

## Über die Biosynthese einiger Alkaloide

von Catharanthus roseus G.Don.

D.Gröger, K.Stolle und K.Mothes

Institut für Biochemie der Pflanzen der DAW zu Berlin,Halle(Saale)

(Received 24 July 1964)

Durch die Isolierung des Vincaleukoblastins (1,2), des ersten Indol-alkaloids mit cytostatischer Wirkung, ist das Interesse an den spezifischen Inhaltsstoffen der Gattung Catharanthus beträchtlich gestiegen.

So konnten in den letzten Jahren allein aus *C.roseus*, syn.*Vinca rosea* L. über 50 Alkaloide isoliert werden. Strukturell sind nur wenige davon aufgeklärt, u.a. die beiden onkolytisch wirkenden dimeren Alkaloide Vincaleukoblastin und Leurocristin (3,4).

Nach SVOBODA et al.(5) lassen sich die Catharanthus-Alkaloide in drei Gruppen einteilen: 1. dimere Indol-Indolinin-Alkaloide, 2. monomere Alkaloide mit einem Mol.Gew. zwischen 325 -500, 3. symmetrische dimere Alkaloide, vornehmlich Dihydroindole. Soweit bekannt, gehören alle Alkaloide dem Indol-Typ an.

Die Biochemie und Physiologie der Catharanthus-Alkaloide ist bisher kaum untersucht worden, insbesondere ist für deren Biosynthese, den Bildungsort und die Ontogenie der Alkaloide nichts bekannt. Um erste Einblicke in die Biosynthese zu gewinnen, verfütterten wir daher verschiedene als Precursoren in Frage kommende Substanzen an junge Catharanthus-Pflanzen.

Experimentelles: Markierte Verbindungen. 1. DL-Tryptophan- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  (Amersham) wurde mit L-Tryptophan verdünnt; Spez.Aktivität des applizierten Tryptophans:  $5,1 \times 10^8$  Ipm/mMol. 2. Na-acetat- $1$ - $^{14}\text{C}$ ; Spez.Aktivität  $4,48 \times 10^8$  Ipm/mMol. 3. Na-acetat- $2$ - $^{14}\text{C}$ ; Spez.Aktivität  $1,52 \times 10^9$  Ipm/mMol.

Applikation. Samen von *Catharanthus roseus* (eigene Ernte) wurde am 18.2.1964 im Gewächshaus ausgesät. Die Applikation der markierten Verbindungen erfolgte an dreieinhalb Monate alte Pflanzen und wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt: Nach Abtrennung der Wurzeln wurden a) die Sprosse in die radioaktiven Lösungen eingestellt oder wurde b) die Mittelrippe eines Blattes in die radioaktiven Lösungen eingetaucht. Bei der Sprossfütterung waren die angebotenen Substanzen innerhalb von 12<sup>h</sup> und bei der Mittelrippenfütterung nach 36<sup>h</sup> von den Pflanzen aufgenommen worden. Bis zum Ende des Versuches (Versuchsdauer siehe Tab. 1a und 2a) wurde jeweils mit Wasser nachgespült.

Aufarbeitung. Nach der Trennung in Stengel und Blätter wurde das Pflanzenmaterial bei 60° getrocknet. Die Alkaloide wurden nach dem Schema von SVOBODA et al. (6) extrahiert. Die Auftrennung des Alkaloidgemisches der Fraktionen E und A 1 wurde mittels der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G "Merck", Adsorbens wurde mit 0.5 % KOH angerührt) durchgeführt. Die Platten entwickelten wir mit Äthylacetat. Die Zonen von Vindolin, Vindolinin und Catharanthin wurden ausgeschabt und die Alkaloide mit einer Mischung von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Methanol (4:1) aus dem Adsorbens eluiert. Die Rechromatographie der einzelnen Alkaloide erfolgte ebenfalls auf Kieselgel G-Platten unter Verwendung von Chloroform: Aceton (9:1) als mobile Phase. Die Alkaloide wurden bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt. Es sei darauf hingewiesen, daß im Stengel bei unserem Pflanzenmaterial ein Gemisch von Vindolin und Vindorosin im Verhältnis 3:1 vorliegt, wie papierchromatographische Untersuchungen nach der Methode von MOZA und TROJANEK (7) ergaben. Beide Alkaloide ließen sich dünn-schichtchromatographisch nicht trennen. Vindorosin unterscheidet sich vom Vindolin durch das Fehlen einer Methoxygruppe. Es verhält sich bei der kolorimetrischen Bestimmung wie Vindolin, so daß auf eine getrennte Bestimmung verzichtet wurde. In den Blättern haben wir kein Vindorosin nachweisen können.

