

# UNTERSUCHUNG DER ALKALOIDBILDUNG IN DER KEIMPFLANZE UND IN DEN DARAUF FOLGENDEN ONTOGENETISCHEN STADIEN VON CHELIDONIUM MAJUS L. IM ZUSAMMENHANG MIT DER ORGANDIFFERENZIERUNG

Von

K. M. NYOMÁRKAY – J. VINCZE

Institut für Pflanzenanatomie der Eötvös Loránd Universität, Budapest

Eingegangen: 10. Mai 1976

Das Problem der Alkaloidbildung von *Chelidonium* – aus verschiedenen Präkursoren (z. B. Dopa, Tyrosin, Retikulin) – wurde bereits von zahlreichen Forschern untersucht (Batterby 1966, Santavy 1970, Slavik Slavikova 1955, Kirjakov-Panov 1971). Früher führten auch wir Untersuchungen an der Keimpflanze von *Papaver somniferum* bezüglich der Bildung von Alkaloiden ähnlichen Charakters durch (S. Sárkány und Mitarb. 1966, 1967, 1975, K. M. Nyomárkay 1970). Es ist bekannt, daß die Alkaloide bei der über ein Milchsaftbehältersystem verfügenden Familie *Papaveraceae* im Milchsaft der im Bastteil der Leitbündel befindlichen Milchgefäße sind. Es gibt jedoch keine einheitliche Meinung hinsichtlich der Frage, ob sich die Alkaloide im Milchgefäß synthetisieren oder aber dorthin wandern. Die Alkaloidbildung im Mohn bringen einzelne Forscher (Meissner 1966, Fairbairn und Mitarb. 1966) mit der Ausbildung des Milchsaftes in Zusammenhang. Nach der Meinung anderer häng sie mit der Assimilationstätigkeit zusammen.

## Untersuchungsmaterial und Methode

In der vorliegenden Mitteilung wird das Alkaloidspektrum der Keimpflanzen von *Chelidonium majus* L. in 3-, 4-, 6-, 8-, 12-, 24tägigen Keimlingen untersucht. Zur Keimung wurden in Jahre 1975 eingesammelte frische Samen verwendet, da unserer Erfahrung nach der Samen seine Keimfähigkeit in 2–3 Jahren einbüßt.

Die Samen ließen wir auf einem Filtrierpapier in einer Petri-Schale im Dunkeln keimen. Als Beginn der Keimung wurde das Aufspringen der Samenhülle betrachtet und von da an haben wir die Tage gerechnet. Die Schalen der Samen begannen auf dem Filtrierpapier in 10–12 Tagen aufzuspringen. Die zur Verwendung herangezogenen Keimpflanzen

wurden einzeln in zwei Teile, u.zw. in das Würzelchen und Hypokotyl mit Keimblatt, zerlegt. Im Jahre 1974 haben wir bei den an der Biologischen Station Göd der Universität ELTE gezüchteten Pflanzen die Ausbildung und Schwankung der Alkaloide in den verschiedenen Organen und den unterschiedlichen Entwicklungsstadien verfolgt. So kamen die jungen mit 5–6blättrigen Rosetten, in Wurzelrhizome sowie in Stamm-

