

EINBAU VON TRYPTOPHAN 2-¹⁴C IN DIE ALKALOIDE VON VINCA MINOR L.

von

G. VERZÁR-PETRI – T. SZARVAS – J. VÁRADI

Lehrstuhl für Angewandte Botanik und Histogenese der Eötvös Loránd Universität, Budapest,
Institut der Isotope der ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest,
Zentralverwaltung für Apotheken beim Hauptstädtischen Rat, Budapest

Eingegangen: 28. November 1969

Die Pflanze *Vinca minor* L. (Kleines Immergrün), aus der die Chemische Fabrik G. Richter AG (Kőbánya) neuerdings die Arznei Devincan gegen hohen Blutdruck herstellt, enthält laut des gegenwertigen Standes unserer Kenntnisse 25 verschiedene Alkaloide (Hesse 1964, Manske 1968). Unter den 19 verschiedenen Alkaloidtypen mit Indol-Gerüst, die in der Pflanzenwelt aufzufinden sind (Clauder zit. Erdei-Gruz 1964), lassen sich die Alkaloide von *Vinca minor* in die Typen Eburnamin, Aspidospermin, Ajmalin und Epi-Allo-Johimbin einreihen. Als Hauptalkaloid der Pflanze wird Vincamin aus dem Typ Eburnamin betrachtet (Clauder, 1962). Weitere bedeutungsvolle Mitglieder dieser Gruppe sind Vincaminin, Vincanorin, Vincin und Epivincamin, während Vincadiformin, Vincaminorin, Vincaminorein und Vincadin die bekanntesten Vertreter des Typ Aspidospermin sind.

In Ungarn wurden mit dieser Pflanze verschiedene Forschungen vorgenommen. Bisher befaßten sich Márk (1963) Forschungsinstitut für Gartenkunde und Hubay (1966) vom Heilpflanzenforschungsinstitut mit ihrer Einbeziehung in die Züchtung. Die von den ökologischen Verhältnissen abhängende Entstehung des Gesamtalkaloid- und Vincamingehaltes wurde von Máthé (1963) und Frau Sárkány (1962) untersucht. Clauder und Mitarbeiter (1962), sowie Frau Böjthe (1966) befaßten sich mit der Biosynthese des Vincamin, Clauder u. Mitarbeiter (1962) untersuchten außerdem auch seine strukturellen Fragen. Demzufolge kann man *Vinca minor* mit Recht eine von Ungarn entdeckte Pflanze der pharmazeutischen Industrie nennen.

Die biochemische Untersuchungen der letzten zwei Jahrzehnte befaßten sich vielseitig mit den Alkaloiden im allgemeinen, und mit den Vorverbindungen der verschiedenen Alkaloidgruppen (Romeike, 1957, Doby, 1955, Mothes u. Schütte, 1969). Bei der Untersuchung der Bildung von Alkaloiden mit Indol-Gerüst konnten Mothes und Mitarbeiter (1964) die Präkursor-Rolle von Tryptophan 2-¹⁴C bei den Alkaloiden des Mutterkorns nachweisen. Laut Baxter und Mitarbeiter (1963) wird das zur Ringab-

schließung erforderliche Atom C von der Mevalonsäure bereitgestellt. Auch die Untersuchung der Biosynthese weiterer Indol-Alkaloide wurde in Angriff genommen. Leete (1966) gibt hierüber eine umfangreiche Zusammenfassung. Es ist eine allgemeine Beobachtung, daß der Indolteil der Alkaloide vom Tryptophan oder dessen dekarboxiliertes Produkt also von dem Tryptamin herrührt (Robinson 1955). Gliotoxin ebenfalls mit Indol-Gerüst läßt sich von Phenylalanin und Serin ableiten (Suhanolnik u. Mitarbeiter 1958) Tyrosin und Phenylalanin sind die Präkursoren der *Amaryllidaceae*-Alkaloide (Wildman — Fahles u. Battresby 1962).

In der vorliegenden Arbeit setzten wir uns zum Ziel, Untersuchungen über die Einbaumöglichkeit von Tryptophan 2-¹⁴C zu machen, die Reihenfolge des Einbaues zu beobachten, und somit Angaben über gewisse biogenetische Zusammenhänge zu gewinnen. Diese Versuchsarbeit ist die Fortsetzung unserer früheren Untersuchungen, die sich auf die Züchtung der Pflanze in Nährlösung (Váradi u. Verzár-Petri, 1966), sowie auf den Einbau von Tryptophan 2-¹⁴C in das Aminosäurespektrum bezogen haben (Verzár-Petri u. Mitarbeiter, 1968).

