

POLYACETYLENVERBINDUNGEN IN GEWEBEKULTUREN VON *CENTAUREA RUTHENICA* LAM.

R. JENTE

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität, Berlin

(Received in Germany 26 February 1971; Received in the UK for publication 22 March 1971)

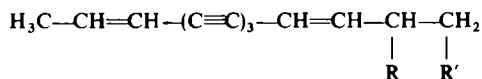
Meinem Lehrer Herrn Prof. Dr. F. Bohlmann zum 50. Geburtstag.

Abstract—Though polyacetylenic compounds of the types I, II and III can be found in plants of *Centaurea ruthenica* Lam., the polyacetylenes IV and XVI exist in tissue cultures of this plant in very low concentrations. Feeding experiments with the radioactive precursors V, VII, IX, XIIb verify the structures supposed by results of UV-spectroscopy and TLC. Coincidentally, the biogenesis of the acetylene IV from the precursor XIIb is proved. There are biogenetic relationships between the polyacetylenes of the plant and of the tissue culture.

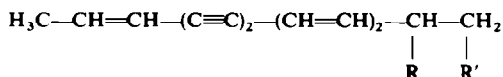
Zusammenfassung—Während in Pflanzen *Centaurea ruthenica* Lam. Polyacetylenverbindungen der Typen I, II und III vorkommen, findet man in Gewebekulturen dieser Pflanze die Polyine IV und XVI in sehr geringen Konzentrationen. Fütterungsversuche mit den radioaktiven Vorstufen V, VII, IX, XIIb bestätigen die durch UV-Messung und Dünnschichtchromatographie vermuteten Strukturen. Gleichzeitig wird dabei die Biogenese von Verbindung IV aus XIIb bewiesen. Es bestehen biogenetische Beziehungen zwischen den Polyacetylenverbindungen in der Pflanze und der Gewebekultur.

IN ANGIOSPERMEN, vor allem in den Familien Compositae und Umbelliferae, sind Polyacetylenverbindungen weit verbreitet.¹⁻⁴ doch kommen sie auch in niederen Pflanzen, insbesondere Basidiomyceten-Arten, vor.^{1,4} Es war nun naheliegend zu untersuchen, in welchem Ausmass Gewebekulturen aus höheren Pflanzen zur Polyinbildung befähigt sind.

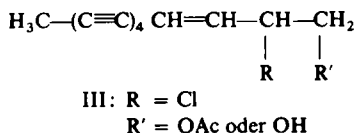
Eine an Polyin-Inhaltsstoffen reiche Pflanze stellt *Centaurea ruthenica* Lam. aus der Tribus Cynareae dar.^{5,6} In den Wurzeln kommen als Hauptpolyine Verbindungen vom Typ I in einer Konzentration bis zu nahezu 0.5% des Frischgewichtes vor, daneben Verbindungen vom Typ II. In den oberirdischen Teilen ist die Konzentration an Acetylenverbindungen eine Zehnerpotenz geringer; man findet dort neben Verbindungen vom Typ I die analogen Tetrain-en-Derivate vom Typ III.



I: R = Cl; OAc; OH
R' = OAc, OH



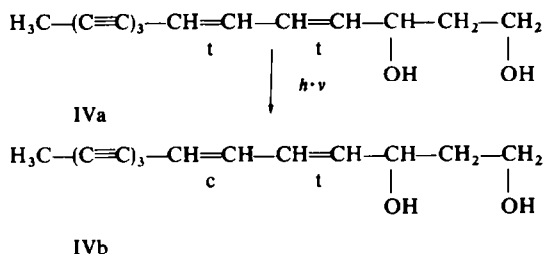
II: R = R' = OH
R = R' = OAc



Sowohl von den Blättern als auch von den Wurzeln liessen sich auf Agarnährböden⁷ Gewebekulturen gewinnen und fortpflanzen. Es sind zwei verschiedene Kulturbedingungen eingehalten worden: Wachstum im Licht-Dunkel-Wechsel (12:12 Stdn.) bei Raumtemperatur und Wachstum unter Lichtausschluss bei 25°.

