

# BIOSYNTHESE UND STOFFWECHSEL DER CHINOLIZIDIN-ALKALOIDE VON *SOPHORA ALOPECUROIDES*

J. K. KUSCHMURADOV\*, D. GROSS und H. R. SCHÜTTE

Institut für Biochemie der Pflanzen des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Halle (Saale)

(Eingegangen 21. März 1972. Angenommen 26. Juli 1972)

**Key Word Index**—*Sophora alopecuroides*; Leguminosae; quinolizidine alkaloids; biosynthesis; metabolism.

**Zusammenfassung**—Keimlinge von *Sophora alopecuroides* L. vermögen appliziertes Matrin-U-<sup>3</sup>H in Sophocarpin sowie in Sophocarpin-N-oxid und Matrin-N-oxid, und appliziertes Sophocarpin-U-T in Matrin und die beiden N-Oxide zu inkorporieren. Es ist aber bei beiden Verbindungen kein Einbau in Sophoridin zu beobachten. Matrin und Sophocarpin können somit im pflanzlichen Stoffwechsel reversibel ineinander übergehen, während eine Umwandlung der Alkalioide mit Matrinxkonfiguration in das stereochemisch einer anderen Reihe angehörende Sophoridin nicht möglich ist. Der Einbau von Cadaverin-1,5-<sup>14</sup>C war so niedrig, daß nicht mit Bestimmtheit gesagt werden kann, daß diese Verbindung eine physiologische Vorstufe der Alkalioide darstellt. Matrin-N-oxid und Sophocarpin-N-oxid werden als Inhaltsstoffe von *S. alopecuroides* nachgewiesen.

**Abstract**—Administration of matrine-U-<sup>3</sup>H and sophocarpine-U-<sup>3</sup>H to *Sophora alopecuroides* seedlings shows that these compounds were incorporated into quinolizidine alkaloids such as matrine, sophocarpine, and their N-oxides, but not into sophoridine. It is suggested that there is no stereochemical conversion of alkaloids of matrine configuration into sophoridine by the plant. The incorporation of cadaverine-1,5-<sup>14</sup>C was so low that it cannot be regarded with certainty as a physiological precursor of the alkaloids. The N-oxides of matrine and sophocarpine were isolated and identified by their chromatographic and chemical properties.

## EINLEITUNG

CHINOLIZIDINALKALOIDE wie Lupinin, Spartein oder Lupanin leiten sich biogenetisch aus dem Lysinstoffwechsel ab, wobei Cadaverin als Zwischenprodukt durchlaufen wird.<sup>1</sup> Auch das bevorzugt in *Sophora*-Arten vorkommende tetracyclisch gebaute Matrin (I) weist trotz der andersartigen Verknüpfung der beiden Chinolizidinringsysteme ein entsprechendes Entstehungsprinzip auf, wie z.B. durch Untersuchungen mit <sup>14</sup>C-markierten Vorstufen an *Sophora tetraptera* F. Mill.,<sup>2,3</sup> *S. flavescens* Ait.<sup>4</sup> und *S. pachycarpa* Schrenk<sup>5</sup> gezeigt werden konnte.

\* Gastwissenschaftler aus dem Laboratorium für Chemie der Naturstoffe, Chemische Fakultät der Universität Taschkent.

<sup>1</sup> H. R. SCHÜTTE, in *Biosynthese der Alkalioide* (Hrsg. K. MOTHES und H. R. SCHÜTTE), s. 324, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1969).

