

Zur Physiologie und Biosynthese der Alkaloide von *Papaver somniferum*

VON GÜNTHER KLEINSCHMIDT UND KURT MOTHES *

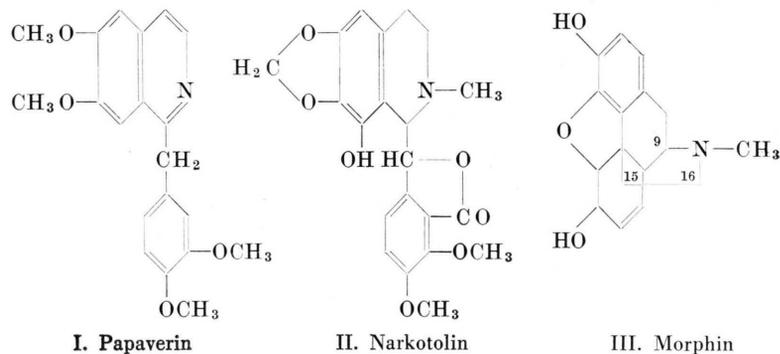
Aus der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Arbeitsstelle für Biochemie der Pflanzen in Halle

(Z. Naturforschg. 14 b, 52—56 [1959]; eingegangen am 22. Oktober 1958)

Isolierte Blätter, isolierte Kapseln und isolierter Milchsafte von *Papaver somniferum* vermögen bei Verabreichung von uniform markiertem [¹⁴C]-L-Tyrosin radioaktive Alkaloide zu bilden. Die Aktivität ist bei Verwendung dieser drei Organe bzw. Substrate in annähernd gleichem Verhältnis sowohl in die Alkaloide des Morphin- wie auch des Papaverin- und Narkotin-Typs eingebaut. Im Falle des Narkotins konnte weiter gezeigt werden, daß die Aktivität sich auf das Isochinolin- wie auch das Benzylsystem derart verteilt, daß angenommen werden kann, daß beide Ringsysteme unmittelbar dem Phenol-Ring des Tyrosins entstammen.

Trotz der großen Bedeutung der Opium-Alkaloide für die Entwicklung der Wissenschaft von den Pflanzenbasen und für die Therapie sind diese interessanten Inhaltsstoffe des Schlafmohns in biologischer und biochemischer Richtung nur wenig untersucht. Die bisher bekannten Alkaloide des Schlafmohns zeigen enge chemische Beziehungen zum Isochinolin. Ein einfacher Typ dieser Mohnalkaloide wird durch

das Papaverin (I) repräsentiert. Von diesem Alkaloid sagte bereits TRIER¹, daß man die Biosynthese einer solchen Substanz sich so vorstellen könne, daß zwei Moleküle Phenylalanin miteinander reagieren, wobei das eine Molekül zum Amin und das andere zum Aldehyd abgebaut wird. SCHÖPF und BAYERLE² haben 1934 gefunden, daß Dihydroxyphenyläthylamin, ein zellmögliches Produkt des Ab-



baues des Dihydroxyphenylalanins, und Acetaldehyd leicht in Norsalsolin übergehen. Weiterhin haben SCHÖPF und SALZER³ (1940) gefunden, daß Dihydroxyphenyläthylamin (IV) und Homopiperonal (V) zu einem Benzylisochinolin-Derivat (VI) kondensieren können. Vor kurzem teilten BATTERSBY und HARPER⁴ (1958) mit, daß nach Verfütterung von [α -¹⁴C]-L,D-Tyrosin über die Wurzeln intakter Mohnpflanzen aus diesen radioaktives Morphin (III) isoliert werden konnte, bei dem etwa die Hälfte der inkorporierten Aktivität im Kohlenstoffatom 16 fixiert

war. Die Autoren vermuten, daß die andere Hälfte im Kohlenstoffatom 9 lokalisiert ist. Damit wäre eine wichtige Stütze zu den Auffassungen, die TRIER und SCHÖPF von der Synthese der Opium-Alkaloide entwickelt haben, gegeben. Zweifellos macht die Erklärung der Biosynthese des Morphins größere Schwierigkeiten als die der einfachen Benzylisochinoline. Wir verweisen auf ROBINSON⁵, der die Möglichkeit der Überführung eines Benzylisochinolins in ein Alkaloid vom Morphintyp theoretisch behandelt hat. LEETE teilte uns vor wenigen Wochen

* Herrn Professor Dr. K. FELIX, Frankfurt/M., anlässlich der 70. Wiederkehr seines Geburtstages gewidmet.