Während in den Ätherextrakten der oberirdischen Teile und der Wurzeln von *Centaurea ruthenica* die Polyine aufgrund ihrer charakteristischen, empfindlichen UV-Spektren¹ erkennbar sind, zeigt der Ätherextrakt vom Kallus allgemein kein Polyin-Spektrum. Erst nach chromatographischer Auftrennung des Extraktes von Licht-Dunkel-Kallus auf einer präparativen Dünnschichtplatte und Eluieren weisen zwei Zonen UV-Spektren mit charakteristischen Polyin-Maxima auf. Erstaunlicherweise findet man nicht das erwartete En-triin-en-Spektrum vor, sondern den Triin-dien-Chromophor.¹

Wegen der sehr geringen Menge dieser natürlichen Polyacetylenverbindungen (Konzentration im Normalkallus maximal $5 \cdot 10^{-5}\%$ des Frischgewichtes) ist eine Strukturaufklärung durch NMR-, IR- und Massenspektroskopie nicht durchführbar. Die Strukturen können durch dünn-schichtchromatographischen Vergleich mit entsprechenden Testsubstanzen zunächst wahrscheinlich gemacht werden. Danach hat die weniger polare Substanz den gleichen R_f -Wert wie der Alkohol XVI, die stärker polare wie das Diol IVb, welches durch UV-Bestrahlung aus IVa erhältlich ist. IVa lässt sich über die Wittig-Reaktion synthetisieren.^{8,9}



IVa^{2,10} und XVI^{2,11} sind wiederholt aus Pflanzen der Tribus Cynareae isoliert worden, doch kommen sie stets in geringer Konzentration vor.

Bisher ist es noch nicht gelungen, aus den Gewebekulturen, die unter Ausschluss von Licht gezüchtet wurden, ohne weitere Behandlung Polyine zu isolieren. Werden jedoch diese Kulturen nach einer vierwöchigen Dunkelperiode für ca. sechs Wochen dem Tageslicht ausgesetzt, enthalten auch sie die beiden Triin-dien-Verbindungen. Kein Unterschied ist festzustellen zwischen Gewebekulturen aus Blatt und Wurzel.

Zum Beweis der vermuteten Strukturen sind verschiedene, aus dem Biogenese-Schema für diese Polyine^{12,13} bekannte radioaktiv markierte Vorstufen als Emulsion

TABELLE I. EINBAURATEN IN DIE POLYACETYLENVERBINDUNGEN DER GEWEBEKULTUR

Versuchs-Nr.	Eingefüht. Verbindung (Menge)	Eingefüht. Aktivität [ipm]	von	Gewebekultur Kulturbedingung	Menge	Isoliertes Polyin		Gesamtaktivität [ipm]	Einbaurrate [%]
						XVI Menge	IV Menge		
1	[9,10- ³ H ₂] VI ^{1,3} R = CH ₃ (2,3 mg)	6,2 · 10 ⁹	Blatt	Licht-Dunkel	29 g	1,4 γ	8,9 γ	IV: 8,8 · 10 ³	IV: 1,4 · 10 ⁻⁴
2	[9,10- ³ H ₂] V R = CH ₃ (1,48 mg)	4,0 · 10 ⁹	Wurzel	Dunkel (4 Wochen) Tagslicht (6 Wochen)	125 g	2,0 γ	9,5 γ	XVI: 6,0 · 10 ⁴ IV: 1,2 · 10 ⁴	XVI: 1,5 · 10 ⁻³ IV: 3,0 · 10 ⁻⁴
3	[18- ¹⁴ C] VI ^{1,3} R = CH ₃ (4,8 mg)	1,2 · 10 ⁸	Blatt + Wurzel	Licht-Dunkel	53 g	3,7 γ	0,7 γ	XVI: 7,3 · 10 ⁴	XVI: 0,061
4	[16- ¹⁴ C] IX ^{1,3} R = CH ₃ (4,8 mg)	1,4 · 10 ⁷	Wurzel	Licht-Dunkel	12 g	9,7 γ	14,6 γ	XVI: 9,7 · 10 ³ IV: 1,3 · 10 ⁴	XVI: 0,069 IV: 0,093
5	[2,3- ³ H ₂] XIIb ^{1,4} (28 mg)	2,5 · 10 ⁸	Blatt + Wurzel	Licht-Dunkel	35 g	15,5 γ	800 γ	XVI: 8,2 · 10 ⁴ XIV: 5,7 · 10 ⁵	XVI: 0,032 XIV: 0,225
6	[2,3- ³ H ₂] XIIb (3,75 mg)	2,5 · 10 ⁷	Wurzel	Dunkel	85 g	5,8 γ	186 γ	XVI: 3,8 · 10 ⁴ XIV: 1,4 · 10 ⁵	XVI: 0,153 XIV: 0,565