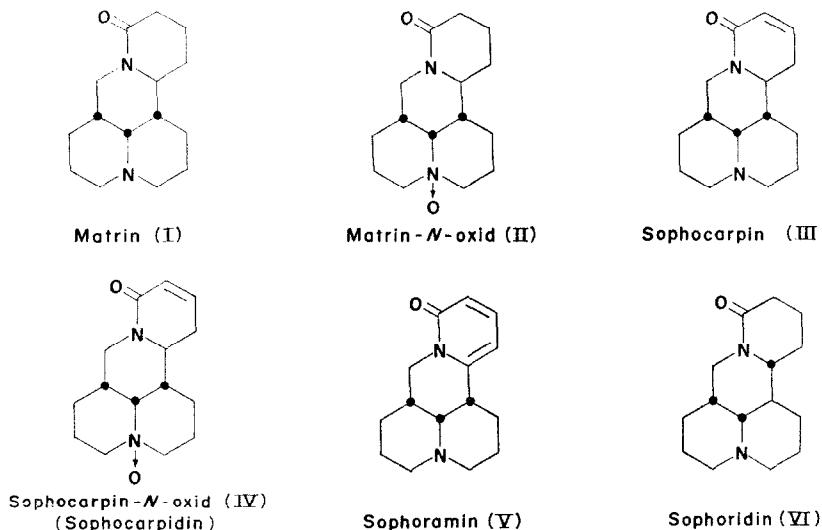
<sup>2</sup> H. R. SCHÜTTE, X. A. ASLANOV und C. SCHÄFER, *Arch. Pharm.* **295**, 34 (1962).

<sup>3</sup> H. R. SCHÜTTE, J. LEHFELD und H. HINDORF, *Liebigs Ann. Chem.* **685**, 194 (1965).

<sup>4</sup> S. SHIBATA und U. SANKAWA, *Chem. Ind.* 1161 (1963).

<sup>5</sup> B. A. ABDUSALAMOV, A. A. TAKANAEV, X. A. ASLANOV und A. S. SADYKOV, *Uzb. Biol. Zh.* **13** (2), 10 (1969); *Khim. Prirod. Soedin.* (1), 127 (1971); *Biokhimiya* **36**, 290 (1971), A. A. TAKANAEV und B. H. ABDUSALAMOV, *Uzb. Biol. Zh.* **15** (3), 20 (1971); *Chem. Abs.* **75**, 115946 (1971).

Die in Mittelasien beheimatete Leguminose *Sophora alopecuroides* L. enthält nach Angaben von Orechov<sup>6</sup> neben Matrin (I) eine Reihe weiterer Alkaloide, von denen Sophoridin (VI)<sup>7</sup> sowie (–)-Sophocarpin (III) und (–)-Sophoramin<sup>8,9</sup> inzwischen aufgeklärt worden sind. Dabei unterscheiden sich die Alkaloide der Matrinreihe I–V stereochemisch vom Sophoridin (VI) (Stereochemie vgl. z.B.<sup>10,11</sup>).



## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wir haben Untersuchungen zur Biosynthese und zum Stoffwechsel der Chinolizidin-alkaloide in *S. alopecuroides* L. durchgeführt.

Als erstes wurde Cadaverin-1,5-<sup>14</sup>C auf seinen Einbau in die verschiedenen Chinolizidin-alkaloide von *S. alopecuroides* überprüft. Tabelle 1 zeigt, daß diese für Chinolizidinalkaloide bekannte Vorstufe mit nur geringer spezifischer Inkorporationsrate eingebaut wird. Unter unseren Versuchsbedingungen wurde von den Pflanzen nur sehr wenig Precursor aufgenommen. Bei 6 Wochen alten Keimlingen beträgt die Einbaurate das Zehnfache im Vergleich zum Versuch mit älterem Pflanzenmaterial. Dieser Unterschied in der Inkorporationsrate bei jüngeren und älteren Keimlingen steht mit der Tatsache in Übereinstimmung, daß vielfach bei jüngeren Pflanzen höhere Werte beobachtet werden. Diese sind wahrscheinlich durch eine stärkere Synthesefähigkeit sowie eine geringere Alkaloidkonzentration bei Versuchsbeginn bedingt. Die geringe Inkorporationsrate könnte aber auch dadurch bedingt sein, daß der normale Biosyntheseweg direkt vom Lysin ausgeht und Cadaverin nicht unbedingt ein physiologisches Zwischenprodukt darstellt. Die gleiche Größenordnung der

<sup>6</sup> A. P. ORECHOV, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **66**, 948 (1933).

