katalizatora Adamsa i 0,5 ml THO. Po zamrożeniu mieszaniny w ciekłym azocie i usunięciu powietrza, probówkę zatopiono w połowie jej długości. Otrzymaną ampułkę umocowano na mieszadle wahadłowym i umieszczono w łaźni wodnej o temp. 100°C na okres 48 godz., po czym zawartość ponownie zamrożono. THO oddestylowano dodając kolejno 4 × 1 ml H_2O. Sparteinę rozpuszczono w 5 ml 0,5 n NaOH, ogrzewano 10 min. w temp. 95°C i po oziębieniu do 4°C przenoszono do chloroformu. Chloroform oddestylowano pod próżnią, dodano 5 ml 0,5 n HCl i ponownie ogrzewano. Ochłodzony roztwór alkalizowano i ^{3}H-sparteinę ekstrahowano chloroformem. Chloroform oddestylowano, dodano 5 ml 0,5 n NaOH; i opisaną wyżej operację powtarzano pięciokrotnie. Każdorazowo mierzono aktywność całkowitą ekstraktu chloroformowego (na płytkach z polerowanej stali nierdzewnej — licznikiem 2π, oraz po spaleniu próbki — licznikiem wewnętrznego napełnienia). Sparteinę poddano dwukrotnej krystalizacji z kwasem pikrynowym, po czym przeprowadzono w postać chlorowodorku. Otrzymano 9,1 mg tej zasady o ogólnej aktywności 1,25 mC. Jej aktywność właściwa oznaczona po krystalizacji, destylacji i rozdziale chromatograficznym była jednakowa. Brak zanieczyszczeń radioaktywnych w sparteinie potwierdził wyniki zastosowanego rozcieńczenia izotopowego.

3. Biosynteza alkaloidów łubinu białego po wprowadzeniu do roślin ^{14}C-kadaweryny i ^{3}H-sparteiny. Do badań użyto 40 roślin łubinu białego odmiany gorzkiej 'Czechnicka' w wieku 28 dni (początek butonizacji).

---

* Szczegółowy opis przebiegu syntezy ^{14}C-kadaweryny, jak również szeregu podanych niżej operacji metodycznych patrz: E. Nalborczyk: Praca doktorska, 1962, Biblioteka Główna SGGW.

** Metodę znakowania sparteiny trytem opracowano w oparciu o dane w literaturze dotyczące znakowania tym izotopem innych związków organicznych (Murray, Williams 1958; Nalborczyk 1962).

W części roślin oznaczono ilościowo zawartość poszczególnych frakcji alkaloidów na początku i w końcu doświadczenia. Do 10 roślin wprowadzono przez ogonek liścia środkowego po 0,5 ml 0,1 M wodnego roztworu ^{14}C-kadaweryny o aktywności całkowitej 1 mC. W analogiczny sposób do następnych 10 roślin wprowadzono 5 mg ^{3}H-sparteiny o łącznej aktywności 687,5 μC. Rośliny wstawiono na 10 dni do kamery z pleksiglasu umieszczonej na otwartym powietrzu. Przepuszczano przez nią strumień powietrza w sposób ciągły — przy użyciu pompy wodnej. Po 10 dniach rośliny zamrożono i w tym stanie rozdrobniono. Ekstrakcję alkaloidów przeprowadzono na zimno metanolem. Metanol oddestylowano na zimno w okrągłodennej kolbie ewaporatora obrotowego. Pozostałość przedmuchiwano parami HCl i przemyto eterem naftowym. Po usunięciu eteru, zawartość kolbki rozpuszczono w wodzie, alkalizowano i ekstrahowano chloroformem, który następnie po wysyceniu parami HCl oddestylowano. Alkaloidy — po uprzednim oznaczeniu ilościowym (Reifer, Niziołek 1957) — rozdzielono na kolumnie z celulozy w układzie rozwijającym n-butanol:0,1 n HCl (Birecka, Nalborczyk 1961). Frakcje wykazujące obecność zasady (lub zasad), o jednakowym R_f łączono a alkaloidy poddano sublimacji (lub destylacji) przy 10^{-3} T. Ich ilości użyte do sublimacji wynosiły zależnie od badanej frakcji od 50 μg do 20 mg. Zebrane frakcje poddano dalszemu oczyszczaniu według schematu:

Lupanina. Alkaloid dwukrotnie krystalizowano z heksanu i badano stopień jego zanieczyszczenia substancjami radioaktywnymi metodą rozcieńczenia izotopowego.

Frakcja hydroksylupaniny. W celu uwolnienia się od ewentualnie występującej w niej dehydrolupaniny, przeprowadzono czterokrotną sublimację do temp. 145°C przy 10^{-3} T. 100 μg frakcji po każdej sublimacji redukowano wodorem i badano na zawartość dehydrolupaniny (Nalborczyk 1961).

Frakcja multifloryny. W zakresie temperatur 145—165°C przeprowadzono w odstępach 5°C frakcjonowaną destylację w próżni i oznaczono aktywności właściwe zasad poszczególnych frakcji.

Angustifolina i estry hydroksylupaniny. Obie frakcje dwukrotnie destylowano odpowiednio do 165 i 170°C przy 10^{-3} T.

Sparteina. W doświadczeniu z biosyntezą ^{3}H alkaloidów, eluat z kolumny wykazujący obecność tej zasady rozcieńczano 15 mg sparteiny nie znakowanej. Po przedestylowaniu do 98°C oznaczono jej aktywność.

Wszystkie pomiary radioaktywności wykonano posługując się licznikiem przepływowym FH-51. Alkaloidy o wysokiej aktywności właściwej (głównie alkaloidy znakowane trytem) rozcieńczano przed oznaczeniem znaną ilością analogicznych związków nieaktywnych. Grubość warstwy radioaktywnego preparatu nie przekraczała w przypadku ^{14}C — 500 μg/cm^2, a w przypadku ^{3}H — 50 μg/cm^2. Wydajność liczenia wyno-

siła 35% (^{14}C) lub 2,2% (^{3}H). Po pomiarze aktywności alkaloidy wymywano z miseczek 0,01 n HCl i oznaczano ich ilości. Wszystkie oznaczenia wykonywano co najmniej w trzech powtórzeniach. Odchylenia w wynikach równoległych oznaczeń mieściły się w granicy ± 5%.

B. Przemiany *in vivo* sparteiny i lupaniny

1. Przeprowadzono następujące próby identyfikacji dehydrosparteiny i dehydrolupaniny w roślinach po wprowadzeniu sparteiny i lupaniny:

Dehydrosparteina. Do 50 roślin odmiany pastewnej łubinu białego (odm. 'Przebędowska Średniowieczna') w fazie butonizacji wprowadzono przez ogonki liściowe po 15 mg sparteiny (sól siarczanowa). Rośliny zebrano po 14 dniach, alkaloidy ekstrahowano metanolem i rozdzielono na kolumnie jak wyżej. Frakcję o R_f dehydrosparteiny przepuszczono ponownie przez kolumnę stosując układ rozwijający aceton:1 n HCl. Po oddestylowaniu acetonu pozostałość zalkalizowano i w atmosferze azotu przeniesiono do chloroformu, który następnie usunięto. Alkaloid oddestylowano przy 10^{-3}T do temp. 120°C i porównywano jego właściwości chromatograficzne, spektralne i chemiczne z odpowiednimi właściwościami dehydrosparteiny otrzymanej jako produkt enzymatycznych przemian sparteiny *in vitro*. Część frakcji krystalizowano w postaci pikrynianu wraz ze znakowaną trytem dehydrosparteiną (w stosunku 1:1) i oznaczano aktywności właściwe alkaloidu wykrystalizowanego w postaci soli oraz alkaloidu pozostałego w roztworze macierzystym.

Dehydrolupanina. Do 3 roślin łubinu pastewnego wprowadzono jak wyżej 2 mg znakowanej ^{14}C-lupaniny (chlorowodorek) o ogólnej aktywności $8,6 \times 10^4$ imp/min. Rośliny zebrano po 2 godz. i wyizolowane alkaloidy rozdzielono chromatograficznie. Frakcję o R_f dehydrolupaniny eluowano etanolem, oznaczono jej radioaktywność, po czym poddano redukcji wodorem w 2n HCl nad PtO_2. Produkty redukcji (po dodaniu małych ilości sparteiny) rozdzielono chromatograficznie i badano ich radioaktywność.