dem Kallus unter sterilen Bedingungen verabreicht und danach die Polyine dünnschichtchromatographisch aufgetrennt worden. XVI wird mit entsprechendem inaktivem Naturstoff verdünnt und bis zur konstanten spezif. Aktivität kristallisiert.

Die Radioaktivität im Diol IV lässt sich dadurch zeigen, dass zunächst nach Zugabe von Trägermaterial IVa und IVb mit UV-Licht bestrahlt wird. Nach dünnschichtchromatographischer Trennung der Isomeren lässt sich nun die *trans*, *trans*-Verbindung IVa bis zur konstanten spezif. Aktivität kristallisieren. Durch diese Methode erfasst man jedoch nur einen Teil der Gesamtaktivität im Diol IV.

Die Fütterungsversuche sind in Tab. 1 zusammengestellt. Obgleich bei den Versuchen die Bedingungen variierten, ist doch ein deutlicher Anstieg der Einbauraten von Versuch 1 zu Versuch 6 zu erkennen, wie es nach dem Biogenese-Schema (Schema 1) zu erwarten ist. Zum Unterschied zu Versuch 5 wurde bei Versuch 6 Kallus verwendet, der nur unter Ausschluss von Licht gewachsen war. Die spezif. Aktivität vom $[2,3-^3\text{H}_2]$ XIIb ist nur geringfügig höher als die spezif. Aktivitäten der isolierten Verbindungen XVI und XIV. Das könnte derart gedeutet werden, dass unter diesen Bedingungen der Kallus kaum in der Lage ist, Polyin-Systeme aufzubauen. Dagegen geht die Oxydation der reaktiven Methylengruppe und gleichzeitige Umlagerung zu XIV und die anschließende Wasserabspaltung praktisch unvermindert weiter. Die Oxydation von XVI zu IV geht offensichtlich langsam vor sich. In Versuch 5 und 6 kann das Diol IV nicht gefunden werden. Wasserabspaltung und Oxydation am C₃ zum Diol IV halten in Versuch 5 und 6 mit dem Angebot an unmittelbarer Vorstufe nicht Schritt, so dass als Hauptverbindung XIV entsteht, ein Naturstoff, der ebenfalls in *Centaurea*-Arten vorkommt.¹⁵ Ist dagegen die eingefütterte Vorstufe im Biogenese-Schema weiter vorstehend, werden lediglich wieder die beiden Triin-dien-Verbindungen gefunden, die dann allerdings in höheren Konzentrationen als im Kallus unter Normalbedingungen vorliegen, sofern eine biologische Vorstufe mit vorgebildetem Triin-Anteil verabreicht wird.