Untersuchungsmaterial und Methode

Das bei der Versuchsarbeit verwendete Tryptophan DL 2-¹⁴C hatte eine spezifische Aktivität von 3.87 μ Ci/mg, 792 μ Ci/mMol, und beim Versuch wurde eine Gesamtaktivität von 520 μ Ci eingeführt. Der Versuch wurde mit dreimaliger Wiederholung, an einer Serie von je 10 Pflanzen folgendermaßen durchgeführt:

Es wurden im Sand frisch eingewurzelte Pflanzen von etwa 10 cm-Höhe, mit 2–3 Blätterpaaren herausgenommen, und 24 Stunden hindurch mit 50 ml Lösung des radioaktiven Tryptophan bei Luftdurchströmung inkubiert. Nach der Fütterung wurden die Wurzeln der Pflanzen mit fließendem Wasser gründlich abgewaschen, und die Exemplare in eine Nährlösung von Hoagland — Snyder (Váradi u. Verzár-Petri, 1966) gebracht. Von da wurden Proben für Alkaloiduntersuchungen in mehreren Zeitpunkten genommen, wie: gleich (1 Tag alt gezeichnet), dann 3,6 und 10 Tage später. Die herausgenommenen Pflanzen wurden in Vakuum gleich abgetrocknet und bis zur Aufbereitung in einem Exsikkator aufbewahrt.

Die Aufnahme des aktiven Tryptophan und die Verteilung der Aktivität innerhalb der Pflanzen wurde mit der Autoradiographie kontrolliert. Bei der Untersuchung der Alkaloide hatten wir eine Erschließung mit Ammoniak und eine kalte Extraktion mit Chloroform angewendet. Die alkaloidkomponenten wurden mit der aufsteigenden papierchromatographischen Methode von Trojanek und Mitarbeiter (1961) untersucht. Nach Entwicklung mit Chlorgas nach Szász u. Mitarbeiter (1959), hatten wir die einzelnen Alkaloidflecken, welche unter der UV-Lampe charakteristisch fluoreszierten, eingezeichnet, einzeln ausgeschnitten und eluiert. Ihre Aktivität wurde mit einem Szintillationsdetektor gemessen. Die Arbeit wurde mit Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Da hatten wir mit der Methode Neubauer u. Mothes (1961) gearbeitet mit dem Laufmittel Benzol: Methanol (80:20).

Reihenfolge und RF-Wert der Alkaloide bei Papier- und Dünnschichtchromatographie ist die folgende: (s. Tabelle 1.)

Tabelle 1.

Name der Verbindung	RF-Wert		Farbe in UV-Licht
	Papier	Dünnschicht	
Vincaminorein	0,90	0,87	gelb
Vincadiformin	0,79	0,80	blau
Vincamin	0,66	0,58	grün
Vincin	0,58	0,52	blau
Vincaminin	0,43	0,42	braun
Vincadin	0,39	0,40	blau
Epivincamin	0,29	0,36	grünlich-blau
Vincanorin	0,20	0,30	blau

Untersuchungsergebnisse

Die autoradiographischen Untersuchungen bestätigten die Aufnahme von radioaktivem Tryptophan. (Abb. 1) Die stärkste Aktivität war jederzeit in den Wurzeln und in der Rhizome der Pflanzen zu finden. In den Blättern war am 1. Tag nur eine geringe, am 3. eine kräftige Aktivität zu beobachten, und nach einem Rückfall am 6. Tag konnten wir am 10. wieder eine größere Aktivität finden. Diesbezüglich haben wir bisher keine weitere Transport-Untersuchungen gemacht, doch sie sind vorgenommen.

In den Alkaloiden der Pflanze konnte eine vom radioaktiven Tryptophan zugeführte Aktivität festgestellt werden. Alle die untersuchten Alkaloide der Pflanze wurden radioaktiv, woraus wir die Schlußfolgerung stellen konnten, daß die Tryptophan-Aminosäure auch bei den Indol-Alkaloiden der *Vinca minor* L. eine Prekursor-Rolle spielt.