2. Produkty przemian ^{3}H-sparteiny, ^{14}C-lupaniny oraz ich dehydroform w roślinach. Do roślin odmiany pastewnej i gorzkiej *lupinus albus* w wieku 49 dni wprowadzono przez ogonki liściowe ^{3}H-sparteinę, ^{14}C-lupaninę oraz ich znakowane dehydroformy otrzymane enzymatycznie *in vitro* *. Analizowano po 2 rośliny z każdej kombinacji w odstępie 2, 24 i 96 godz. od chwili wprowadzenia alkaloidu. Każdą roślinę analizowano oddzielnie. Sposób ekstrakcji badanego materiału był analogiczny jak w wyżej opisywanych doświadczeniach. Poza alkaloidami badano sumaryczną radioaktywność związków rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w 80% metanolu. Alkaloidy — po oznaczeniu ogólnej ich ilości

* Ilość i radioaktywność wprowadzonych zasad podane zostały w tab. 5 i 7.

i radioaktywności — rozdzielano przy pomocy chromatografii bibułowej (Reifer, Przeździecka, Kleczkowska 1958), eluowano z chromatogramów bezpośrednio na miseczki i ponownie oznaczano ich radioaktywność i ilość. Frakcje o R_f dehydrosparteiny (a także multifloryny i a_x) alkalizowano i przenoszono do chloroformu. Chloroform ogrzewano 3 min. do temperatury wrzenia i następnie oddestylowano *. Alkaloidy sublimowano do temp. 165°C przy 10^{-3}T i oznaczano ich ilość oraz aktywność. Jednocześnie oznaczano aktywność pozostałości po sublimacji. Na podstawie wyników radioaktywności i ilości zasad obecnych we frakcji przed i po sublimacji oznaczano ilość i radioaktywność dehydrosparteiny. Część ekstraktów zawierających radioaktywną lupaninę (z roślin, do których nie została ona wprowadzona) badano metodą rozcieńczenia izotopowego. Frakcję o R_f dehydrolupaniny (i hydroksylupaniny) z roślin, które otrzymały alkaloidy znakowane ^{14}C, poddano redukcji wodorem nad PtO_2. Produkty redukcji rozdzielono chromatograficznie i oznaczono ich radioaktywność. W przypadku analizy ekstraktów z roślin odmiany pastewnej, w celu wykrycia alkaloidów innych frakcji niż lupaniny i hydroksylupaniny, po naniesieniu ekstraktów na chromatogram dodawano nieznakowane alkaloidy wzorcowe (podobnie postępowano przy poszukiwaniu frakcji sparteiny w odmianie gorzkiej). Po rozdziale oznaczano tylko radioaktywność tych frakcji. Radioaktywność ^{3}H-dehydrosparteiny i ^{14}C-dehydrolupaniny oznaczano jak wyżej.

WYNIKI

Po upływie 10 dni przebywania roślin w kamerze przyrost ich świeżej masy wynosił średnio (w przeliczeniu na 10 roślin) 17,6 g, a suma alkaloidów zwiększyła się o 9,3 mg (w tym lupanina 3,6 mg, hydroksylupanina 1,4 mg i pozostałe zasady 4,3 mg). Zawartość poszczególnych alkaloidów i ich radioaktywność w roślinach, do których w charakterze prekursora tych zasad wprowadzono ^{14}C-kadawerynę i ^{3}H-sparteinę, przedstawia tabela 1. Z uzyskanych danych wynika, że aktywności właściwe frakcji lupaniny, angustifoliny i estrów hydroksylupaniny, otrzymane bezpośrednio po ich rozdziale na kolumnie, praktycznie nie uległy zmianie w trakcie dalszego ich oczyszczania. Dodatkowe sprawdzenie stopnia czystości lupaniny znakowanej ^{14}C i ^{3}H metodą rozcieńczenia izotopowego potwierdziło brak radioaktywnych zanieczyszczeń w wyizolowanym związku. W przypadku frakcji hydroksylupaniny ich aktywności właściwe oznaczone bezpośrednio po rozdziale były istotnie wyższe od aktywności stwierdzonych po czterokrotnej resublimacji. Należy zazna-

* Przeprowadzone wstępne próby wykazały, że w tych warunkach dehydrosparteina ulega całkowitemu rozkładowi, a jej produkty nie destylują w zakresie stosowanych temperatur.

Tabela 1 - Table 1

Biosynteza radioaktywnych alkaloidów z ^{14}C-kadaweryny i ^{3}H-sparteiny

Biosynthesis of radioactive alkaloids from ^{14}C-cadaverine and ^{3}H-sparteine

Frakcje alkaloidowe o R_f Alkaloids fractions with R_f of	Ilość alkaloidu w przeliczeniu na 10 roślin (w mg) Alkaloid content per 10 plants (in mg)	Radioaktywność właściwa frakcji po rozdziale na kolumnie (w 10^3 imp/min) Specific radioactivity of the fractions after separation on the column (in 10^3 cpm)	Radioaktywność alkaloidów po zakończeniu oczyszczania (w 10^3 imp/min) Radioactivity of the alkaloids after purification (in 10^3 cpm)		Udział poszczególnych frakcji w ogólnej ilości i radioaktywności alkaloidów (%) Participation of the separately fractions in total content and radioactivity of the alkaloids (in percent)	
			właściwa specific	całkowita total	ilość content	radioaktywność radioactivity
		Prekursor: ^{14}C-kadaweryna		Precursor: ^{14}C-cadaverine		
Lupanina Lupanine	37,47	42,5	43,6	1633,7	59,6	49,3
Hydroksylupanina Hydroxylupanine	6,62	75,2	59,3	392,6	10,5	11,9
Multifloryna Multiflorine	8,41	161,3	119,4	1004,2	13,4	30,3
Angustifolina Angustifoline	1,72	33,6	33,1	56,9	2,7	1,7
Estry hydroksylupaniny Hydroxylupanine esters	8,64	27,0	26,2	226,4	13,8	6,8
Razem - Total	62,86	-	-	3313,8	100,0	100,0
		Prekursor: ^{3}H-sparteina		Precursor: ^{3}H-sparteine		
Lupanina Lupanine	35,11	218,0	210,3	7383,6	61,4	46,8
Hydroksylupanina Hydroxylupanine	5,21	307,6	213,0	1109,7	9,1	7,1
Multifloryna Multiflorine	6,52	859,3	536,9	3500,6	11,4	22,2
Angustifolina Angustifoline	2,14	621,9	613,5	1312,9	3,7	8,3
Estry hydroksylupaniny Hydroxylupanine esters	8,24	302,6	298,2	2457,2	14,4	15,6
Razem - Total	57,22	-	-	15764,0	100,0	100,0

czyć, iż zmniejszanie się aktywności właściwej tych frakcji następowało tylko po pierwszej i drugiej resublimacji, po każdej zaś następnej nie stwierdzono już różnic pod tym względem. Po katalitycznej redukcji wodorem 100 μg hydroksylupaniny, otrzymanej w wyniku czwartej resublimacji, stwierdzono chromatograficznie obecność tylko hydroksysparteiny. Frakcja o R_f multifloryny poddana destylacji do różnych temperatur wykazała również zróżnicowany skład (tab. 2). W obu przypadkach znakowania maksymalna aktywność właściwa przypadała na związki destylujące do 145°C. Destylat uzyskany w tem. 145—150°C także wykazywał aktywność wyższą niż destylaty następne. Na te dwa pierwsze destylaty przypadało w sumie około 5% badanej frakcji. Powyżej 160°C uzyskano już tylko śladowe ilości zasady nie różniącej się pod względem radioaktywności właściwej od frakcji poprzedniej.