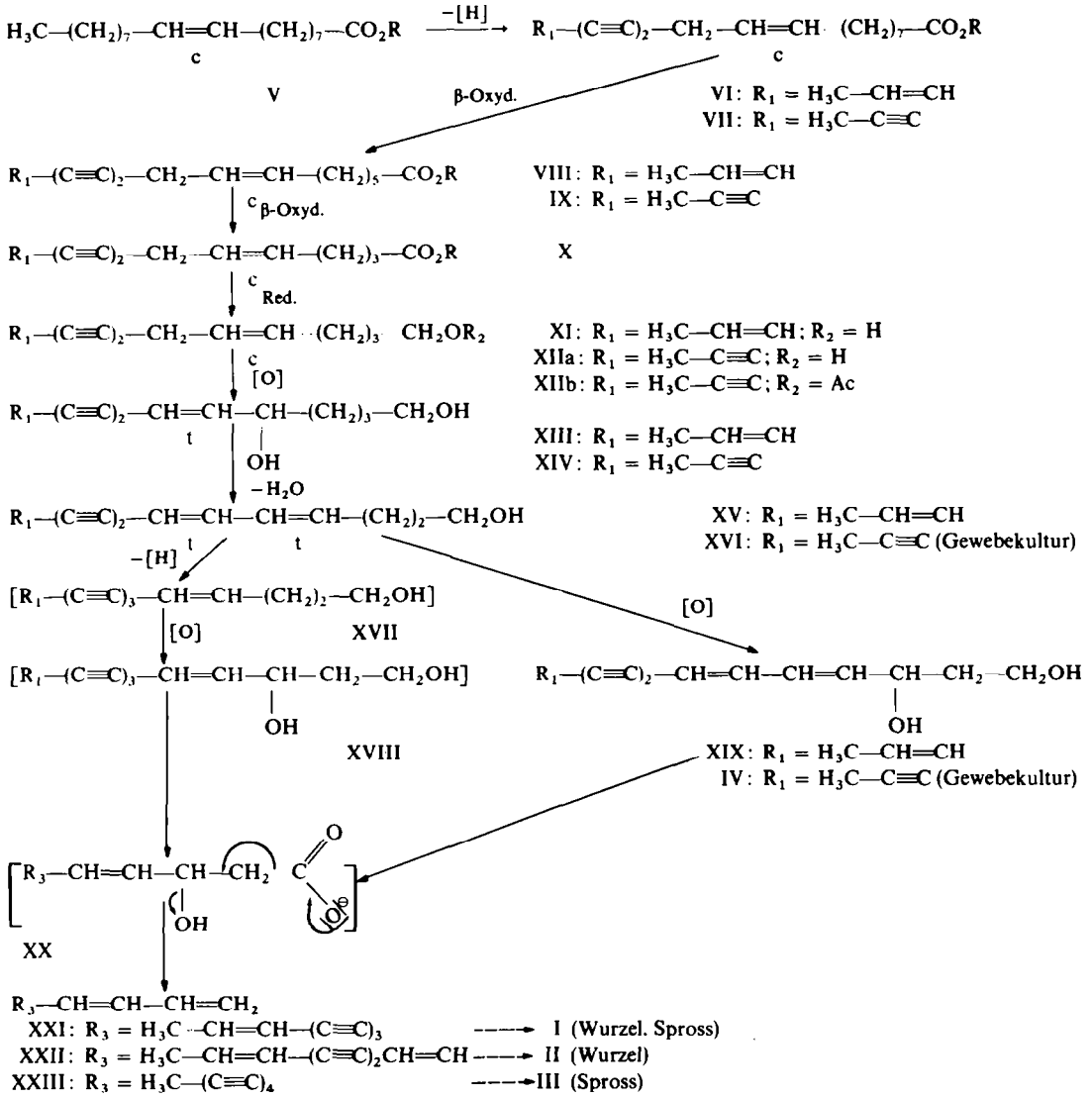
Da sichergestellt ist, dass im Diol XIV eine *trans*-Doppelbindung vorliegt, ist zu vermuten, dass es sich beim Kallus-Produkt IV um das Isomere Tetradecadien-(4c.6t)-triin-(8.10.12)-diol-(1.3) handelt, was im Einklang steht zur schwereren Isomerisierbarkeit als Verbindung IVb. Gleichzeitig wird bei diesen Versuchen die biogenetische Umwandlung von XIIb in IV bewiesen.

Als wahrscheinlicher Biogeneseweg für die Polyine der Pflanze und der Gewebekultur kann der folgende angenommen werden, wobei jedoch die Reihenfolge der einzelnen Schritte evtl. auch vertauscht werden müsste (Schema 1). Das Schema lässt erkennen, dass die Polyine der Gewebekultur von *Centaurea ruthenica* Lam. in biogenetischer Beziehung zu den Polyinen der Pflanze stehen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die UV-Spektren wurden in Äther mit dem Beckman-Recording-Spektrophotometer DK 1 und das NMR-Spektrum wurde mit dem Varian HA 100 mit TMS als innerem Standard aufgenommen. Die Schmelzpunkte bestimmte man mit dem Leitz-Heiztischmikroskop. Die Aktivitätsbestimmungen führte man im Beckman-Flüssigkeitsszintillationsspektrometer aus. Für die Dünnschichtchromatographien verwandte man SiO₂HF 254, für präparative Zwecke in einer Schichtdicke von 0.5 mm. Die Synthesen der radioaktiven Verbindungen sind in vorhergehenden Publikationen beschrieben (s. Tab. 1).