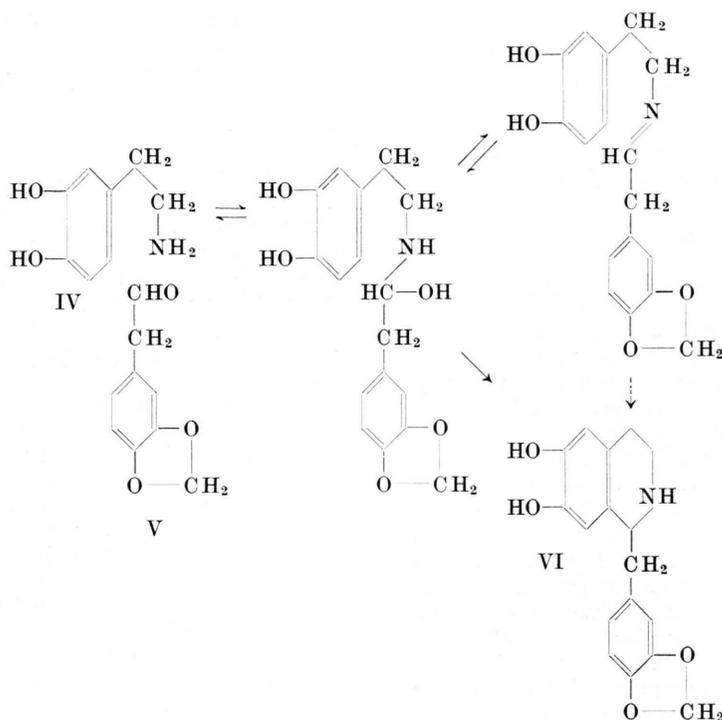
¹ G. TRIER, Über einfache Pflanzenbasen, Berlin 1912, S. 117.

² CL. SCHÖPF u. H. BAYERLE, Liebigs Ann. Chem. 513, 190 [1934].

³ CL. SCHÖPF u. W. SALZER, Liebigs Ann. Chem. 544, 1 [1940].

⁴ A. R. BATTERSBY u. B. J. T. HARPER, Chem. u. Ind. 1958, 364.

⁵ R. ROBINSON, The Structural Relations of Natural Compounds, Oxford 1955.



brieflich mit, daß er die Untersuchungen von BATTERSBY und HARPER bestätigen konnte. Seine Ergebnisse sind zum Druck gegeben. In unseren eigenen Untersuchungen haben wir uniform markiertes [^{14}C]-L-Tyrosin an isolierte Blätter, isolierte unreife Kapseln und aus der Pflanze isolierten Milchsaft verabreicht und in allen Fällen eine beachtliche Radioaktivität in den Alkaloiden, sowohl des Morphintyps als auch des Papaverin- und Narkotintyps festgestellt. Auf Grund dieser Untersuchungen können wir die Angaben von BATTERSBY und HARPER bestätigen und darüber hinaus aussagen, daß die Inkorporation des Tyrosins nicht nur in Alkaloide vom Morphintyp, sondern auch in Alkaloide des Benzylisochinolintyps erfolgt.

Unsere Experimente waren in erster Linie zu dem Zwecke angestellt worden, eine Aufklärung über den Biosyntheseort der Alkaloide des Mohns zu erhalten. Wir hofften, danach auch den Mechanismus der Biosynthese leichter einer Erklärung zuführen zu können. Über den Bildungsort der Mohnalkaloide haben sich in den letzten Jahren vor allem WEGNER^{6,7} sowie POETHKE und ARNOLD⁸ geäußert. Sie sind der Auffassung, daß die erhaltenen Ergebnisse