Tabela 2 - Table 2

Radioaktywność właściwa zasad o R_f multifloryny (w 10^3 imp/min)

Specific radioactivity of the bases with R_f of multiflorine (in 10^3 cpm)

Rodzaj znakowania The manner of label	Eluat z kolumny (przed destylacją) Eluate from the column (before destilation)	Temperatura destylacji Temperature of the destilation					Eluat z chromatogramu (po destylacji 155-160°C) Eluate from the chromatogram (after destilation 155-160°C)
		do 145°C to 145°C	145-150°C	150-155°C	155-160°C	160°C	
^{14}C	161,3	246,6	156,4	132,0	124,4	127,8	119,4
^{3}H	859,3	5446,1	1191,9	500,4	559,0	535,8	536,9

Zaobserwowanych w przypadku frakcji hydroksylupaniny i multifloryny różnic w aktywności właściwej alkaloidów przed i po oczyszczeniu nie należy traktować jako wynik zanieczyszczeń związkami wyłącznie niealkaloidowymi, w obu bowiem badanych frakcjach mogą występować małe ilości innych niż dominujący alkaloid zasad (Birecka, Nalborczyk 1961). Mimo iż w obu przypadkach różne były zarówno prekursory, jak i sposób ich znakowania, charakter rozmieszczenia aktywności między badanymi frakcjami alkaloidów był podobny. Uzyskane dane (tabela 1) wskazują ponadto, że procentowy udział radioaktywności poszczególnych alkaloidów w stosunku do ich aktywności całkowitej w obu przypadkach kształtuje się podobnie jak procentowy udział ilości badanych alkaloidów w ich zawartości sumarycznej. Stopień inkorporacji znakowanego prekursora w alkaloidy wynosił dla ^{14}C-kadaweryny 0,62—0,70%, a dla ^{3}H-sparteiny 46,7—55,7% (po odjęciu aktywności po-

zostałej w roślinach ^{3}H-sparteiny, która wynosiła 22% w stosunku do aktywności wprowadzonej).

Tabela 3 - Table 3

Zawartość alkaloidów w roślinach kontrolnych i w roślinach którym podano sparteinę

Alkaloid contents in the control plants and in the plants after introduction of sparteine

Alkaloidy o R_f Alkaloids with R_f of	mg w 10 roślinach mg per 10 plants	
	rośliny kontrolne (72,0 g św. masy) control plants (72,0 g fresh weight)	rośliny ze sparteiną (67,6 g św. masy) plants with sparteine (67,6 g fresh weight)
Lupanina Lupanine	1,26	18,7
Hydroksylupanina + dehydrolupanina Hydroxylupanine + dehydrolupanine	0,37	5,14
Ester hydroksylupaniny Hydroxylupanine ester	0,19	2,32
Sparteina Sparteine	0,17	85,44
Multifloryna + a_x + dehydrosparteina Multiflorine + a_x + dehydrosparteine	śl.*	4,25
Angustifolina Angustifoline	śl.*	0,54

*około 20 µg (about 20 µg)

Intensywne przekształcenia sparteiny w inne alkaloidy stwierdzono również w doświadczeniu z roślinami odmiany pastewnej, do których wprowadzono dużą ilość tego alkaloidu w celu zbadania, czy jego przemiany — podobnie jak w doświadczeniach *in vitro* — prowadzą także do powstawania dehydrosparteiny (tabela 3). Na podkreślenie zasługuje bardzo duże zwiększenie ilości lupaniny oraz frakcji hydroksylupaniny i jej estrów. W wyniku doświadczenia uzyskano istotne zwiększenie ilości zasad frakcji o R_f dehydrosparteiny (chromatograficznie analogicznej z zasadą a_x i multifloryną). Frakcja ta, po destylacji przy 10^{-3}T do temp. 120°C, dała żółtoopalizujący olej, ulegający w obecności tlenu szybkiemu rozkładowi. Wydzielona zasada powodowała gwałtowne odbarwianie kwaśnego roztworu $KMnO_4$. Jej R_f w różnych stosowanych układach rozwijających (wg schematu podanego w tab. 1 w publikacji: Nalborczyk 1961) było identyczne z R_f dehydrosparteiny otrzymanej w wyniku enzymatycznych przemian sparteiny *in vitro* i Δ^5-dehydrosparteiny otrzymanej na drodze syntezy chemicznej. Po redukcji wodorem uzyskano związek chromatograficznie odpowiadający sparteinie. W podczerwieni, podobnie jak w przypadku wyżej wymienionych

Tabela 4 - Table 4

Radioaktywność frakcji o R_f hydroksylupaniny i dehydrolupaniny (w imp/min)

Radioactivity of the fractions with R_f of hydroxylupanine and dehydrolupanine (in cpm)

No.	Przed redukcją Before reduction	Po redukcji After reduction	
	Frakcja o R_f hydroksylupaniny i dehydrolupaniny Fraction with R_f of hydroxylupanine and dehydrolupanine	Frakcja o R_f sparteiny Fraction with R_f of sparteine	Frakcja o R_f hydroksysparteiny Fraction with R_f of hydroxysparteine
1	2300	2100	40
2	1450	1520	0
3	2880	2640	0

dehydrospartein, stwierdzono intensywną absorpcję przy 1640 cm^{-1} ($>C=C<$) oraz brak maksimów absorpcji charakterystycznych dla $>C=O$ i —OH. Po rozcieńczeniu izotopowym badanej zasady ^3H-dehydrosparteiną i krystalizacji w postaci pikrynianu, radioaktywności właściwe alkaloidu wykrystalizowanego oraz pozostałego w roztworze macierzystym były praktycznie jednakowe (w granicy błędu oznaczenia $\pm 5\%$). Uzyskane więc wyniki wskazują, iż sparteina wprowadzona do roślin przekształcała się między innymi w dehydrosparteinę — związek, który został stwierdzony również jako produkt przemian enzymatycznych sparteiny *in vitro*. W doświadczeniu następnym, przeprowadzonym w celu wyizolowania dehydrolupaniny, ograniczono się tylko do frakcji hydroksylupaniny, w której związek ten może występować. Frakcja ta, wyizolowana z trzech roślin, do których na 2 godziny wprowadzono ^{14}C-lupaninę (w sumie 2 mg, $8{,}6 \times 10^4$ imp/min), dała po redukcji dwa związki o R_f sparteiny i hydroksysparteiny (ostatni w dominującej ilości). Ze względu na zbyt małą ilość pierwszego związku, w celu uzyskania dokładnych danych, zaistniała konieczność naniesienia na chromatogram przed jego rozwinięciem znanej ilości sparteiny. Radioaktywności tych związków podane są w tabeli 4. Przedstawione wyniki wskazują, iż po 2 godzinach około 8% aktywności wprowadzonej do roślin ^{14}C-lupaniny znajduje się w badanej frakcji. Po jej redukcji praktycznie cała ta radioaktywność znajduje się w związku o R_f sparteiny. Związek ten chromatograficznie — przy stosowanych układach rozwijających — zachowywał się identycznie jak sparteina uzyskana w wyniku redukcji dehydrolupaniny w badaniach z ekstraktami enzymatycznymi. Biorąc pod uwagę: 1) bardzo krótki czas trwania eksperymentu, 2) wykrycie aktywności — poza lupaniną — prawie wyłącznie w wyżej badanej frakcji, 3) skład jakościowy analogicznej chromatograficznie frakcji alkaloidów występujących w łubinie białym pastewnym i gorzkim (Sebyła 1963;

Wiewiórowski, Bartz, Wysocka 1961) można uważać, iż uzyskany *in vivo* produkt przekształceń lupaniny stanowi dehydrolupaninę.

Wyniki dotyczące przekształceń sparteiny i lupaniny oraz ich dehydroform w roślinach gorzkiej odmiany po upływie 2, 24 i 96 godz. od chwili iniekcji podane są w tabeli 5 i 6 *. W ciągu badanego okresu nie stwierdzono istotnego zmniejszenia radioaktywności roślin w porównaniu z aktywnością wprowadzoną. W większości zastosowanych kombinacji, a szczególnie w przypadku zasad o nienasyconym pierścieniu, obserwowano już w krótkim czasie po iniekcji ich przekształcenia nie tylko w inne alkaloidy, lecz również i w związki niealkaloidowe. Radioaktywność tych ostatnich wzrastała w miarę upływu czasu, przy czym po 96 godzinach była nadal istotnie wyższa w przypadku wprowadzania dehydroform. Sumaryczna aktywność alkaloidów (tabela 5), stwierdzona po ich rozdziale chromatograficznym, wykazuje na ogół niższe wartości (o około 4—6%) niż aktywność wyjściowego ekstraktu tych zasad. Fakt ten może być wynikiem dwóch przyczyn: 1) niewielkich strat alkaloidów w trakcie ich rozdziału i elucji, 2) ewentualnego zanieczyszczenia ekstraktów związkami niealkaloidowymi. Niezależnie od tego, który z tych czynników odegrał najpoważniejszą rolę, obserwowane różnice nie mogą spowodować istotnych błędów w interpretacji uzyskanych wyników. Wszystkie alkaloidy wprowadzone do roślin prawie natychmiast po iniekcji wykazały przekształcenia w inne zasady i w miarę upływu czasu wielkość tych przemian wzrastała. Należy jednak podkreślić, że stopień przekształcenia dehydrosparteiny, a szczególnie dehydrolupaniny był znacznie większy niż stopień przemian sparteiny i lupaniny w ciągu całego badanego okresu.