SCHEMA 1. BIOGENETISCHE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN POLYACETYLENVERBINDUNGEN DER PFLANZE UND DER GEWEBEKULTUR



Anzucht und Fortpflanzung der Gewebekulturen.* Blattstückchen von *Centaurea ruthenica* Lam. wurden mit Leitungswasser gespült. 5 Min. mit Natriumhypochloritlösung (ca 1·5% freies Chlor) unter Zusatz von 1 Tropfen Teepol behandelt und mit sterilem Wasser gewaschen. Die so vorbehandelten Blattstückchen wurden mehrmals eingeschnitten und auf den Agarnährboden⁷ gelegt. Entsprechend wurden ca 2 mm dicke Wurzelquerschnitte, von denen die Aussenschicht entfernt worden war, behandelt. Nach erfolgter

* Herrn Dr. S. Köhn sei für die Anzucht der Gewebekulturen gedankt; Herrn Prof. A. T. James (Unilever Research Laboratory, Colworth House, Sharnbrook) danke ich für die Freundlichkeit, mir in seiner Abteilung einen Einblick in die Gewebekultur-Technik gewährt zu haben.

Kallusbildung wurde das Gewebe auf Schrägagar in weiten Reagenzgläsern kultiviert. Es wurde "Medium A" (ohne Reibsaft) nach Kohlenbach verwandt. Die Licht-Dunkel-Wechsel-Kulturen (12:12 Stdn.) wurden bei Raumtemp. mit Osram-L-Röhren (65 W/31 R) bestrahlt. Dunkelkulturen wuchsen im Brutschrank bei 25°.

Durchführung der Inkubationen (allgemeine Arbeitsvorschrift). Die praktisch wasserunlöslichen Verbindungen V, VII, IX, XIIb, die mit ^{14}C oder Tritium markiert waren, wurden unter Zuhilfenahme von Saccharose-monostearat (1 mg/100 ml) in bidestilliertem Wasser emulgiert, dazu gab man die gleiche Flüssigkeitsmenge doppeltkonzentriertes Nährmedium ("Medium A"⁷ ohne Agar und Reibsaft) und autoklavierte 5 Min. bei 115°. Die Inkubationen erfolgten bei Raumlicht und Raumtemp. unter wiederholtem Umschütteln.

Aufarbeitung der inkubierten Gewebekulturen auf Polyine (allgemeine Arbeitsvorschrift). Die Versuchsansätze wurden nach beendeter Inkubation durch Mull filtriert. Der Kallus wurde zunächst durch 24stdg. Stehenlassen in Äther bei 2° extrahiert (= Ätherextrakt), dann unter Zusatz von Methanol in einem Mörser zerrieben und 2 Stdn. bei -20° aufbewahrt. Der Brei wurde filtriert und der methanolische Extrakt nach Zusatz von Wasser mit Äther gründlich ausgeschüttelt. Man vereinigte die Ätherphasen mit dem zuerst gewonnenen Ätherextrakt und destillierte den Äther i. Vak. ab. Der Rückstand wurde in ca 2 ml Methanol gelöst und 1 Stde. bei -20° aufbewahrt. Nach Abzentrifugieren der ausgeflockten Stoffe wurde der klare, methanolische Überstand eingedampft (i. Vak.), der Rückstand wieder in Äther gelöst und auf einer präparativen Dünnschichtplatte aufgetragen. Nach zweimaligem Entwickeln (Äther:Petroläther, 1:4 und 4:1) wurden die im UV-Licht erkennbaren Zonen mit Äther extrahiert und auf ihre UV-Spektren untersucht.¹ Proben der Zonen mit den UV-Maxima 348, 325, 305 nm und 328, 307, 289 nm wurden mit XVI, IV bzw. XIV als Testsubstanzen auf analytischen Dünnschichtplatten auf gleiche Wanderungsgeschwindigkeit überprüft; Laufmittel: Äther/Petroläther (1:1) für XVI und Äther für die Diole IV und XIV. Durch die spektroskopischen Messungen ergaben sich die Mengen von XVI, IV und XIV.