nicht gegen eine Biosynthese der Alkaloide in der Wurzel sprächen, ohne sich auf einen solchen alleinigen Bildungsort festzulegen. In bezug auf die Lokalisation der Synthese der Mohnalkaloide sind ferner die Versuche zur Biosynthese radioaktiver Alkaloide, die KUSIN und MERENOWA⁹ durchführten, von Interesse. Sie benutzten u. a. folgendes Verfahren: Abgeschnittene Mohnkapseln wurden mit einer Lösung von 50 μC Glycin in 100 ml Wasser 3 Tage ernährt. Die bei dieser Methode erzielte Ausbeute an radioaktiven Alkaloiden war ganz erheblich schlechter als bei der Fütterung intakter Mohnpflanzen. Es wäre aber falsch, daraus den Schluß zu ziehen, die Mohnkapseln seien, wenn überhaupt, dann nur im untergeordneten Maße zur Alkaloidsynthese befähigt. Unsere Fütterungsversuche mit isolierten Blättern und isolierten Früchten haben ein klares und eindeutiges Ergebnis geliefert, wonach die Synthese dieser Alkaloide in diesen isolierten Organen möglich ist. Da es darüber hinaus gelungen ist, in isoliertem Latex die Synthese zu erzwingen, darf man wohl schließen, daß alle Organe, die Milchröhren führen, zur Bildung der Alkaloide des Schlafmohns befähigt sind. Natürlich eröffnet diese erstmalig ge-

⁶ E. WEGNER, Pharmazie **6**, 420 [1951].

⁷ E. WEGNER, Pharmazie **8**, 839 [1953].

⁸ W. POETHKE u. E. ARNOLD, Pharmazie **6**, 406 [1951].

⁹ A. M. KUSIN u. W. J. MERENOWA, Biochimija **19**, 616 [1954].

fundene Synthese im Latex neue Möglichkeiten, den fermentativen Charakter der einzelnen Schritte der Biosynthese dieser Alkaloide zu erforschen, womit wir beschäftigt sind.

Experimenteller Teil

I. Blattversuch

Jungen Blättern (von 4 Wochen alten Pflanzen entnommen) wurde uniform markiertes [^{14}C]-L-Tyrosin verfüttert. Die Applikation des Tyrosins erfolgte als Hydrochlorid in wäßriger Lösung im Transpirationsstrom der Blätter. 3 Blätter erhielten zusammen $30\ \mu\text{C}$ L-Tyrosin-Hydrochlorid, das eine spezifische Aktivität von $11,6\ \text{mC/mM}$ besaß. Dieser Fütterungsversuch dauerte 48 Stunden. Nach Abtöten bei 100° und Trocknung des Materials bei 80° wurde es fein pulverisiert, mit NH_4OH versetzt und mit einem Gemisch von 80 ml Methylenchlorid, 40 ml Äther und 15 ml Methanol im Perkulationsrohr extrahiert. Aus diesem Extrakt wurden die Alkaloide zweimal mit je 40 ml 1-proz. HCl ausgeschüttelt. Die vereinigten salzsauren Lösungen wurden ammoniakalisch gemacht und dreimal mit je 30 ml eines Gemisches von Chloroform und Isopropanol (3+1) ausgeschüttelt. Dieser Extrakt wurde auf dem Wasserbad zur Trockne aufgedampft, und der Alkaloidrückstand papierchromatographisch nach der Rundfiltertechnik aufgetrennt (Papier: Schleicher & Schüll 2043 b, mit Zitronensäure-Phosphat nach McIlvaine gepuffert; mobile Phase n-Butanol, wassergesättigt). Da bei diesen Verfahren Narkotolin, Narkotin und Papaverin die gleichen R_f -Werte besitzen, wurden sie nach Elution vom Papier einer weiteren Trennung unterworfen. Narkotolin wurde auf Grund seines phenolischen Charakters ab-

Alkaloid	Imp/min	Einbaurrate [%]	prozentuale Verteilung der Aktivität
Morphin	260	0,012	9,5
Codein	790	0,0365	28,5
Thebain	360	0,0165	13,0
Narkotolin	500	0,024	30,0
Narkotin	460	0,021	10,5
Papaverin	370	0,017	8,5
	2740	0,127	100,0

Tab. 1. Einbau der ^{14}C -Radioaktivität von uniform markiertem Tyrosin in Alkaloide durch isolierte Mohnblätter.

getrennt, während Narkotin und Papaverin durch Papierchromatographie mit wassergesättigtem Äther (absteigende Technik) getrennt wurden. — Die Lage der radioaktiv markierten Alkaloide wurde durch Autoradiographie auf Röntgenfilm festgestellt (Abb. 1*). Die Papierzonen, die die verschiedenen Alkaloide enthielten, wurden herausgeschnitten und die Alkaloide mit 3-proz.

* Abb. 1 s. Tafel S. 48 b.