Na uwagę zasługują następujące fakty:

1. Po dwóch godzinach od wprowadzenia sparteiny i lupaniny tylko ich dehydroformy wykazywały radioaktywność. Pojawienie się jej w pozostałych alkaloidach stwierdzono w okresie późniejszym. I tak w przypadku sparteiny po 24 godz. radioaktywność występowała w lupaninie, multiflorynie oraz w śladach w estrze hydroksylupaniny stanowiąc w sumie 4,4% aktywności wprowadzonej zasady. Po 96 godz. aktywność tych związków wzrastała (zwłaszcza lupaniny), pojawiała się we frakcji hydroksylupaniny stanowiąc w sumie już 14,4% wielkości wyjściowej. W przypadku iniekcji lupaniny aktywność hydroksylupaniny i jej estru po 24 godz. wynosiła 2,9%, a po 96 godz. 7,5% aktywności wprowadzonej. Frakcja multifloryny, która w tej części doświadczenia nie była szczegółowo analizowana, wykazała odpowiednio 4,0 i 5,6% tej aktyw-

* W tabelach tych, podobnie jak i w tabeli 7 i 8 podane są średnie, uzyskane z dwóch badanych w każdej kombinacji roślin. Podkreślone w tekście różnice przekraczają istotnie różnice między odmianami.

Tabela 5 - Table 5

Radioaktywność poszczególnych frakcji po wprowadzeniu do roślin znakowanych alkaloidów. Łubin biały gorzki

Radioactivity of separately fraction after introduction into the plants of the labelled alkaloids. White lupine of bitter variety

Wprowadzony alkaloid (ilość w mg i radioaktywność w imp/min) Alkaloid introduced (amount in mg and radioactivity in cpm)	Sprzęt roślin po wprowadzeniu alkaloidu (w godz.) The harvest time of the plants after introduced of alkaloids (in hrs)	Radioaktywność całkowita roślin (w 10^3 imp/min) Total radioactivity of the plants (in 10^3 cpm)	Rozmieszczenie radioaktywności całkowitej Distribution of the total radioactivity		
			we frakcji związków niealkaloidowych (w %) in the fractions of nonalkaloids compounds (in percent)		w ekstrakcie alkaloidów przed rozdziałem chromatograficznym (w %) in alkaloid extract before column chromatography (in percent)
			nierozpuszczalnej w 80% metanolu insoluble in 80% methanole	rozpuszczalnej w 80% metanolu soluble in 80% methanole	
^{3}H-sparteina ^{3}H-sparteine (1 mg; 920x10^3imp/min) (1 mg; 920x10^3 cpm)	2	915,5	0,0	1,5	98,5
	24	914,0	0,0	6,4	93,6
	96	895,5	2,1	16,4	81,5
^{3}H-dehydrosparteina ^{3}H-dehydrosparteine (0,3 mg; 276x10^3imp/min) (0,3 mg; 276x10^3 cpm)	2	277,0	3,1	6,6	90,3
	24	278,0	4,2	20,9	71,9
	96	267,5	4,2	30,9	64,9
^{14}C-lupanina ^{14}C-lupanine (3 mg; 126,5x10^3imp/min) (3 mg; 126,5x10^3 cpm)	2	123,1	0,0	0,0	100,0
	24	122,5	0,0	4,4	95,6
	96	124,9	3,3	8,0	88,7
^{14}C-dehydrolupanina ^{14}C-dehydrolupanine (1 mg; 42,5x10^3imp/min) (1 mg; 42,5x10^3 cpm)	2	42,2	0,0	5,6	94,4
	24	41,4	3,7	10,5	95,8
	96	40,6	8,4	20,2	71,4

Tabela 6 -

Zawartość alkaloidów i ich radioaktywność po wprowadzeniu do roślin

Alkaloids contents and their radioactivity after introduction into the plants

Wprowadzony alkaloid (ilość w mg i radioaktywność w imp/min) Alkaloid introduced (amount in mg and radioactivity in cpm)	Sprzęt roślin po wprowadzeniu alkaloidu (w godz.) The harvest time of the plants after introduced of alkaloids (in hrs)	Zawartość w mg frakcji alkaloidów o R_f Content of alkaloids (in mg) of fractions with R_f of					Sumaryczna zawartość alkaloidów (w mg) Total alkaloids content (in mg)
		lupanina lupanine	hydroksylupanina hydroxylupanine	multifloryna multiflerine	sparteina sparteine	ester hydroksylupaniny hydroxylupanine esters	
^{3}H-sparteina ^{3}H-sparteine (1 mg; 920x10^{3}imp/min) (1 mg; 920x10^3 cpm)	2	2,94	0,47	0,68	0,93	0,61	5,63
	24	3,15	0,43	0,76	0,69	0,42	5,45
	96	2,55	0,38	0,55	0,58	0,45	4,51
^{3}H-dehydrosparteina ^{3}H-dehydrosparteine (0,3 mg; 276x10^{3}imp/min) (0,3 mg; 276x10^3 cpm)	2	2,12	0,49	0,76	0,05	0,60	4,07
	24	2,24	0,52	0,71	0,06	0,68	4,21
	96	2,23	0,61	0,58	0,02	0,75	4,19
^{14}C-lupanina ^{14}C-lupanine (3 mg; 126,5x10^{3}imp/min) (3 mg; 126,5x10^3 cpm)	2	5,71	0,43	0,57	-	0,63	7,34
	24	5,92	0,43	0,56	-	0,56	7,47
	96	5,53	0,59	0,46	-	0,70	7,28
^{14}C-dehydrolupanina ^{14}C-dehydrolupanine (1 mg; 42,5x10^{3}imp/min) (1 mg; 42,5x10^3 cpm)	2	2,84	1,32	0,57	-	0,58	5,31
	24	2,86	0,95	0,54	-	0,70	5,05
	96	2,66	0,70	0,61	-	0,78	4,75

*W przypadku wprowadzenia sparteiny i dehydrosparteiny nie badano oddzielnie dehydrolupaniny
Dehydrolupanine was not separately investigated in the case of sparteine and dehydrosparteine introduced

**W przypadku wprowadzenia lupaniny i dehydrolupaniny nie badano oddzielnie dehydrosparteiny
Dehydrosparteine was not separately investigated in the case of lupanine and dehydrolupanine introduced

ności. Trzeba zaznaczyć, że obok multifloryny w eluacie tym mógł wystąpić również produkt przekształceń hydroksylupaniny (patrz cz. I). Podobne zastrzeżenie należałoby wysunąć do frakcji hydroksylupaniny w przypadku iniekcji sparteiny. Mogła ona bowiem zawierać dodatkowo dehydrolupaninę. Również w pewnej mierze może być obciążona błędem aktywność estru hydroksylupaniny, którego w omawianych badaniach nie poddano hydrolizie. Ta ostatnia uwaga odnosi się głównie do części doświadczenia, w której wprowadzono do roślin ^{3}H-sparteinę, gdyż między innymi aktywność estru hydroksylupaniny w omawianej kombinacji była stosunkowo mała, a aktywność produktów niealkaloidowych duża. Należy podkreślić, iż próby wykrycia aktywności we frakcji

– Table 6

łubinu białego gorzkiego ^{3}H-sparteiny, ^{14}C-lupaniny i ich dehydroform

of bitter white lupine of ^{3}H-sparteine, ^{14}C-lupanine and their dehydroforms

Całkowita radioaktywność alkaloidów po rozdziale chromatograficznym (w 10^3 imp/min) Total radioactivity of alkaloids after chromatography separation (in 10^3 cpm)	% radioaktywności w alkaloidach w stosunku do radioaktywności wprowadzonej Percent of alkaloids radioactivity in comparison with radioactivity introduced							
	sparteina sparteine	dehydrosparteina dehydrosparteine	lupanina lupanine	dehydrolupanina dehydrolupanine	hydroksylupanina hydroxylupanine	ester hydroksylupaniny hydroxylupanine esters	multiflotyna multiflorine	razem total
851,5	82,8	9,7	0,0	–*	0,0	0,0	0,0	92,55
775,5	68,8	11,1	2,8	–	0,0	0,3	1,3	84,29
704,0	50,4	11,7	8,9	–	0,8	2,2	2,5	76,52
224,0	16,9	54,3	6,4	–	0,0	0,0	3,5	81,16
181,0	19,1	19,1	14,8	–	5,3	2,5	4,8	65,58
160,0	8,5	12,0	16,9	–	3,6	6,3	10,7	57,97
112,2	0,0	–**	84,2	4,5	0,0	0,0	0,0	87,90
114,6	0,0	–	79,4	4,1	1,7	1,2	4,0	90,59
109,0	0,0	–	68,9	4,2	3,6	3,9	5,6	86,16
37,5	0,0	–	9,9	60,5	5,9	8,0	4,0	88,23
31,5	0,0	–	12,5	16,0	20,2	14,6	10,1	74,12
25,3	0,0	–	12,0	3,3	19,1	13,9	11,3	59,76

sparteiny — nawet po 96 godzinach od wprowadzenia lupaniny — dały wyniki negatywne.