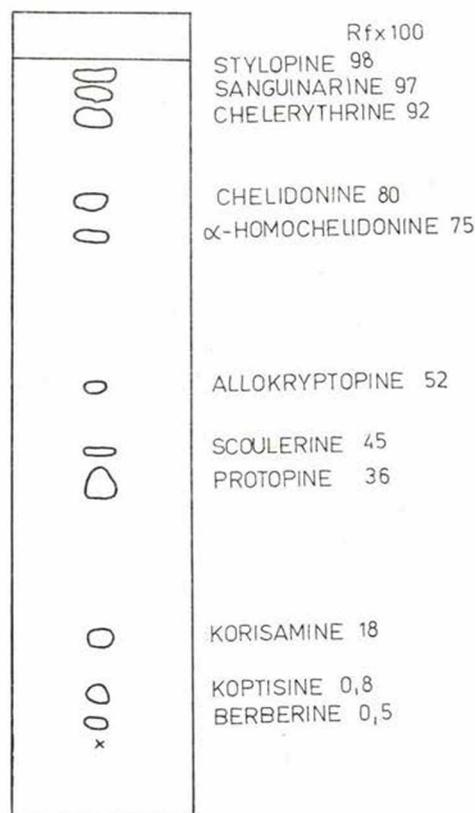


Abb. 1. Lokalisation der nachgewiesenen Alkaloide in der Dünnschicht

blätter zerlegt, zur Untersuchung. Im Stadium mit 10–12 Stammblättern stellte das Rhizom schon eine eigene Untersuchungsprobe dar. Nach dem Stengelwachstum wurde der Stengel auch schon gesondert untersucht. Schließlich haben wir die aufbrechende Blüte auch im blühenden Zustand analysiert. Die frischen Pflanzenteile wurden auf Grund unserer früheren Beobachtung (Michels–Nyomárkay 1971) 10 Minuten lang bei einer Temperatur von 105 °C gehalten, sodann

bei Zimmertemperatur getrocknet. Die trockenen Untersuchungsproben wurden pulverisiert, dann mit 10%igem  $\text{KHCO}_3$  extrahiert und nach Filtrierung mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Verdunstung haben wir sie über die indifferente Schicht von Kieselgen G nach der Methode Neubaer-Mothes (1961) in Benzo-Metanolgemisch 80:20 laufen lassen. Die Flecken wurden mit dem Dragendorff-Reagens sichtbar gemacht (Abb. 1) und durch Standardreihenvergleich ausgewertet. Hierzu wurden die folgenden Alkaloide angewendet: Merck-Fabrikate: Berberin, Sanguinarin, vom Koch-Light Labor: Chelidonin, Chelerytrin, Protopin, Korisamin, Koptisin,  $\alpha$ -Homochelidonin und Allocryptopin stammen aus dem Forschungsinstitut für organische Chemie der Bulgarischen Wissenschaftlichen Akademie. Für die Alkaloide spreche ich auf diesem Wege Herrn Prof. Mollov unseren Dank aus.

Im Laufe unserer Arbeit haben wir aus frischen Pflanzenindividuen Hand- und Mikrotomschnitte angefertigt, an ihnen mit Durchlichtmikroskop die Charakteristika der Ausbildung der Milchgefäße und mit Hilfe histochemischer Reaktionen die Lokalisation der Alkaloide beobachtet.

### Untersuchungsergebnisse und ihre Auswertung

Die Lokalisation der Milchgefäße ist charakteristisch. Es sind sowohl um das Xylem als auch um das Phloem mehrere Milchgefäße oft gruppenweise zu finden (Abb. 2). Die Konsistenz des herausgeflossenen Milchsafte ist eine Suspension, in der mit dem Durchlichtmikroskop Plasmareste und winzige gelbe Tröpfchen wahrgenommen wurden. Diese ergaben mit den Dragendorff-, Meyer-, Wagner-, Tunmann-Reagenzien eine positive Reaktion und deuteten auf das Vorhandensein von Alkaloiden im Milchsaft hin. Im Laufe der Polarisationsmikroskopuntersuchung der aus dem Milchsaft angefertigten Strichpräparate haben wir für die Stärkekörnchen charakteristische Extinktionskreuze wahrgenommen.

Es wurde auch der pH-Wert des herausgeflossenen Milchsafte gemessen. Der Wert schwankte in den von verschiedenen Pflanzenindividuen entnommenen Proben zwischen 4,5 und 6.

In den 2–3tätigen Keimpflanzen haben sich die Milchgefäße noch nicht differenziert.

Im Laufe der histochemischen Analysen erhielten wir im apikalen Meristemteil der einige Tage alten Keimwurzeln sowie in einzelnen Parenchymzellen des Hypokotyls – noch vor dem Erscheinen der differenzierten Milchgefäße und des Milchsafte – positive Alkaloidreaktionen. In den Wurzelhaaren der Keimpflanze entstanden im Plasma mit Dragendorff- und Meyer-Reagenzien ebenfalls positive tropfenförmige Reaktionen.