HCl quantitativ eluiert. Die daraus gewonnenen Alkaloidbasen wurden auf Aluminiumschalen aufgetragen und die Aktivität mit einem Geiger-Müller-Zählrohr (Fensterdicke $1,03\ \text{mg/cm}^2$) gemessen. Der Null-effekt betrug bei allen Messungen 35 Imp./min im Durchschnitt.

Ein Testpräparat von $0,1\ \mu\text{C}$ [^{14}C]-L-Tyrosin lieferte unter den gleichen Meßbedingungen — Abstand des Präparates vom Zählrohrfenster $d=13\ \text{mm}$ — 7200 Imp./min. Daraus errechnet sich für die Summe aller erfaßten Alkaloide eine Gesamt-Einbaurrate von 0,127% der verabreichten Aktivität.

II. Kapselversuch

In der gleichen Weise wurde drei Kapseln (Alter: 8 Tage nach dem Abblühen) $46\ \mu\text{C}$ L-Tyrosin-Hydrochlorid in 2,3 ml Wasser gelöst verfüttert. Es war nötig, die aktive Aminosäure (0,87 mg) in dieser geringen Flüssigkeitsmenge gelöst zu verabreichen, da eine größere Menge in kurzer Zeit von der Kapsel nicht aufgesaugt werden kann. Nach 24 Stdn. war die [^{14}C]-L-Tyrosin-Lösung von jeder Kapsel aufgesogen. Es wurde mit wenig Wasser — 0,5 ml pro Kapsel — nachgespült. Die Analyse wurde nach 4 Tagen ausgeführt. Die Alkaloide wurden in der oben beschriebenen Weise extrahiert, getrennt und zur Messung gebracht.

Alkaloid	Imp/min	Einbaurrate [%]	prozentuale Verteilung der Aktivität
Morphin	1040	0,033	10,2
Codein	1830	0,058	18,0
Thebain	2400	0,077	23,8
Narkotolin	1680	0,054	16,8
Narkotin	1100	0,035	10,9
Papaverin	2050	0,066	20,3
	10100	0,323	100,0

$d=14\ \text{mm}$, Testpräparat $0,1\ \mu\text{C}$: 6810 Imp./min.

Tab. 2. Einbau der ^{14}C -Radioaktivität von uniform markiertem Tyrosin in Alkaloide durch isolierte junge Mohnkapseln.

III. Versuch mit Milchsaft

1 g frisch isolierter Milchsaft wurde mit einer Lösung von $10\ \mu\text{C}$ [^{14}C]-L-Tyrosin-Hydrochlorid in 0,5 ml Wasser versetzt, geschüttelt und im verschlossenen Gefäß 7 Tage bei 18°C der Reaktion überlassen.

Nach der Extraktion mit Chloroform-Isopropanol (3+1) wurden die Alkaloide in der schon beschriebenen Weise papierchromatographisch getrennt und zur Messung gebracht.

Die Einbaurrate ist als hoch zu bezeichnen; eine Verschmierung der Aktivität hat kaum stattgefunden. Wir haben in den Säureamiden Asparagin und Glutamin und in einigen Kohlenhydraten eine sehr geringe Aktivität mit Hilfe der Autoradiographie nachweisen können, die aber in keinem Verhältnis zu der hohen

Alkaloid	Imp/min	Einbaurrate [%]	prozentuale Verteilung der Aktivität
Morphin	495	0,069	18,7
Codein	660	0,092	24,8
Thebain	440	0,061	16,5
Narkotolin	415	0,057	15,4
Narkotin	260	0,036	14,7
Papaverin	395	0,055	9,9
	2665	0,370	100,0

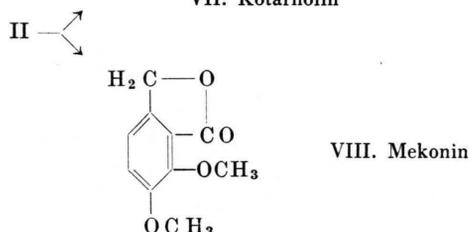
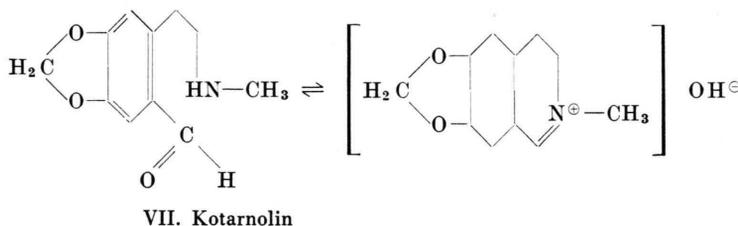
$d=13$ mm, Testpräparat $0,1 \mu\text{C}$: 7200 Imp/min.