<sup>7</sup> F. RULKO und N. F. PROSKURNINA, *Zh. Obshch. Khim.* **31**, 308 (1961).

<sup>8</sup> N. F. PROSKURNINA und A. D. KUSOVKOV, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **91**, 1145 (1953).

<sup>9</sup> S. OKUDA, H. KAMATA, K. TSUDA und I. MURAKOSHI, *Chem. Ind.* 1326 (1962)

<sup>10</sup> F. BOHLMANN und D. SCHUMANN, in *The Alkaloids, Chemistry and Physiology* (Hrsg. R. H. F. MANSKE), Bd IX, s. 175. Academic Press, New York (1967).

<sup>11</sup> A. J. BEGISHEVA, X. A. ASLANOV, S. U. PETROTSCHENKO und A. S. SADYKOV, *Khim. Prirod. Soedin.* (1), 55 (1971); *Chem. Abs.* **74**, 112279 (1971).

Einbauraten in die einzelnen Alkaloide weist darauf hin, daß die Biosynthese dieser Basen wahrscheinlich auf analogen Wegen erfolgt. Wegen der niedrigen Radioaktivität der isolierten Alkaloide konnten keine Abbauexperimente durchgeführt werden.

TABELLE 1. CADAVERIN-1,5-<sup>14</sup>C VERFÜTTERT AN *Sophora alopecuroides* (A: 12 Wochen alt; B: 6 Wochen alt)

| Verbindung                     | Menge (mg) | F (°) | spezif. Radioaktivität (dpm/mMol) | spezif. Einbaurate (%) |
|--------------------------------|------------|-------|-----------------------------------|------------------------|
| <b>A</b>                       |            |       |                                   |                        |
| Cadaverin-1,5- <sup>14</sup> C | 21,35      | —     | $4,4 \times 10^9$                 | —                      |
| Sophocarpin                    | 34,5       | 52    | $6,1 \times 10^4$                 | 0,0014                 |
| Sophoridin                     | 13,0       | 108   | $2,8 \times 10^5$                 | 0,0063                 |
| Sophocarpidin                  | 30,0       | 203*  | $3,8 \times 10^5$                 | 0,0087                 |
| Matrin                         | 29,6       | 73    | $2,8 \times 10^4$                 | 0,00064                |
| <b>B</b>                       |            |       |                                   |                        |
| Cadaverin-1,5- <sup>14</sup> C | 19,5       | —     | $5,6 \times 10^9$                 | —                      |
| Sophoridin                     | 6,0        | 107   | $0,4 \times 10^7$                 | 0,074                  |

\* Pikrat.

Es ergibt sich die Frage, ob die verschiedenen Alkaloide von *S. alopecuroides* auf getrennten Wegen aus Cadaverin evtl. über ein weiteres gemeinsames Umsetzungsprodukt gebildet werden oder ob ein fertiges Matringerüst die Vorstufe für die genannten Basen darstellt. Zur Untersuchung dieser Frage haben wir Matrin-U-<sup>3</sup>H und Sophocarpin-U-<sup>3</sup>H an 12- bzw. 16-Wochen alte Keimlinge von *S. alopecuroides* verabreicht. Matrin-U-<sup>3</sup>H wird mit guter Einbaurate in Sophocarpin sowie in die N-Oxide von Matrin und Sophocarpin inkorporiert (Tabelle 2). Das zeigt, daß die Pflanzen imstande sind, die Dehydrierung zu Sophocarpin sowie die Bildung der N-Oxide durchzuführen. Sie können auch Sophocarpin zu Matrin hydrieren, wie in Tabelle 3 zu sehen ist.