Bei den 5–6tägigen Pflanzen konnte schon Milchsaft der für die Art charakteristische gelbe Milchsaft beobachtet werden und die Diffe-

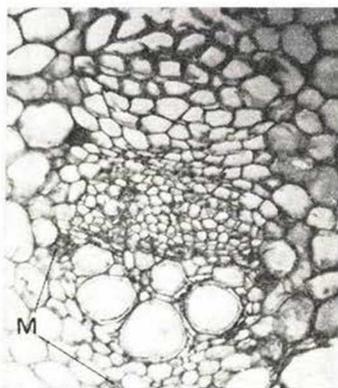


Abb. 2

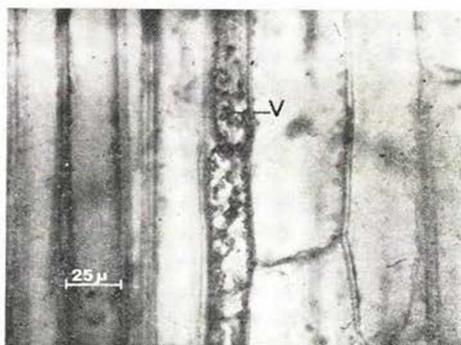


Abb. 3

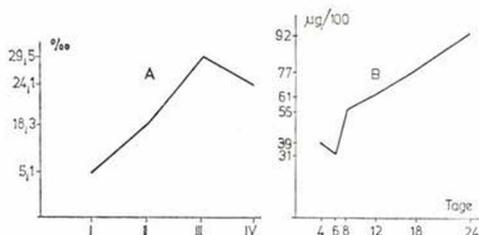


Abb. 4

Abb. 2. Querschnitt eines Leitbündels Obj. 10x Ok. 7 Milchgefäße M

Abb. 3. Radialer Längsschnitt mit dem Teil eines Milchgefäßes Obj. 40x Ok. 10 Milchsaftvakuole v

Abb. 4. A Schwankung des Gesamtalkaloidgehaltes (o/oo) von *Chelidonium majus* L. in einigen ontogenetischen Entwicklungsstadien. I. mit 5–6, II. mit 10–12 Grundblättern und IV. in blühendem Zustand, III. im Stengelwachstum

B. Schwankung des Gesamtalkaloidgehaltes in den Keimpflanzen (μg/100 Pflanzen)

renzung der Milchgefäße nahm ihren Anfang. Die Milchgefäße kommen durch Fusion zustande, so ist für sie charakteristisch, daß sie gegliedert sind und ihre Anastomose im Gegensatz zum Mohn keine H-Form zeigt. Es muß erwähnt werden, daß bei dem Treffpunkt der Milchgefäßglieder Ausbuchtungen zu beobachten sind (M e t c a l f e-C h a l k 1950) (Abb. 3.) Das Bild wurde von dem Längsschnitt des Stengels einer jungen Keimpflanze angefertigt, an dem das erwähnte Charakteristikum des Milchgefäßes gut wahrnehmbar ist. Unsere Untersuchungsergebnisse wurden in Tab. 1. zusammengefaßt. Aus Tab. 1. geht hervor, daß die Wurzel

der Keimpflanze bereits im 3tägigen Alter Protopin, Allocryptopin und Sanguinarin enthält. Im 4tägigen Alter nimmt schon das Alkaloidniveau stark zu und von da an ist in den Keimpflanzen Berberin, Koptisin, Protopin, Allocryptopin, Chelerytrin und Sanguinerin schon kontinuierlich anzutreffen. Korisamin war nur in den Hypokotyl und Keimblatt enthaltenden Proben vorhanden. Bis zum 18tägigen Alter kann  $\alpha$ -Homochelidonin in den Keimblätter enthaltenden Hypokotylproben vorgefunden werden, im 24tägigen Alter war es auch in der Wurzel vorhanden. Chelidonin, das Hauptalkaloid von *Chelidonium majus* erschien interessanterweise erst im 8tägigen Alter und von da an übernahm es unter den Alkaloiden sowohl in den Keimblätter enthaltenden Hypokotylproben als auch in der Wurzel die führende Rolle. In der letzten Rubrik haben wir die Gesamtalkaloidwerte angeführt. Aus den auf die ganze Pflanze bezogenen Gesamtalkaloidwerten wurde eine graphische Darstellung angefertigt. (Abb. 4.) Aus dieser geht hervor, daß sich im eintägigen Alter ein Rückfall der Alkaloide zeigte, sodann nahm im weiteren der Gesamtalkaloidwert gleichmäßig zu. In Tab. 2 wurde das Alkaloidspektrum der Teile der sich entwickelnden Pflanze summiert. Die führende Rolle von Chelidonin ist in der Wurzel und im Rhizom am ausgeprägtesten. Außer Chelidonin waren noch  $\alpha$ -Homochelidonin, Sanguinarin und Chelerytrin in größerer Menge vorhanden. Bei einer Pflanze mit Stengelwachstum zeigten die Wurzel und das Rhizom das maximale Alkaloidspektrum mit 12–15% an. In der blühenden Pflanze haben wir schon eine Verminderung hinsichtlich des Spektrums wahrgenommen. Hiemit läßt sich erklären, daß es vorteilhaft ist, die Wurzeln für den Drogenhandel im Spätherbst oder im Vorfrühling zu sammeln. In ähnlicher Weise ist es vorteilhaft das Sammeln von Blättern im Blattrosettenzustand im April, lange bevor es bei der Pflanze zum Stengelwachstum kommt, vorzunehmen, zu dieser Zeit ist nämlich der Alkaloidgehalt, der den therapeutischen Wert ergibt, am höchsten. In der graphischen Darstellung haben wir auch das Gesamtalkaloidspektrum der entwickelten Pflanze aufgezeigt. Auf die ganze Pflanze bezogen haben wir im Zustand des Stengelwachstums das Alkaloidmaximum gefunden, und im blühenden Zustand ist schon ein Rückfall wahrzunehmen.