2. W odróżnieniu od sparteiny i lupaniny obie ich dehydroformy natychmiast prawie po iniekcji przekształcały się częściowo nie w jeden, ale w szereg innych alkaloidów. I tak w przypadku wprowadzenia dehydrosparteiny, radioaktywność wykazywały: sparteina (w stopniu największym), lupanina i multifloryna. W okresie następnym aktywność tych dwóch ostatnich zasad znacznie zwiększała się, dochodząc w sumie do 27% wprowadzonej. Aktywne frakcje hydroksylupaniny i jej estru pojawiały się po upływie 24 godz. od iniekcji, przy czym sumaryczna ich aktywność stanowiła 10% wprowadzonej. W tym samym czasie zmniejszała się nie tylko radioaktywność dehydrosparteiny, ale również i sparteiny. W przypadku dehydrolupaniny po 2 godz. od jej wprowadzenia można było już wykryć znaczne aktywności w lupaninie, a przede wszystkim w hydroksylupaninie (łącznie z jej estrem). Pewną aktywność w tym

Tabela 7 - Table 7

Radioaktywność poszczególnych frakcji po wprowadzeniu do roślin znakowanych alkaloidów. Łubin biały pastewny

Radioactivity of separately fractions after introduction into the plants of the labelled alkaloids. White lupine of fodder variety

Wprowadzony alkaloid (ilość w mg i radioaktywność w imp/min) Alkaloid introduced (amount in mg and radioactivity in cpm)	Sprzęt roślin po wprowadzeniu alkaloidu (w godz.) The harvest time of the plants after introduced of alkaloids (in hrs)	Radioaktywność całkowita roślin (w 10^3 imp/min) Total radioactivity of the plants (in 10^3 cpm)	Rozmieszczenie radioaktywności całkowitej Distribution of the total radioactivity		
			we frakcji związków niealkaloidowych (w %) in the fractions of nonalkaloids compounds (in percent)		w ekstrakcie alkaloidów przed rozdziałem chromatograficznym (w %) in alkaloid extract before column chromatography (in percent)
			nierozpuszczalnej w 80% metanolu insoluble in 80% methanole	rozpuszczalnej w 80% metanolu soluble in 80% methanole	
^{3}H-sparteina ^{3}H-sparteine (0,2 mg; 184x10^3imp/min) (0,2 mg; 184x10^3 cpm)	2	181,0	0,0	4,4	95,6
	24	182,0	1,9	17,1	81,0
	96	182,0	4,2	26,2	69,6
^{3}H-dehydrosparteina ^{3}H-dehydrosparteine (0,1 mg; 92 x 10^3imp/min) (0,1 mg; 92 x 10^3 cpm)	2	90,1	2,1	11,9	86,0
	24	92,1	3,8	22,9	73,3
	96	91,4	6,3	37,2	56,5
^{14}C-lupanina ^{14}C-lupanine (1 mg; 42,5 x 10^3imp/min) (1 mg; 42,5 x 10^3 cpm)	2	41,9	0,0	2,5	97,5
	24	42,3	1,8	9,0	89,2
	96	41,7	4,9	14,6	80,5
^{14}C-dehydrolupanina ^{14}C-dehydrolupanine (0,5 mg; 21,25 x 10^3 imp/min) (0,5 mg; 21,25 x 10^3 cpm)	2	20,2	2,5	11,8	85,7
	24	21,0	6,0	17,8	76,2
	96	20,9	11,7	26,3	62,0

Tabela 8 - Table 8

Radioaktywność alkaloidów po wprowadzeniu do roślin łubinu białego pastewnego ^{3}H-sparteiny, ^{14}C-lupaniny i ich dehydroform

Radioactivity of the alkaloids after introduction into the plants of fodder white lupine of ^{3}H-sparteine, ^{14}C-lupanine and their dehydroforms

Wprowadzony alkaloid (ilość w mg i radioaktywność w imp/min) Alkaloid introduced (amount in mg and radioactivity in cpm)	Sprzęt roślin po wprowadzeniu alkaloidu (w godz.) The harvest time of the plants after introduced of alkaloids (in hrs)	Radioaktywność całkowita ekstraktu alkaloidów przed rozdziałem chromatograficznym (w 10^3 imp/min) Total radioactivity of alkaloids extract before chromatography separation (in 10^3 cpm)	Radioaktywność całkowita alkaloidów po rozdziale chromatograficznym (w 10^3 imp/min) Total radioactivity of alkaloids after chromatography separation (in 10^3 cpm)	% radioaktywności w alkaloidach w stosunku do radioaktywności wprowadzonej Percent of alkaloids radioactivity in comparison with radioactivity introduced							
				sparteina sparteine	dehydrosparteina dehydrosparteine	lupanina lupanine	dehydrolupanina dehydrolupanine	hydroksylupanina hydroxylupanine	ester hydroksylupaniny hydroxylupanine esters	a_x	razem total
^{3}H-sparteina ^{3}H-sparteine (0,2 mg; 184 x 10^3 imp/min) (0,2 mg; 184 x 10^3 cpm)	2	173,0	170,5	75,9	16,7	0,0	-*	0,0	0,0	0,0	92,66
	24	147,2	145,2	58,5	18,5	1,4	-	0,0	0,0	0,5	78,91
	96	126,6	127,2	43,9	21,1	1,7	-	0,7	0,3	1,2	69,13
^{3}H-dehydrosparteina ^{3}H-dehydrosparteine (0,1 mg; 92 x 10^3 imp/min) (0,1 mg; 92 x 10^3 cpm)	2	77,5	76,6	6,1	76,5	0,7	-	0,6	0,0	0,0	83,26
	24	67,5	65,4	7,9	58,8	3,1	-	0,8	0,4	0,0	71,08
	96	52,1	50,4	7,4	40,8	3,7	-	1,3	1,2	0,3	54,78
^{14}C-lupanina ^{14}C-lupanine (1 mg; 42,5 x 10^3 imp/min) (1 mg; 42,5 x 10^3 cpm)	2	40,9	39,8	0,0	-**	84,9	8,7	0,0	0,0	0,0	93,64
	24	37,7	37,0	0,0	-	72,1	10,5	2,8	1,6	0,0	87,06
	96	33,6	31,5	0,0	-	56,8	7,8	5,1	4,2	0,3	74,11
^{14}C-dehydrolupanina ^{14}C-dehydrolupanine (0,5 mg; 21,25x10^3 imp/min) (0,5 mg; 21,25x10^3 cpm)	2	17,3	16,9	0,0	-	4,6	62,5	8,0	4,2	0,0	79,53
	24	16,0	14,7	0,0	-	7,7	37,9	12,6	9,9	0,8	69,17
	96	13,0	13,7	0,0	-	9,4	12,6	22,6	14,2	1,4	64,47

*W przypadku wprowadzenia sparteiny i dehydrosparteiny nie badano oddzielnie dehydrolupaniny
Dehydrolupanine was not separately investigated in the case of sparteine and dehydrosparteine introduced

**W przypadku wprowadzenia lupaniny i dehydrolupaniny nie badano oddzielnie dehydrosparteiny
Dehydrosparteine was not separately investigated in the case of lupanine and dehydrolupanine introduced

czasie wykazywała również i frakcja multifloryny. W okresie następnym aktywność lupaniny nie ulegała istotnym zmianom, natomiast znacznie wzrastała aktywność hydroksylupaniny (łącznie z jej estrem) stanowiąc 33% aktywności wprowadzonej i frakcji multifloryny (około 11%). W tym samym czasie dehydrolupanina ulegała prawie całkowitemu zanikowi. Podobnie jak po wprowadzeniu lupaniny również po iniekcji jej dehydroformy nie udało się wykryć nawet śladów aktywności we frakcji sparteiny. Należy zaznaczyć, iż wysunięte wyżej zastrzeżenia co do czystości niektórych frakcji alkaloidów odnoszą się również i do omawianych kombinacji.