Tab. 3. Einbau der ^{14}C -Radioaktivität von uniform markiertem Tyrosin in Alkaloide durch frisch isolierten Milchsafte des Mohns.

Aktivität der Alkaloide stand. Vielleicht handelt es sich bei diesen Spuren eingebauter Aktivität um Pro-

dukte der aus dem Tyrosin abgespaltenen Carboxylgruppe.

Um zu erfahren, ob die Aktivität sowohl in den Isochinolinring wie in das Benzylsystem der Alkaloide eingebaut ist, haben wir Narkotolin (II) isoliert und hydrolytisch nach dem Verfahren von PFEIFER und WEISS¹⁰ zu Kotarnolin (VII) und Mekonin (VIII) gespalten. Theoretisch müßte bei einer Inkorporation des Tyrosins in alle Ringsysteme des Narkotolins auf das Kotarnolin 56% und auf das Mekonin 44% der Aktivität entfallen. Nach unseren Messungen beträgt das Verhältnis 52% zu 48 Prozent. Daraus sind wir geneigt zu schließen, daß das Ringsystem der Benzylisochinolin-Alkaloide aus zwei Molekeln Tyrosin oder einem verwandten Stoff aufgebaut wird, entsprechend den Vorstellungen von TRIER, SCHÖFF und ROBINSON. Ein endgültiger Beweis kann natürlich allein durch eine Positionsklärung der Aktivität in den einzelnen Kohlenstoffatomen erfolgen, womit BATTERSBY und HARPER einen Anfang gemacht haben.



Diskussion

Über die Bestätigung der Veröffentlichung von BATTERSBY und HARPER hinaus erscheint uns nicht nur die Erweiterung dieser Vorstellungen auf die Benzylisochinoline von Bedeutung, weil damit gesagt werden kann, daß offenbar die große Zahl von Alkaloiden des Schlafmohns aus der gleichen Ausgangssubstanz, vermutlich dem Tyrosin oder einer verwandten Substanz, entstehen. Es müssen also eine Fülle von Möglichkeiten in der Mohnpflanze vorbestimmt sein, die die Synthese der Alkaloide vom gleichen Reaktionspartner gleichzeitig in verschiedene Richtungen gestatten. Dabei ist zu beachten, daß beim Vergleich der verschiedenen Organe ein wesentlicher Unterschied in der prozen-

tualen Verteilung der Aktivität in der Gruppe der Morphinalkaloide und der Alkaloide des Benzylisochinolin-Typs nicht besteht, wenn man nicht die unwesentliche Bevorzugung der Morphingruppe bei dem Versuch mit isoliertem Milchsafte hoch einschätzen will. Selbstverständlich gelten diese Ergebnisse zunächst für die von uns benutzten Entwicklungsstadien und für unsere Sorte von *Papaver somniferum*. Da aber nunmehr festgestellt ist, daß die Synthese der Alkaloide im Latex selbst erfolgen kann, ist es tatsächlich nicht unwahrscheinlich, daß in allen Teilen der Pflanze die Alkaloidsynthese in ähnlicher Weise vor sich geht, auch bei quantitativer Betrachtung. Worauf die gelegentlichen Unterschiede im Alkaloidspektrum bei einzelnen Organen beruhen, wäre noch zu untersuchen. Es könnten sekundäre Reaktionen, die mit dem Alterungsstoffwechsel zu-

¹⁰ S. PFEIFER u. F. WEISS, Arch. Pharmaz. **289**, 24 [1956].

sammenhängen, das primäre Verhältnis der Alkaloide verändern. Das Wesentliche erscheint uns zu sein, daß der Milchsafte zur Überführung einer proteinogenen Aminosäure in ein kompliziertes Gemisch von Alkaloiden befähigt ist. Der Milchsafte gehört zu den eigentümlichsten Erzeugnissen der Pflanzenwelt. Schon die Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Milchsaftebehälter ist ganz ungewöhnlich. Aber auch der Milchsafte als Inhalt einer Zelle unterscheidet sich von dem Inhalt der normalen Pflanzenzellen außerordentlich. Ein zerklüftetes, nicht scharf vom Zellsafte abgetrenntes Plasma besitzt eine außerordentlich hohe Aktivität verschiedenster Fermente, einen hohen Gehalt an interessanten Pflanzenstoffen, so daß allein schon die Tatsache, daß sich eine relative Viskosität mit einem sehr hohen Trockengewicht paart, von besonderem Interesse ist. Nun erweist sich, daß dieser Milchsafte zu besonderen chemischen Leistungen befähigt ist und nicht etwa nur ein Organ zur

Aufnahme von Stoffwechselprodukten ist, sondern diese „Stoffwechselendprodukte“ selbst zu bilden in der Lage ist.