Ein Vergleich unserer Alkaloiduntersuchungen ergab bei den Keimpflanzen außer dem im 6tägigen Alter wahrgenommenen leichten Rückfall einen gleichmäßigeren Alkaloidzuwachs. Dieser Alkaloidzuwachs steigt während der Entwicklung von *Chelidonium majus* gleichmäßig an, im Stadium des Stengelwachstums erreicht er sein Maximum, fällt dann in den blühenden und Fruchtstadien zurück.

Von den *Chelidonium*-Alkaloiden war Chelidonin, welches das Hauptalkaloid der Pflanze ist, in der Frühphase der Keimung noch nicht nachweisbar, jedoch konnte es vom 8tägigen Alter an kontinuierlich angetroffen werden. In der entwickelten Pflanze kommt es in größerer Menge vor allem in der Wurzel und im Rhizom vor, jedoch ist es im Rosettenstadium in den Keimblättern in großer Menge vorhanden.

## Gestaltung des Alkaloidspektrums bei den Keimpflanzen von

Zustand Organ	Alkaloide				
	Berberin	Koptisin	Korisamin	Protopin	Scoulerin
3 tägige Wurzel	—	—	—	ny	—
Hypokotyl und Keimblatt	—	—	—	—	—
4 tägige Wurzel	3	4	—	5	—
Hypokotyl und Keimblatt	3	3	1	4	—
6 tägige Wurzel	2	2	—	3	—
Hypokotyl und Keimblatt	3	3	1	3	—
8 tägige Wurzel	4	3	—	4	2
Hypokotyl und Keimblatt	4	3	1	2	—
12 tägige Wurzel	4	3	—	5	2
Hypokotyl und Keimblatt	4	3	1	2	—
18 tägige Wurzel	4	3	—	6	2
Hypokotyl und Keimblatt	4	3	1	4	—
24 tägige Wurzel	5	3	—	8	2
Hypokotyl und Keimblatt	5	3	1	5	—

Das  $\alpha$ -Homochelidonin und das Sanguinarin ist von den Nebenalkaloiden in größerer Menge zugegen.

Chelerytrin war als Nebenalkaloid in ähnlicher Menge anzutreffen. Berberin und Protopin waren schon in geringerer Menge vorhanden. Allocryptopin haben wir nur wenig gefunden und einzeln auch Scoulerin nachgewiesen. Das Interessante bei Scoulerin ist, daß es vom Gesichtspunkt der Biosynthese aus eine Zentrallage einnimmt, aus ihm entwickelt sich auch die Skelettstruktur von Chelidonin, Protopin und Berberin. Bei Keimpflanzen war es gewöhnlich nur in der Wurzel nachweisbar.