Bestimmung der Radioaktivität (allgemeine Arbeitsvorschrift). XVI: Ein Teil der Gesamtmenge wurde mit 5-10 mg inaktivem XVI definiert verdünnt und bis zur konstanten spezif. Akt. abwechselnd über Kohle filtriert und kristallisiert. Teilweise überprüfte man das bereits aktivitätskonstante Material durch erneute Dünnschichtchromatographie. Eluieren und Kristallisieren. Schmp. 104°. IV: Zu einem Teil des Diols wurden ca 0.5 mg inaktives, synthetisches IVa^{8,9} und ca 0.5 mg inaktives IVb als Trägermaterial gegeben. Anschliessend bestrahlte man in 20 ml Äther 30 Min. mit UV-Licht und trennte danach das Diol IVa aus dem Isomergemisch dünnschichtchromatographisch ab. Der bei diesen Operationen entstandene Verlust an IVa (in der Regel 60% Ausb.) wurde bei der Berechnung der Gesamttakt, berücksichtigt. Man verdünnte erneut mit 10-20 mg inaktivem, synthetischem Material und reinigte wie für XVI beschrieben bis zur konstanten spezif. Akt. Schmp. 97-99°. XIV: Analog der Methode für XVI beschrieben wurde mit ca 10 mg inaktivem, synthetischem XIV¹⁷ verdünnt und die spezif. Akt. bestimmt. Schmp. 103°.¹⁷

Versuche

Versuch 1. Fütterungsemulsion 50 ml; Inkubationszeit 39 Stdn.; Spezif. Akt.: $[9,10\text{-}^3\text{H}_2]$ V $8 \cdot 10^{11}$ tpm/mMol; verdünntes IVa $2.99 \cdot 10^4$ tpm/mMol.

Versuch 2. Fütterungsemulsion 65 ml; Inkubationszeit 48 Stdn.; Spezif. Akt.: $[9,10\text{-}^3\text{H}_2]$ V $8 \cdot 10^{11}$ tpm/mMol; verdünntes XVI $6.6 \cdot 10^5$ tpm/mMol; unverdünntes XVI (ber.) $60 \cdot 10^{10}$ tpm/mMol; verdünntes IVa $1.34 \cdot 10^4$ tpm/mMol.

Versuch 3. Fütterungsemulsion 55 ml; Inkubationszeit 87 Stdn.; Spezif. Akt.: $[18\text{-}^{14}\text{C}]$ VII $7.1 \cdot 10^9$ tpm/mMol; verdünntes XVI $7.28 \cdot 10^5$ tpm/mMol; unverdünntes XVI (ber.) $3.9 \cdot 10^9$ tpm/mMol.

Versuch 4. Fütterungsemulsion 33 ml; Inkubationszeit 20 Stdn.; Spezif. Akt.: $[16\text{-}^{14}\text{C}]$ IX $7.39 \cdot 10^8$ tpm/mMol; verdünntes XVI $4.43 \cdot 10^5$ tpm/mMol; unverdünntes XVI (ber.) $2.0 \cdot 10^8$ tpm/mMol; verdünntes IVa $6.4 \cdot 10^4$ tpm/mMol.

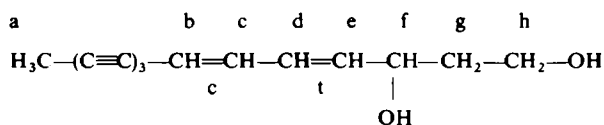
Versuch 5. Fütterungsemulsion 75 ml; Inkubationszeit 144 Stdn.; Spezif. Akt.: $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ XIIb $2.2 \cdot 10^9$ tpm/mMol; verdünntes XVI $2.2 \cdot 10^9$ tpm/mMol; unverdünntes XVI (ber.) $1.04 \cdot 10^9$ tpm/mMol; verdünntes XIV $1.3 \cdot 10^7$ tpm/mMol; unverdünntes XIV (ber.) $1.54 \cdot 10^9$ tpm/mMol.