Einer besonderen Klärung bedürftig bleibt der Befund, daß die Inkorporation der Radioaktivität in den einzelnen Alkaloiden wesentlich von dem Verhältnis abweicht, das diese Alkaloide in der Pflanze einnehmen. So machen Papaverin oder Thebain oder Codein weniger als 10% der Gesamtalkaloide aus und Morphin mehr als 50 Prozent. Dennoch ist die absolute Inkorporation von ^{14}C nicht wesentlich verschieden. Es wäre möglich, daß der Entwicklungszustand zur Zeit des Versuches entscheidend für diese Divergenzen ist.

Wir danken Herrn Professor Dr. F. WEYGAND, bisher Berlin-Charlottenburg, Institut für Organische Chemie der Technischen Universität, jetzt München, Technische Hochschule, für seine freundliche Unterstützung und Förderung unserer Arbeit.

Zur mathematischen Behandlung multiplikativer Verteilungsverfahren

IV. Mitt.: Die Gewinnung von exakten Formeln mit Hilfe von Methoden der linearen Algebra

VON WOLFGANG BÖRSCH-SUPAN

Aus dem Institut für Praktische Mathematik der Technischen Hochschule Darmstadt
(Z. Naturforschg. 14 b, 56—67 [1959]; eingegangen am 19. Juli 1958)

Die mathematische Behandlung multiplikativer Verteilungsverfahren mit Hilfsmitteln der linearen Algebra führt zu exakten Formeln für die Substanzverteilung in jedem Zeitpunkt eines Verteilungsprozesses und für die stationäre Endverteilung. Diese Formeln gestatten es, insbesondere die Annäherung an den Endzustand der Batterie ohne Schwierigkeiten zu untersuchen. Die Eignung der einzelnen Formeln zum numerischen Rechnen wird diskutiert. Mit ihrer Hilfe gewonnene Zahlentafeln für die W a t a n a b e - M o r i k a w a - Verteilung werden angegeben.

HECKER¹ hat in dieser Zeitschrift ausführliche Formeln für die Craig-Verteilung und die O'Keefe-Verteilung angegeben und hergeleitet. Voraussetzungen für die Aufstellung geschlossener Formeln sind dabei der Nernstsche Verteilungssatz sowie ein systematisches Verteilungsschema, dessen Einzelschritte formelmäßig beschrieben werden können. HECKER geht aus vom Anfangszustand der Verteilungsbatterie und kann dann durch sukzessive Anwendung der Formeln für den Einzelschritt die Verteilung der Substanzmengen im Laufe eines Verteilungsprozesses verfolgen. Die Entnahme von Substanz an den Enden der Batterie bringt dabei Korrekturglieder ins Spiel, die sich allerdings nur auf einen Teil der Fraktionsnummern auswir-

ken. Bei wiederholter Substanzzufuhr überlagern sich die so gewonnenen Verteilungen mit zeitlicher Phasenverschiebung. Man erhält so ziemlich komplizierte Formeln, die erst bei Vernachlässigung von Korrekturgliedern wieder übersichtlich werden. Die gefundenen Formeln erfordern eine besonders große Rechenarbeit, wenn man sich für den Zustand der Verteilungsbatterie nach einer großen Anzahl von Verteilungsschritten interessiert, also vor allem, wenn man die Art und Weise der Annäherung an den stationären Endzustand untersuchen will. Man ist daher insbesondere in diesem Fall an einfachen Formeln interessiert. Die folgenden Überlegungen zeigen, wie man auf andere Weise zu Formeln gelangen kann, die mancherlei Vorteile bieten.

Kann man eine Anfangsverteilung aus mehreren Einzelverteilungen additiv zusammensetzen, so ist

¹ E. HECKER, Z. Naturforschg. 12 b, 519 [1957].