Tabelle I

Chelidonium majus L. im Jahre 1975. ( $\mu\text{g}/100$  Pflanzen)

0/00

Allocriptopin	$\alpha$ -Homoche- lidonin	Chelidonin	Chelerythrin	Sanguinarin	Gesamtalkaloid
3	2	—	—	3	8
—	ny	—	—	1	1
3	—	—	3	2	20
3	—	—	3	2	19
2	—	—	2	1	12
4	—	—	3	2	19
1	—	8	4	3	29
1	2	7	4	2	26
1	—	10	5	4	34
1	2	9	4	2	28
3	—	13	7	5	43
3	2	10	5	2	34
4	1	15	8	6	52
4	3	12	6	4	43

## Zusammenfassung

*Chelidonium majus* L. ist eine Milchgefäße, Milchsaft und Alkaloide enthaltende Heilpflanze aus der Familie *Papaveraceae*. Die Milchgefäße erstrecken sich über die ganze Pflanze, jedoch ist die Anastomose der Milchgefäßglieder — von der H-Form des Mohnes abweichend — punktförmig. Der pH-Wert des Milchsaftes schwankt zwischen 4,5 — 6. Die Reaktion mit Dragendorff-, Mayer-, Tunmann-Reagenzien ist positiv. Der frische Samen keimt gut, jedoch nimmt seine Keimfähigkeit nach einigen Jahren stark ab. Bei der Durchführung der zur Alkaloiduntersuchung des Mohnes angewandten Extraktionsverfahren, gelang es uns aus Chelidonin-Extrakten 10 Alkaloide zu trennen.

Durch Verwendung der Neubauer-Motheschen Lösung erhielten wir im Falle der Alkaloide die folgenden Rfx 100 Werte: Berberin 0,5,

Tabelle II

Schwankung einiger Alkaloide in den Organen von *Chelidonium majus* L. während der einzelnen ontogenetischen Entwicklungsstadien

Zustand Organ	Alkaloide ‰								
	Berberin	Protopin	Scoulerin	Allo- cryptopin	Homochelidonin	Chelidonin	Chelerythrin	Sanguinarin	Gesamtalkaloid ‰
<i>mit 5–6 Grundblättern</i>									
Wurzel	Sp.	0,1	—	—	0,5	0,5	0,2	0,2	1,5
Blattrosette	0,6	0,3	Sp.	0,1	0,6	1,0	0,4	0,6	3,6
<i>mit 10–12 Grundblättern</i>									
Wurzel	0,1	0,1	—	—	0,5	0,5	0,4	0,2	1,8
Rhizom	0,1	0,6	—	0,2	0,6	2,5	1,0	1,0	6,0
Blattrosette	0,2	1,0	—	0,3	1,0	5,0	2,0	1,0	10,5
<i>Im Stengelwachstum</i>									
Wurzel	1,7	0,2	Sp.	0,1	3,0	3,0	2,0	2,0	12,0
Rhizom	2,0	0,3	Sp.	0,1	2,6	5,0	2,0	3,0	15,0
Stengel	0,3	0,2	—	—	0,5	Sp.	—	0,5	1,5
Blatt	0,4	0,1	—	—	Sp.	—	—	0,5	1,0
<i>blühend</i>									
Wurzel	1,0	0,3	Sp.	0,1	1,5	3,0	0,75	1,0	7,65
Rhizom	1,8	0,5	Sp.	0,2	2,0	4,0	1,5	2,0	12,00
Stengel	—	0,4	—	Sp.	0,2	Sp.	0,2	0,2	1,0
Blatt	—	0,2	—	—	0,2	0,4	0,1	Sp.	0,9
aufbrechende Blüte	0,1	0,3	Sp.	0,1	0,4	1,0	0,2	0,4	2,5
<i>mit reifer Frucht</i>									
Wurzel	1,0	0,2	Sp.	0,2	1,4	3,00	0,5	1,0	7,3
Rhizom	1,5	0,4	Sp.	0,2	1,9	3,60	1,0	1,6	10,2
Stengel	0,2	0,2	—	—	0,2	0,2	0,1	0,2	1,1
Blatt	—	—	Sp.	—	0,2	0,4	0,1	0,1	0,8
Frucht	0,3	0,2	Sp.	0,1	0,3	0,9	0,3	0,2	2,3

Sp. = in Spuren

Koptisin 0,8, Korisamin 18, Propotin 36, Scoulerin 45, Allo-kryptopin 52,  $\alpha$ -Homochelidonin 75, Chelidonin 80, Chelerythrin 92, Sanguinarin 97, Stylopin 98.