Zur quantitativen Alkaloidbestimmung wurde nach einer von GRÖGER und STOLLE (8) angegebenen Methode gearbeitet. Alle Radioaktivitätsmessungen wurden mit dem Methandurchflusszähler der Firma Frieseke u. Höpfner durchgeführt.

Ergebnisse: Die Resultate der Fütterungsversuche sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt. Es geht daraus hervor, daß Sprosse junger Catharanthus-Pflanzen zur Alkaloidsynthese befähigt sind. Wie schon für eine Reihe anderer Indolalkaloide (Mutterkorn-, Rauwolfia-, Harman-Alkaloide) (9) bewiesen wurde, so ist Tryptophan auch für einige Catharanthus-Alkaloide ein ausgezeichnete Precursor. Die spezifischen Einbauraten der drei aus Blättern isolierten Alkaloide sind ungefähr gleich (Tab. 1a und b), und liegen ungewöhnlich hoch, so daß man annehmen möchte, daß Tryptophan auch ein begrenzender Faktor der Alkaloidsynthese ist.

Auch Acetat-1-<sup>14</sup>C und Acetat-2-<sup>14</sup>C werden inkorporiert, wie aus den Tabellen 2a und b hervorgeht. Die spezifischen Einbauraten sind jedoch durchweg geringer als nach Tryptophanverfütterung, aber trotzdem ebenfalls beachtlich hoch. Wir neigen zur Annahme, daß Acetat direkt an der Biosynthese beteiligt ist und nicht oder nicht nur über Zwischenstufen in die Alkaloide eingebaut wird. Über die Aktivitätsverteilung in den einzelnen Alkaloiden können wir noch keine Aussagen machen. Abbauprobe zur Positionsklärung sind im Gange.

Außerordentlich bemerkenswert sind die sehr unterschiedlichen spezifischen Einbauraten in den Blättern und Stengeln. Das ist sowohl nach Verfütterung von Tryptophan als auch nach Applikation von Acetat der Fall. Selbst wenn man die Vorstufen direkt an das Blatt appliziert, findet man stets im Stengel die höchsten Einbauraten. Diese Befunde deuten darauf hin, daß der Stengel eine beträchtliche Syntheseaktivität besitzt und vermutlich der "Hauptbildungsort" für einige Catharanthus-Alkaloide ist.

a	b		c	Vindolin	
Appliziert wurde Tryptophan- $\beta$ - $^{14}\text{C}$ ( $5.1 \times 10^8$ Ipm/mMol)	Pflanzenteil	Trocken- gewicht g	Spezifische Aktivität Ipm/mMol	Spezifische Aktivität Ipm/mMol	Einbeurteile %
1.6 mg an 2 Sprosse über	Blatt	0.4	$1.3 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$	2.7
Stengel gefüttert 3-Tage-Versuch	Stengel	0.16	$1.66 \times 10^8$	$1.66 \times 10^8$	32.5
6.4 mg an 8 Sprosse über	Blatt	2.15	$2.19 \times 10^7$	$2.19 \times 10^7$	4.3
Stengel gefüttert 11-Tage-Versuch	Stengel	0.95	$9.35 \times 10^7$	$9.35 \times 10^7$	18.3
4.0 mg an 5 Sprosse über	Blatt	1.69	$5.28 \times 10^6$	$5.28 \times 10^6$	1.03
Mittelrippe eines Blattes gefüttert 11-Tage-Versuch	Stengel	0.69	$3.3 \times 10^7$	$3.3 \times 10^7$	6.5

Tab. 1a : Der Einbau von Tryptophan- $\beta$ - $^{14}\text{C}$  in Vindolin

a siehe Tabelle 1a	b Pflanzenteil	c siehe Tabelle 1a	Vindolinin Spezifische Aktivität Ipm/mMol	Spezifische Einbeurteilung %	Catharanthin Spezifische Aktivität Ipm/mMol	Spezifische Einbeurteilung %
2	Blatt Stengel	↕	$2.03 \times 10^7$ n.b. +)	4.0 n.b.	$1.7 \times 10^7$ n.b.	3.3 n.b.
3	Blatt Stengel	↘	$1.33 \times 10^7$ n.b.	2.6 n.b.	$7.7 \times 10^6$ n.b.	1.51 n.b.