Przekształcenia sparteiny, lupaniny i ich dehydroform w roślinach odmiany pastewnej, obok wielu cech podobieństwa wykazują jednocześnie pewne różnice w stosunku do charakteru i intensywności przekształceń analogicznych zasad w odmianie gorzkiej (tabele 7 i 8). W roślinach tych obserwuje się również przemiany wprowadzonych zasad na związki niealkaloidowe, przy czym przebiegają one nawet intensywniej niż w odmianie gorzkiej. I w tym przypadku radioaktywność produktów niealkaloidowych po wprowadzeniu dehydroform była wyższa niż po wprowadzeniu sparteiny i lupaniny. Należy przy tym dodać, iż po 96 godzinach od wprowadzenia dehydrosparteiny i dehydrolupaniny, stopień ich przekształceń w związki niealkaloidowe był wyższy odpowiednio o około 25 i 30% niż u roślin odmiany gorzkiej. Również na uwagę zasługują znacznie intensywniejsze niż w gorzkiej odmianie przemiany sparteiny do tych związków. Szybkość przekształcenia się lupaniny w hydroksylupaninę (łącznie z jej estrem) była podobna jak w odmianie gorzkiej. Na uwagę jednak zasługują intensywniejsze w omawianej odmianie przekształcenia tego alkaloidu natychmiast po wprowadzeniu w dehydrolupaninę. Fakt ten może być przyczyną większej również — w porównaniu z analogiczną kombinacją roślin gorzkich — aktywności hydroksylupaniny i jej estru zarówno po upływie 24, jak i 96 godzin. Intensywność przekształceń dehydrolupaniny w hydroksylupaninę w omawianej odmianie była bardzo duża. I w tych roślinach zasada ta częściowo przekształcała się w lupaninę, jednakże stopień tych przemian (maksimum 9,4%) w porównaniu do stopnia przemian w hydroksylupaninę (maksimum 37%) był stosunkowo niewielki. Istotniejsze różnice w porównaniu z odmianą gorzką wystąpiły we frakcji alkaloidu o R_f multifloryny — alkaloidu, oznaczonego symbolem a_x w odmianie pastewnej i różniącego się we własnościach istotnie od tej ostatniej. Stwierdzone aktywności tej frakcji — zarówno po wprowadzeniu lupaniny, jak i dehydrolupaniny — były znacznie niższe niż aktywność analogicznej chromatograficznie frakcji w łubinie gorzkim. I w tym przypadku również niewiadomo, w jakim stopniu stwierdzone aktywności są wynikiem ewentualnego występowania produktu przemian hydroksylupaniny o identycznym R_f.

Najistotniejsze różnice w porównaniu z odmianą gorzką należy jednak odnotować w intensywnościach przekształceń wprowadzonych do roślin pastewnych sparteiny i dehydrosparteiny. W przypadku sparteiny obserwuje się: 1) znacznie intensywniejsze przekształcenia jej w dehydrosparteinę, i to bezpośrednio po wprowadzeniu, 2) znacznie mniejsze jej przemiany w lupaninę i hydroksylupaninę i 3) bardzo słabe przekształcenia w związki frakcji a_x. Ogólna aktywność alkaloidów — poza sparteiną i jej dehydroformą — po 96 godzinach wynosiła zaledwie 3,9% aktywności wprowadzonej.

W przypadku dehydrosparteiny obserwuje się: 1) stosunkowo słabsze przekształcenia się jej w sparteinę, której aktywność do końca doświadczenia nie ulega istotnym zmianom, 2) słabsze również niż w łubinie gorzkim przemiany na inne alkaloidy. Łączna aktywność lupaniny, hydroksylupaniny wraz z jej estrem oraz frakcji a_x po 96 godzinach wynosiła tylko 6,5% (w łubinie gorzkim 37%).

DYSKUSJA

Głównym celem przeprowadzonych doświadczeń nad biosyntezą znakowanych alkaloidów było uzyskanie możliwie wysokiej radioaktywności tych związków. Osiągnięcie tego celu warunkowało z kolei podjęcie badań nad przemianami alkaloidów po ich uprzednim wprowadzeniu do roślin w takich ilościach, które by ograniczały do minimum ewentualną możliwość ich wpływu na przebieg normalnych procesów metabolicznych i powstawanie związanych z tym artefaktów. Istniejące w literaturze dane (Schütte, Nowacki 1959; Schütte, Nowacki, Schäffer 1962) wskazywały na stosunkowo wysoki stopień włączania radioaktywnego węgla w alkaloidy łubinowe w przypadku wprowadzenia do roślin ^{14}C-kadaweryny (do 5%). Wyniki przedstawionych doświadczeń z roślinami łubinu białego, badanymi po dłuższym okresie czasu od chwili wprowadzenia kadaweryny, nie potwierdziły tak wysokiej inkorporacji radioaktywnego węgla, jak w badaniach cytowanych autorów. Uzyskany przez nas stopień włączania ^{14}C-kadaweryny w alkaloidy był nawet istotnie mniejszy od stopnia inkorporacji $^{14}CO_2$ w te zasady w podobnym okresie czasu (Birecka 1963). Przyczyną odnotowanych rozbieżności w wynikach mogą być zarówno różnice w fazie rozwojowej użytych do doświadczeń roślin, jak i zastosowanie odmiennych sposobów ekstrakcji i oczyszczania samych alkaloidów. Biorąc jednakże pod uwagę stosunkowo duży przyrost ilości alkaloidów w badanych roślinach oraz małą intensywność włączania w nie ^{14}C z kadaweryny, otrzymane wyniki raczej nie wskazują na to, aby związek ten mógł spełniać rolę bezpośredniego ich prekursora.

Na szczególne podkreślenie zasługuje natomiast fakt wysokiej inkorporacji radioaktywności we wszystkie badane alkaloidy w przypadku

wprowadzenia ^{3}H-sparteiny. Należy dodać, iż intensywne przemiany nieradioaktywnej sparteiny, wprowadzonej w dużych ilościach do roślin odmiany pastewnej, w inne alkaloidy stwierdzono również uprzednio (Birecka, Sebyła, Nalborczyk 1959). Biorąc pod uwagę minimalne rozcieńczenie izotopowe ^{3}H-sparteiny i ^{14}C-kadaweryny po ich wprowadzeniu do roślin, uzyskane dane świadczą, iż: 1) przekształcenia sparteiny w inne charakterystyczne dla gorzkiej odmiany łubinu białego alkaloidy są znacznie szybsze niż procesy przemian ^{14}C-kadaweryny do tych związków, 2) ^{3}H-sparteina — po uprzednim chemicznym usunięciu łatwo wymiennych atomów wodoru — może równie dobrze jak związki zawierające ^{14}C służyć do znakowania innych alkaloidów łubinowych, mimo iż wodory związane z jej szkieletem są w przemianach badanych zasad łatwiej „atakowane" przez enzymy niż węgiel w tym szkielecie. Na stosunkowo dużą stabilność ^{3}H w tego typu związkach przy odpowiednim ich trytowaniu wskazują również wyniki doświadczeń, w których porównywano charakter przemian ^{14}C-lupaniny i ^{3}H-lupaniny (uzyskanej z ^{3}H-sparteiny) po ich wprowadzeniu do roślin. Rozmieszczenie aktywności w produktach ich przemian było w obu przypadkach analogiczne (dane nie opublikowane). Stwierdzony fakt, że zarówno po wprowadzeniu ^{14}C-kadaweryny, jak i ^{3}H-sparteiny stosunki między badanymi alkaloidami pod względem radioaktywności — przy ogromnych różnicach w stopniu inkorporacji obu prekursorów — odpowiadają na ogół ich stosunkom ilościowym, w poważnym stopniu sugeruje przynależność sparteiny do jednego z początkowych ogniw łańcucha syntezy i metabolizmu alkaloidów łubinowych. Na podstawie wyników badań nad przekształceniami sparteiny *in vitro* pod działaniem ekstraktów enzymatycznych z roślin łubinu białego obu odmian (część I niniejszej pracy) można było przypuszczać, że zasada ta ulega przemianom do dehydrosparteiny również i *in vivo*. Przypuszczenie to zostało potwierdzone poprzez wykrycie w roślinach, do których wprowadzono większe ilości sparteiny, związku analogicznego do dehydrosparteiny otrzymanej *in vitro*. Również najprawdopodobniej jedne z pierwszych etapów przekształceń w roślinach lupaniny, hydroksylupaniny i angustifoliny przebiegają analogicznie jak ich przemiany *in vitro*. Zbyt mały jednak udział produktów tych przekształceń w ogólnej ilości alkaloidów w badanym materiale roślinnym oraz cechująca je duża labilność, w poważnym stopniu utrudniają stwierdzenie ich obecności, a tym bardziej ekstrakcję na skalę pereparatywną w celach bliższej identyfikacji. Przyczyną tak niskiego ich udziału są najprawdopodobniej bardzo szybkie przemiany m.in. w inne alkaloidy, a nie wolniejszy w porównaniu z pozostałymi zasadami stopień syntezy. Wskazuje na to szybszy spadek radioaktywności ^{3}H-dehydrosparteiny i ^{14}C-dehydrolupaniny w porównaniu ze spadkiem radioaktywności ^{3}H-sparteiny i ^{14}C-lupaniny po ich wprowadzeniu do roślin, jak również intensywne przekształcenia tych ostatnich w swe de-