Versuch 6. Fütterungsemulsion 45 ml; Inkubationszeit 72 Stdn.; Spezif. Akt.: $[2,3\text{-}^3\text{H}_2]$ XIIb $1.6 \cdot 10^9$ tpm/mMol; verdünntes XVI $4.9 \cdot 10^4$ tpm/mMol; unverdünntes XVI (ber.) $1.3 \cdot 10^9$ tpm/mMol; verdünntes XIV $2.24 \cdot 10^5$ tpm/mMol; unverdünntes XIV (ber.) $1.57 \cdot 10^9$ tpm/mMol.

Darstellung von Tetradeca-dien-(4t.6c)-triin-(8,10,12)-diol-(1,3) (IVb) aus IVa. IVa^{8,9} (250 mg) in 50 ml Äther wurde 1 Stde. mit UV-Licht bestrahlt. Danach erfolgte dünnschichtchromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches (entwickeln zweimal in Äther/Petroläther 4:1). Das zurückgewonnene

stärker polare Isomere IVa wurde erneut in 30 ml Äther 45 Min. bestrahlt. Nach abermaliger dünnschicht-chromatographischer Trennung erhielt man insgesamt 55 mg IVb, Ausb. 22%. IVb konnte nicht kristallin erhalten werden.

NMR (in CDCl_3):



^1H s τ 8.00	^1H dd 4.02 ($J = 15 + 5.5$)
^1H d 4.55 ($J = 10$ Hz)	^1H q 5.48 ($J = 5.5$)
^1H dd 3.44 ($J = 10 + 10$)	^1H m 8.18
^1H dd 3.22 ($J = 15 + 10$)	^1H t 6.14 ($J = 5.5$)

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 F. Bohlmann, H. Bornowski und C. Arndt. *Fortschr. Chem. Forsch.* **4**, 138 (1962)
- 2 F. Bohlmann, *Ibid.* **6**, 65 (1966)
- 3 N. A. Sørensen. *Proc. chem. Soc.* 98 (1961)
- 4 E. R. H. Jones. *Ibid.* 199 (1960)
- 5 F. Bohlmann, S. Postulka und J. Ruhnke. *Chem. Ber.* **91**, 1642 (1958)
- 6 F. Bohlmann, W. Sucrow, H. Jastrow und H.-J. Koch. *Ibid.* **94**, 3179 (1961)
- 7 H. W. Kohlenbach. *Z. Pflanzenphysiol.* **57**, 305 (1967)
- 8 F. Bohlmann, H.-D. Kramer, G. Ertingshausen. *Chem. Ber.* **98**, 2605 (1965)
- 9 P.-H. Bonnet. Dissertation. Technische Universität, Berlin (1969)
- 10 F. Bohlmann, C. Arndt, K.-M. Kleine, H. Bornowski. *Chem. Ber.* **98**, 155 (1965)
- 11 F. Bohlmann, W. v. Kap-herr, L. Fanghänel und C. Arndt. *Ibid.* **98**, 1411 (1965)
- 12 F. Bohlmann. *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe Wien* **25**, 1 (1967)
- 13 F. Bohlmann, R. Jente, R. Reinecke. *Chem. Ber.* **102**, 3283 (1969)
- 14 F. Bohlmann, H. Bonnet, R. Jente. *Ibid.* **101**, 855 (1968)
- 15 F. Bohlmann, C. Zdero und H. Bethke. *Ibid.* **100**, 2523 (1967)
- 16 F. Bohlmann, C. Arndt und H. Bornowski. *Ibid.* **93**, 1937 (1960)
- 17 F. Bohlmann, G. Florentz. *Ibid.* **99**, 990 (1966);
G. Florentz. Diplom-Arbeit. Technische Universität, Berlin (1965)

Herrn Prof. Dr. F. Bohlmann danke ich für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit; ebenfalls gilt mein Dank Frau M. Koischwitz für ihre geschickte und eifrige Mitarbeit.