TABELLE 2. MATRIN-U-<sup>3</sup>H VERFÜTTERT AN *Sophora alopecuroides*

| Alkaloid  | Menge (mg) | F (°) | spezif. Radioaktivität (dpm/mMol) | spezif. Einbaurate (%) |
|---|------------|-------|-----------------------------------|------------------------|
| Matrin-U- <sup>3</sup> H appliziert aufgenommen | 21         | 74    | $2,5 \times 10^{10}$              | —                      |
|   | 14         | —     | —                                 | —                      |
| Matrin isoliert                                 | 41         | 74    | $1,13 \times 10^9$                | 4,5                    |
| Sophocarpin isoliert                            | 20         | 52    | $5,8 \times 10^7$                 | 0,23                   |
| Matrin-N-oxid isoliert                          | 26         | 225*  | $4,80 \times 10^7$                | 0,19                   |
| Sophocarpin-N-oxid isoliert                     | 11         | 205*  | $3,65 \times 10^7$                | 0,14                   |
| Sophoridin isoliert                             | 18         | 107   | $7,73 \times 10^5$                | 0,003                  |

\* Pikrat.

Welche Bedeutung diese reversible Umwandlung zwischen Matrin und Sophocarpin für die Ausbildung des Alkaloidspektrums während der verschiedenen Vegetationsperioden hat, ist unklar.

Interessant erscheint, daß weder Matrin noch Sophocarpin in das stereochemisch einer anderen Reihe angehörende Sophoridin umgewandelt werden (Tabelle 2 und 3). Der Biosyntheseweg dieses Alkaloids muß sich vom Cadaverin aus schon auf einer früheren Stufe abzweigen.

TABELLE 3. SOPHOCARPIN-U-<sup>3</sup>H VERFÜTTERT AN *Sophora alopecuroides*

| Alkaloid   | Menge (mg) | F (°C)  | spezif. Radioaktivität (dpm/mMol) | spezif. Einbauraten (%) |
|--|------------|---------|-----------------------------------|-------------------------|
| Sophocarpin-U- <sup>3</sup> H appliziert aufgenommen | 18,3<br>15 | 52<br>— | $2,25 \times 10^{10}$<br>—        | —                       |
| Sophocarpin isoliert                                 | 24         | 52      | $3,29 \times 10^8$                | 1,46                    |
| Matrin isoliert                                      | 35         | 74      | $1,12 \times 10^8$                | 0,49                    |
| Sophocarpin-N-oxid isoliert                          | 48         | 204*    | $8,54 \times 10^6$                | 0,04                    |
| Sophoridin isoliert                                  | 21         | 107     | $5,7 \times 10^5$                 | 0,003                   |

\* Pikrat.

Es ist auffällig, daß die spezifische Einbaurate des Sophocarpins-U-<sup>3</sup>H in sein *N*-Oxid wesentlich niedriger liegt als die des Matrins-U-<sup>3</sup>H. Das könnte bedeuten, daß die *N*-Oxidbildung des Sophocarpins langsamer verläuft als die Reduktion zum Matrin. Möglicherweise wird auch Sophocarpin-*N*-oxid direkt aus dem Matrin-*N*-oxid gebildet. Beide Wege sind denkbar.

## EXPERIMENTELLES

*Radioaktiv markierte Precursoren und Messung der Radioaktivität.* Matrin-U-<sup>3</sup>H (spezif. Radioaktivität  $2,5 \times 10^{10}$  dpm/mMol) und Sophocarpin-U-<sup>3</sup>H (spezif. Radioaktivität  $2,2 \times 10^{10}$  dpm/mMol) wurden durch Wilzbach-Tritierung erhalten und von der Isocommerz GmbH Berlin-Buch bezogen. Zur Reinigung des Rohproduktes wurde nach Entfernen des labilen Tritiums durch mehrfaches Abdampfen mit Methanol das Alkaloid wiederholt umkristallisiert und dünnenschichtchromatographiert. Cadaverin-1,5-<sup>14</sup>C (spezif. Radioaktivität  $1,8 \times 10^9$  dpm/mMol) wurde aus Natriumcyanid-<sup>14</sup>C nach bekanntem Verfahren dargestellt.<sup>12</sup> Die radiochemische Reinheit der Precursoren und der isolierten Alkaloide haben wir mit dem Dünnenschichtscanner überprüft.