Es wurde das Alkaloidspektrum der 3-24tägigen Keimpflanzen und der sich entwickelnden *Chelidonium*-Pflanzen untersucht. Diese gleichmäßige Alkaloidzunahme hat beim Stengelwachstum das Maximum erreicht, nachher konnte eine leichte Alkaloidabnahme verzeichnet werden.

## SCHRIFTTUM

- Battersby, A. R. 1966. Biosynthesis of some Isoquinolin Alkaloids. 3. Internat. Symp. Biochem. u. Phys. d. Alkaloide. Tagungsbericht Akad. Verlag, Berlin, 295–307.
- Fairbairn, J. W. — A. Paterson. 1966. Alkaloids as possible intermediates in plant metabolism. *Nature* **210**: 1163–1164.
- Kirjakov, H. — Рапов Р. 1971. X. Киряков, — П. Панов, Изследване алкалоидното съдържание на *Chelidonium majus* L. Медицински проблеми **23**: 123–128.
- Martile, B. Jans — R. Rickenbacher 1970. Vacuoles of *Chelidonium Latex*: Lyrosomal Property and accumulation of Alkaloids. *Biochem. Physiol. Pfl.* **161**: 447–458.
- Meissner, L. 1966. Über Latex pH-Werte und ihre Bedeutung für die Milchsafte. Diskussion 10. Mitteilung zur Biochemie und Physiologie des Milchsafte. *Flora*. **156**: 404–410.
- Metcalf, C. R. — L. Chalk 1950. *Anatomy of the Dicotyledons* **1**. Oxford
- M. Nyomárkay K. 1970. Aminósav és alkaloidképződés összefüggései a mák-csíránövényben (Zusammenhänge zwischen Aminosäure und Alkaloidbildung in der Mohn-Keimpflanze) *Herba Hung.* **9**: 43–49.
- M. Nyomárkay K. 1971. Die Wirkung der Trocknung auf die Ausbildung des Alkaloidspektrums von *Chelidonium majus* L. *Annales Univ. Sci. Sectio Biol.* **13**: 127–136.
- Santay, F. 1970. *Papaveraceae Alkaloids* 333–454 (Menske, H. F. *The Alkaloids* **12**: Academic Press, New York-London.
- Neubauer, D. — Mothes, K. 1961. Zur Dünnschichtchromatographie der Mohnalkaloide. *Planta Medica* **9**: 466–470.
- Sárkány S. — Verzár-Petri, G. — M. Nyomárkay, K. Sárkány S.-né 1966. Az alkaloidképződés tanulmányozása a szövetstruktúrával és szervdifferenciáltsággal összefüggésben a *Papaver somniferum* L.-ban. I. Gyökércsúcs-vizsgálatok (Untersuchung der Alkaloidbildung in Zusammenhang mit der Gewebestruktur und der Organdifferenzierung bei *Papaver somniferum* L. I. Wurzelspitzenuntersuchungen). *Herba Hung.* **5**: 40–50.
- Sárkány, S. — K. Nyomárkay-Michels — G. Petri-Verzár 1967. A mák magjának, különböző korú fiatal növényeinek szöveti felépítése, finomszerkezeti vonatkozásai és az alkaloidképződés kérdése (Gewebeaufbau, feinstrukturelle Beziehungen der Samen und jungen Pflanzen verschiedenen Alters beim Mohn und die Frage der Alkaloidbildung). *Herba Hung.* **6**: 239–253.
- Schütte, H. R. — H. Hindorf 1964. Über Vorkommen und Biosynthese von Spartein in *Chelidonium majus* L. *Die Naturwissenschaften* **51**: 463.
- Slavik, J. 1955. Alkaloide der Mohngewächse (*Papaveraceae*) V. Die Isolierung des Stylopins aus dem Schöllkraut (*Chelidonium majus* L.) *Coll. Czechoslov. Chem. Commun* **20**: 198–203.
- Slavik, J. — L. Slaviková. 1955/a. Alkaloide der Mohngewächse (*Papaveraceae*) II. Trennung des Chelerythrins und Sanguinarin und Auffindung von zwei neuen Alkaloiden im Schöllkraut (*Chelidonium majus* L.). *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* **20**: 21–26.