Tab. 1b : Der Einbau von Tryptophan - $\beta$ - $^{14}$ C in Vindolinin und Catharanthin

+) n.b. = nicht bestimmt

a	b	c	V i n d o l i n Spezifische Aktivität Ipm/mMol	Spezifische Einbaurrate %
Appliziert wurde Na-acetat-1- <sup>14</sup> C =(I) 4,48 x 10 <sup>8</sup> Ipm/mMol Na-acetat-2- <sup>14</sup> C =(II) 1,52 x 10 <sup>9</sup> Ipm/mMol	Pflanzenteil	trocken- gewicht g		
1	Blatt Stengel	2.47 1.16	8.7 x 10 <sup>6</sup> 3.6 x 10 <sup>7</sup>	1.94 8.0
2	Blatt Stengel	1.33 0.92	4.2 x 10 <sup>6</sup> 1.06 x 10 <sup>7</sup>	0.93 2.3
3	Blatt Stengel	2.3 1.1	1.02 x 10 <sup>7</sup> 1.02 x 10 <sup>8</sup>	0.67 7.1
4	Blatt Stengel	1.25 0.68	5.8 x 10 <sup>6</sup> 1.9 x 10 <sup>7</sup>	0.38 1.2

 Tab. 2a : Der Einbau von Na-acetat-1-<sup>14</sup>C und Na-acetat-2-<sup>14</sup>C in Vindolin.  
 Versuchsdauer 11 Tage.

a siehe Tabelle 2a	b Pflanzenteil	c siehe Tabelle 2a	Vindolinin Spezifische Aktivität Ipm/mMol	Spezifische Einbaurrate %	Catharanthin Spezifische Aktivität Ipm/mMol	Spezifische Einbaurrate %
1	Blatt		$4.4 \times 10^6$	0.98	$4.73 \times 10^6$	1.0
2	Blatt		$2.9 \times 10^6$	0.65	$3.73 \times 10^6$	0.85
3	Blatt		$1.48 \times 10^7$	0.97	$6.56 \times 10^6$	0.43
4	Blatt	↘	n.b. +)	n.b.	$5.84 \times 10^6$	0.38

Tab. 2b : Der Einbau von Na-acetat- $1-^{14}\text{C}$  und Na-acetat- $2-^{14}\text{C}$  in Vindolinin und Catharanthin.  
+) n.b. = nicht bestimmt.

Literatur

1. R.L.Noble, C.T.Beer und J.H.Cutts, Ann. N.Y.Acad.Sci. 76, 882  
(1958)
2. N.Neuss, M.Gorman, G.H.Svoboda, G.Maciak und C.T.Beer,  
J.Amer.chem.Soc. 81, 4754 (1959)
3. P.Bommer, W.McMurray und K.Biemann, J.Amer.chem.Soc. 86, 1439 (1964)
4. N.Neuss, M.Gorman, W.Hargrove, N.J.Cone, K.Biemann, G.Büchi  
und R.E.Manning, J.Amer.chem.Soc. 86, 1440 (1964)
5. G.H.Svoboda, M.Gorman, A.J.Barnes Jr. und Th.Oliver,  
J.pharmac.Sci. 51, 518 (1962)
6. G.H.Svoboda, N.Neuss und M.Gorman, J.Amer.pharmac.Assoc.  
Sci. Ed. 48, 659 (1959)
7. B.K.Moza und J.Trojanek, Coll.czechoslovak.Chem.Comm. 28,  
1419 (1963)
8. D.Gröger und K.Stolle, Arch.Pharmaz. (im Druck)
9. Übersicht: K.Mothes und H.-R.Schütte, Angew.Chem. 75, 357 (1963)