hydroformy. Wyniki badań otrzymane po wprowadzeniu wymienionych czterech zasad do roślin gorzkiej i pastewnej odmiany łubinu białego wskazują na występowanie wzajemnych powiązań metabolicznych pomiędzy szeregiem charakterystycznych dla tych roślin alkaloidów. Ukazują one ponadto, iż obie odmiany pomimo wielu wspólnych cech metabolizmu odznaczają się także pewnymi różnicami w charakterze i intensywności przemian tych zasad.

Do wyników przeprowadzonych badań można mieć jednakże to zastrzeżenie, że przy wprowadzeniu znakowanych zasad z zewnątrz do roślin, miejsce ich przekształceń mogło być przypadkowe (uwzględniając możliwość ściśle określonej lokalizacji procesów przemian alkaloidów w komórce czy też tkance), a więc i charakter przemian mógł różnić się od metabolizmu alkaloidów rodzimych. Biorąc tę możliwość pod uwagę, przy interpretacji przemian obserwowanych bezpośrednio po wprowadzeniu alkaloidu, należy również uwzględnić intensywność i charakter jego przemian w okresach późniejszych. Dopiero na podstawie prześledzenia dynamiki tych przekształceń w czasie i wyznaczenia ich kierunku można wnioskować, które z procesów przemian obserwowanych bezpośrednio mogą reprezentować właściwe ich ogniwo, a które stanowią ewentualnie artefakt biologiczny spowodowany metodą iniekcji. I tak w przedstawionych doświadczeniach obie dehydroformy natychmiast po wprowadzeniu do roślin wykazywały nie tylko przemiany idące w kierunku zwiększenia ich stopnia utlenienia, ale również przemiany w kierunku przeciwnym, a mianowicie dehydrosparteina częściowo przekształciła się w sparteinę, dehydrolupanina zaś w lupaninę. Wyniki te mogą stanowić argument popierający pogląd, według którego przekształcenia alkaloidów łubinu wąskolistnego i białego przebiegają w kierunku zmniejszenia ich stopnia utlenienia (Wiewiórowski, Reifer 1961; Reifer, Wiewiórowski, Niziołek, Stawicka, Bratek 1962). Opisywane przemiany po 96, a w wielu przypadkach nawet po 24 godzinach od wprowadzenia alkaloidu ulegają, jeśli nie całkowicie, to w poważnym stopniu zahamowaniu. We wszystkich trzech zastosowanych okresach badań obserwuje się natomiast stały wzrost przekształceń w kierunku zwiększenia stopnia utlenienia alkaloidów. Nie zaobserwowano również ani w jednym przypadku, aby wprowadzone do roślin ^{14}C-lupanina oraz jej dehydroforma ulegały przekształceniom do sparteiny, obecność której została ostatnio całkowicie udowodniona zarówno w odmianie gorzkiej (Birecka 1963), jak i pastewnej (Sebyła 1962) badanego gatunku.

Biorąc pod uwagę stopień dokładności uzyskanych wyników można bez większego błędu stwierdzić, iż w roślinach odmiany gorzkiej wprowadzona sparteina przekształcała się częściowo w lupaninę i multiflorynę, wprowadzona zaś lupanina ulegała częściowym przemianom na hydroksylupaninę (która jednocześnie mogła ulegać estryfikacji). Droga

pośrednia tych przemian wiodła najprawdopodobniej poprzez odpowiednie dehydroformy wprowadzanych zasad. Dehydroformy te *in vivo* ulegały znacznie intensywniejszemu dalszemu utlenieniu niż alkaloidy, z których powstały w wyniku przekształceń. Zjawisko to nie wydaje się być wyłącznie artefaktem spowodowanym różnym stopniem rozcieńczenia izotopowego wprowadzonego alkaloidu oraz jego dehydroformy. Jeśli bowiem mniejszą ilość hydroksylupaniny powstałej z lupaniny, w porównaniu z ilością tego alkaloidu powstałego z dehydrolupaniny, można by tłumaczyć istotnymi różnicami w stopniu rozcieńczenia izotopowego alkaloidami zawartymi w roślinach, to w przypadku wprowadzonej sparteiny i dehydrosparteiny, gdzie rozcieńczenie izotopowe było minimalne, ten argument nie może być brany pod uwagę.

Przekształcenia sparteiny, lupaniny i ich dehydroform w roślinach odmiany pastewnej łubinu białego, w swych ogólnych tendencjach wykazywały charakter podobny jak przemiany tych zasad w odmianie gorzkiej. Intensywność przekształceń lupaniny i dehydrolupaniny w inne alkaloidy była nawet w omawianych roślinach większa. Może to być wynikiem różnic w rozcieńczeniu zasadami zawartymi w roślinach obu odmian, mimo iż do roślin pastewnych wprowadzono mniejsze ilości znakowanego alkaloidu. Jednakże nie wiadomo, w jakim stopniu zjawisko inhibicji przemian badanych zasad do ich dehydroform, obserwowane *in vitro* po dodaniu do ekstraktu z roślin pastewnych soku roślin gorzkich, mogło przejawić się w przemianach *in vivo*. Na uwagę bowiem zasługuje fakt większego udziału radioaktywności w dehydrolupaninie w odmianie pastewnej niż w gorzkiej po wprowadzeniu lupaniny.

Analogiczne różnice między badanymi odmianami wystąpiły również w aktywności dehydrosparteiny po iniekcji sparteiny. Jednak przekształcenia tych dwóch alkaloidów, wprowadzonych z zewnątrz do lupaniny czy też hydroksylupaniny, były znacznie słabsze niż w odmianie gorzkiej. Jest rzeczą prawdopodobną, iż mniejsza zawartość alkaloidów w roślinach pastewnych łubinu jest nie tylko wynikiem bardzo słabej syntezy tych związków z prekursorów niealkaloidowych, ale również i małej intensywności niektórych procesów występujących we wzajemnych przemianach samych alkaloidów. Pośrednim częściowo argumentem popierającym to przypuszczenie jest fakt większej w odmianie pastewnej intensywności przekształceń wprowadzonych zasad do produktów niealkaloidowych. W omawianych doświadczeniach na zjawisko to mogło mieć wpływ również różne rozcieńczenie izotopowe. W podobnych jednak doświadczeniach ze znakowaną ^{14}C-lupaniną (Birecka, Sebyła 1960), w których rola tego czynnika była mało istotna, stwierdzono analogiczne różnice między odmianą gorzką i pastewną.

Powyższa interpretacja uzyskanych wyników może być jednak prawdopodobna jedynie pod warunkiem, że na obserwowane przemiany alkaloidów nie wywarła istotnego wpływu zastosowana metodyka badań.

Odrębnego omówienia wymaga frakcja o R_f multifloryny w obu odmianach. W roślinach łubinu gorzkiego, po wprowadzeniu sparteiny i jej dehydroformy, stwierdzono dużą inkorporację radioaktywności w multiflorynie, natomiast w roślinach pastewnych radioaktywność analogicznej pod względem R_f frakcji, ale zawierającej w dominujących ilościach inny nie zidentyfikowany alkaloid — a_x — jest bardzo niska. Jest prawdopodobne, że ta aktywność odnosi się również do multifloryny, która może występuje w odmianie pastewnej, ale nie jest wykryta na skutek bardzo małych ilości. Możliwe jest jednak, że aktywność omawianych frakcji odnosi się rzeczywiście do zasady a_x.