*Anzucht des Pflanzenmaterials und Fütterungstechnik.* Die Aussaat von *Sophora alopecuroides* L. erfolgte unter Gewächshausbedingungen in Erdkultur bei 15°. Zur Fütterung wurden die von der Erde befreiten Keimlinge in ein Becherglas gestellt, das 50 ml wäßrige Lösung des Precursors enthielt. Versuch 1. 80 16 Wochen alten Keimlinge 21,3 mg Cadaverin-1,5-<sup>14</sup>C angeboten; Fütterungszeit 96 hr; Aufnahme etwa 1% der angebotenen Radioaktivität. Versuch 2. 90 12 Wochen alte Keimlinge 72 hr mit 21 mg Matrin-U-<sup>3</sup>H gefüttert; Restaktivität 37%. Versuch 3. 80 16 Wochen alten Keimlinge 18,3 mg Sophocarpin-U-<sup>3</sup>H angeboten; Fütterungszeit 110 hr; Aufnahme des Precursors 92%.

*Isolierung der Alkaloide.* Das bei 50–60° getrocknete und pulverisierte Pflanzenmaterial (20–30 g Trocken-Gewicht) wurde mit wäßrigem NH<sub>3</sub> alkalisiert und erschöpfend mit MeOH extrahiert. Den nach Abdampfen des Lösungsmittels verbleibenden Rückstand haben wir mit 7%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aufgenommen, zweimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt und anschließend mit NH<sub>3</sub> alkalisiert. Nach Überführung der Alkaloide in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurde dieses abgedampft. Das verbleibende Rohalkaloidgemisch haben wir in MeOH aufgenommen und auf Dünnenschichtplatten (200 × 200 mm, Kieselgel HF<sub>252</sub> der Fa. Merck, Darmstadt, Schichtdicke 0,9 mm) aufgetragen (2–3 mg Alkaloidgemisch pro Platte). Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH (8:1). Die Platten wurden zweimal entwickelt. Das Sichtbarmachen der Alkaloidbanden erfolgte für Sophocarpin und sein *N*-Oxid im UV-Licht und im übrigen durch Besprühen mit Dragendorff-Reagens. An Hand von Testalkaloïden konnten folgende Banden zugeordnet werden: Sophocarpin, Matrin, Sophoridin, Matrin-*N*-oxid, Sophocarpin-*N*-

<sup>12</sup> H. R. SCHÜTTE, A. UNVERRICHT, J. LEHFELD, N. EBERLE und U. FISCHER, *Z. Chem.* **2**, 336 (1962).

oxid, Cytisin und *N*-Methylcytisin. Das Vorhandensein von Sophoramin konnte wahrscheinlich gemacht werden. Zwei Banden sind noch nicht identifiziert worden. Die *N*-Oxide von Matrin und Sophocarpin, die auch aus anderen *Sophora*-Arten<sup>10,13,14</sup> bekannt sind, wurden als Pikrate isoliert und durch ihren Schmelzpunkt sowie Mischschmelzpunkt mit authentischem Material charakterisiert. Sophocarpin wurde außerdem mit Zn-Staub und verd. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu Matrin reduziert. Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität wurden die UV-bzw. Dragendorff-positiven Banden von den DC-Platten abgekratzt, mit wäßrigem NH<sub>3</sub> alkalisiert und mit MeOH eluiert. Zur weiteren Reinigung sind die einzelnen Alkaloide bis zu dreimal rechromatographiert und ihre radiochemische Reinheit anschließend mit dem Dünnschichtscanner überprüft worden. Nach Elution wurden Matrin, Sophocarpin und Sophoridin aus Petroläther bis zur konstanten Radioaktivität umkristallisiert. Die beiden *N*-Oxide haben wir als Pikrate isoliert.

<sup>13</sup> X. A. ASLANOV, A. S. SADYKOV, U. N. SAINUTDINOV und J. K. KUSCHMURADOV, *Nauch. Tr. Tashkent Gos. Univ.* **286** (2), 63 (1966).

<sup>14</sup> U. N. SAINUTDINOV, X. A. ASLANOV, J. K. KUSCHMURADOV und A. S. SADYKOV, *Nauch. Tr. Tashkent Gos. Univ.* **341** (3), 117) (1968).