Reasumując wyniki przeprowadzonych badań nad przemianami alkaloidów *in vivo* można wysunąć przypuszczenie, iż ogólne ich przekształcenia w łubinie białym przebiegają według następującego schematu:

alkaloid wprowadzony → dehydroforma → inny alkaloid
↓
związki niealkaloidowe

Jeden z etapów przekształceń badanych alkaloidów *in vivo* może prowadzić poprzez odwodorowanie określonego alkaloidu i dalsze przemiany powstałej dehydroformy do nowych, bardziej utlenionych zasad. Większość wyników przeprowadzonych badań wskazuje na taką właśnie drogę przekształceń alkaloidów w roślinie — drogę o wyraźnej tendencji zwiększania stopnia utlenienia tych zasad. Pokrywa się to z szeregiem wcześniejszych obserwacji i hipotez (Hegnauer 1955; Schöpf, Arm, Benz, Krim 1951; Mothes 1955; Birecka 1963). Wyjaśnienie dokładnego mechanizmu tych przemian wymaga jednak dalszych szczegółowych badań.

WNIOSKI

1. Znakowana trytem sparteina — po uprzednim chemicznym zastąpieniu łatwo wymiennych atomów trytu wodorem — może być wykorzystana, podobnie jak związki znakowane ^{14}C do badań nad biosyntezą i przemianami alkaloidów łubinowych.

Przekształcenia ^{3}H-sparteiny w inne charakterystyczne dla gorzkiej odmiany łubinu alkaloidy przebiegały w roślinach znacznie szybciej niż procesy przemian ^{14}C-kadaweryny do tych związków, przy czym stopień włączenia radioaktywności był na ogół proporcjonalny do ich zawartości.

2. Dehydrosparteina powstała w wyniku przemian wprowadzonej do roślin sparteiny wykazuje szereg analogicznych właściwości fizyko-chemicznych z dehydrosparteiną uzyskaną w wyniku działania na ten alkaloid enzymatycznych ekstraktów z roślin gorzkiej i pastewnej odmiany łubinu białego. To samo odnosi się do dehydrolupaniny powstałej *in vivo* z lupaniny.

3. W roślinach odmiany gorzkiej i pastewnej wprowadzona sparteina i lupanina przekształcają się w szereg innych alkaloidów. Spośród tych alkaloidowych produktów przemian stwierdzono w przypadku wprowadzenia sparteiny: obecność dehydrolupaniny, lupaniny i hydroksylupaniny, a w przypadku lupaniny: dehydrolupaniny i hydroksylupaniny. Wprowadzone dehydrosparteina i dehydrolupanina w roślinach obu odmian wykazują podobny charakter przemian jak wyżej wymienione alkaloidy. Jednakże częściowo przekształcały się one również odpowiednio w sparteinę i lupaninę. Ta ostatnia zasada, podobnie jak jej dehydroforma, nie wykazała przemian w żadnej z badanych odmian do sparteiny.

4. Jednym z alkaloidowych produktów przemian sparteiny i dehydrosparteiny po wprowadzeniu do roślin odmiany gorzkiej była również multifloryna. Znacznie słabszy stopień włączania radioaktywności tych zasad wykazuje frakcja a_x, o analogicznym z multifloryną R_f, wyizolowana z roślin pastewnych.

5. Przemiany sparteiny, lupaniny i ich dehydroform w roślinach obu odmian prowadzą nie tylko do powstania innych alkaloidów, ale również i związków o charakterze niealkaloidowym. We wszystkich przypadkach wprowadzenia dehydroform, przemiany ich na związki niealkaloidowe były intensywniejsze od analogicznych przemian sparteiny i lupaniny.

6. Charakter i intensywność przekształceń sparteiny, lupaniny jak i dehydrosparteiny oraz dehydrolupaniny *in vitro* i *in vivo* wskazują, iż główny kierunek przemian tych alkaloidów w roślinach prowadzi do zwiększenia ich stopnia utlenienia.

Prof. dr H. Bireckiej składam serdeczne podziękowanie za szereg krytycznych uwag i wskazówek udzielonych mi w czasie wykonywania doświadczeń i opracowywania wyników.

SUMMARY

Transformation of sparteine, lupanine and obtained from this bases *in vitro* by the action of enzyme extracts dehydrosparteine and dehydrolupanine, introduced to the fodder and bitter lupine (*Lupinus albus*) were investigated.

The alkaloids used in this work had high specific radioactivity and special ways of their biosynthesis were described.

From the results obtained the following facts should be emphasized:

1) Tritium labelled sparteine — after previous replacing of easy exchanged tritium atoms via exchange reactions by hydrogen atoms — can be used to the study of the biosynthesis and transformations of lupin alkaloids as well as ^{14}C-labelled cadaverine. Transformation of ^{3}H-sparteine into another alkaloids (characteristic for bitter variety of lupine) is faster than transformation of the ^{14}C-labelled cadaverine into the some alkaloids. Degree of incorporation of the radioactivity was generally proportional to their content.

2) Dehydrosparteine obtained as the result of transformation of sparteine introduced to the plants shows a number of physical and chemical properties

which are analogous to the respective physical and chemical properties of dehydrosparteine obtained enzymatically *in vitro*. The some is true concerning the dehydrolupanine obtained in vivo from lupanine.

3) The sparteine and lupanine introduced to the plants of fodder and bitter variety is transformed into a number of another alkaloids. It was found that: a) introduced sparteine had been transformed into dehydrosparteine, lupanine and hydroxylupanine, b) introduced lupanine was transformed into dehydrolupanine and hydroxylupanine. Transformation of dehydrosparteine and dehydrolupanine introduced into the plants of both varieties show a great similarity to the transformation of alkaloids mentioned above. Partial transformation of dehydrosparteine and dehydrolupanine respectively into sparteine and lupanine was also observed. The late base as well as its dehydroform did not show any transformation into sparteine in any plants of the varieties studied.

4) Multiflorine was one of the alkaloids products of sparteine and dehydrosparteine transformations after their introduction into the plants of bitter variety. The degree of incorporation of radioactivity for the fraction a_x (which has the same R_f as multiflorine has) isolated from fodder plants was low.

5) It was found that sparteine, lupanine and their dehydroforms are transformed not only into another alkaloids but also into nonalkaloid compounds. In all cases dehydroforms are transformed into nonalkaloid compounds more intensively than sparteine and lupanine.

6) The character and degree of transformation of the sparteine and the lupanine as well as their dehydroforms, observed by us *in vitro* and *in vivo*, shows that the oxidation process is the main direction during the biochemical changes of these bases.

LITERATURA

Birecka H., 1963, Acta Soc. Bot. Pol. 32 (1):131.

Birecka; H., Sebyła T., Nalborczyk, E., 1959, Acta Soc. Bot. Pol. 28 (2):301.

Birecka H., Rybicka H., Szymańska W., 1960,; Acta Soc. Bot. Pol. 29 (2):275.

Birecka H., Sebyła T., 1960, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. (8):5.

Birecka H., Nalborczyk E., 1961, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. (9):401.

Hegnauer M. R., 1955, Bull. Soc. Pharm. de Bordeaux (94):209.

Mothes K., 1955, Ann. Rev. of Plant Physiol. (6):73.

Mothes K., Schütte H. R., Simon H., Weygand F., 1959, Zeitschr. Naturforsch., (14b):1.

Murray A., Williams D. L., 1958, Organic synthesis with isotopes. Part I. Interscience Publishers, Inc., New York.

Murray A., Williams D. L., 1958, Organic synthesis with istotopes. Part II., Interscience Publishers, Inc., New York.

Nalborczyk E., 1961, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. (9):409.

Nalborczyk E., 1962, Postępy Bioch. (8):95.

Nalborczyk E., 1964, Acta Soc. Bot. Pol. 33:371.

Reifer I., Niziołek S., 1957, Acta Bioch. Pol. (4):3.

Reifer I., Przeździecka N., Kleczkowska D., 1959, Acta Bioch. Pol. (6):17.

Reifer I., Wiewiórowski M., Niziołek S., Stawicka D., Bratek M. D., 1962, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. (10):161.

Schöpf C., Arm H., Benz G., Krim H., 1951, Naturwiss. (38):186.

Schütte H. R., Nowacki E., 1959, Naturwiss. (16):493.

Schütte H. R., Nowacki E., Schäffer C. H., 1962, Archiv für Pfarm. (20):295.

Sebyła T., 1962, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. (10):297.

Sebyła T., 1963, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. (11):1.

Wiewiórowski M., Bartz I., Wysocka W., 1961, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. chim., (9):715.

Wiewiórowski M., Reifer I., 1961, Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol., (10):161.