Die in den verschiedenen Alkaloiden gefundene Aktivität vermindert sich langsam, in einigen Komponenten, wie in Vincamin und Vincadiformin erhöht sie sich wieder. Daraus läßt sich schließen, daß der Einbau des Tryptophan 2-¹⁴C in die Alkaloide verhältnismäßig langsam vor sich geht. Am Ende tritt der Abbau, außer Vincadiformin in Vordergrund.

Einer eingehenden Analyse der verschiedenen Alkaloidtypen war zu entnehmen, daß die Aktivität zu Beginn beim Typ Eburnamin in Vincamin, und beim Typ Aspidospermin in Vincaminorein am stärksten ist (Tabelle 2.). Es sei jedoch bemerkt, daß die Aktivität der beiden genannten Alkaloiden keinen wesentlichen Unterschied aufweist. Dies läßt den Gedanken zu, daß sich die beiden untersuchten Alkaloidtypen parallel, und nicht einer aus dem anderen entwickelt haben.

Die Untersuchung von inaktiven Pflanzenextrakten während der Ontogenese zeigte eine geringe zeitliche Verschiebung in der Erscheinung der beiden Typen. In den in Entwicklung begriffenen Knospen und jungen Trieben waren die Alkaloide des Typ Eburnamin etwas früher zu finden. Die gegenwärtigen radioaktiven Untersuchungen ließen diese Differenz nicht wahrnehmen, und

zwar möglicherweise aus der Ursache, weil die Unterschiede früher als 24 Stunden stattfinden können. In dieser Richtung werden wir in der Zukunft weitere Untersuchungen erfolgen.

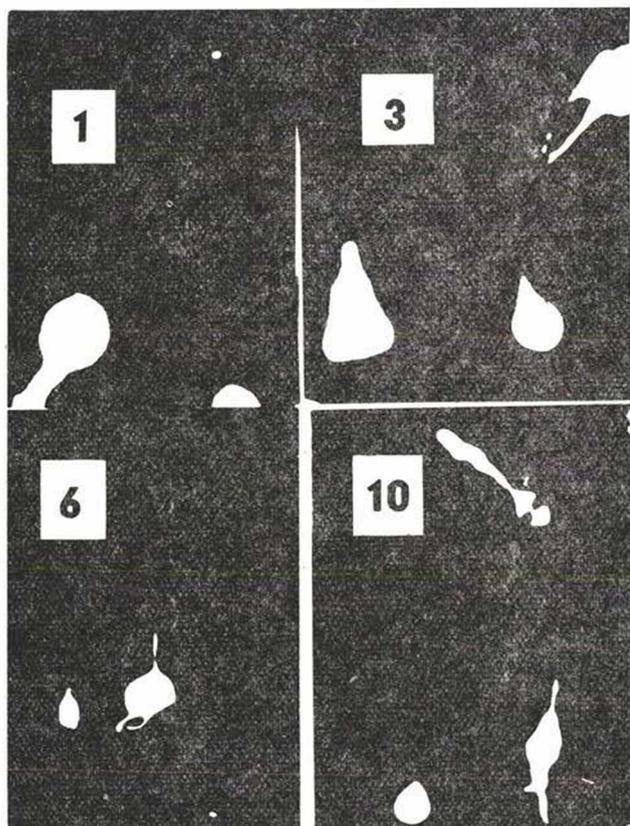


Abb. 1. Autoradiographische Aufnahmen von *Vinca minor*, 1–10 Tage nach Einführung von Tryptophan 2^{14}C

Die Beobachtung der Aktivitätsänderung in Vincamin ließ einen raschen Abstieg wahrnehmen, bald einen kleinen Anstieg, das für die fortlaufende Bildung der Vincamin-Alkaloid spricht. All dem ist ferner zu entnehmen, daß das Vincamin nicht das Endprodukt der Alkaloidbiogenese sein kann. Sechs Tage nach der Inkubation erreicht die Aktivität des Vincamins wieder ein Maximum, und nimmt sodann ab. Es kann möglich sein, daß die Aktivität in andere, diesmal nicht untersuchte Alkaloide, oder in sonstige Stoffwechselprodukte übergeht. Diese Fragen möchten wir noch näher studieren.

Die Entwicklung der Aktivität von Vincin hat ein ähnliches Verhalten zu Vincamin, und läßt unbedingt den Gedanken einer Verknüpfung zwischen ihnen aufkommen. (s. graphische Darstellung, Abb. 2.)

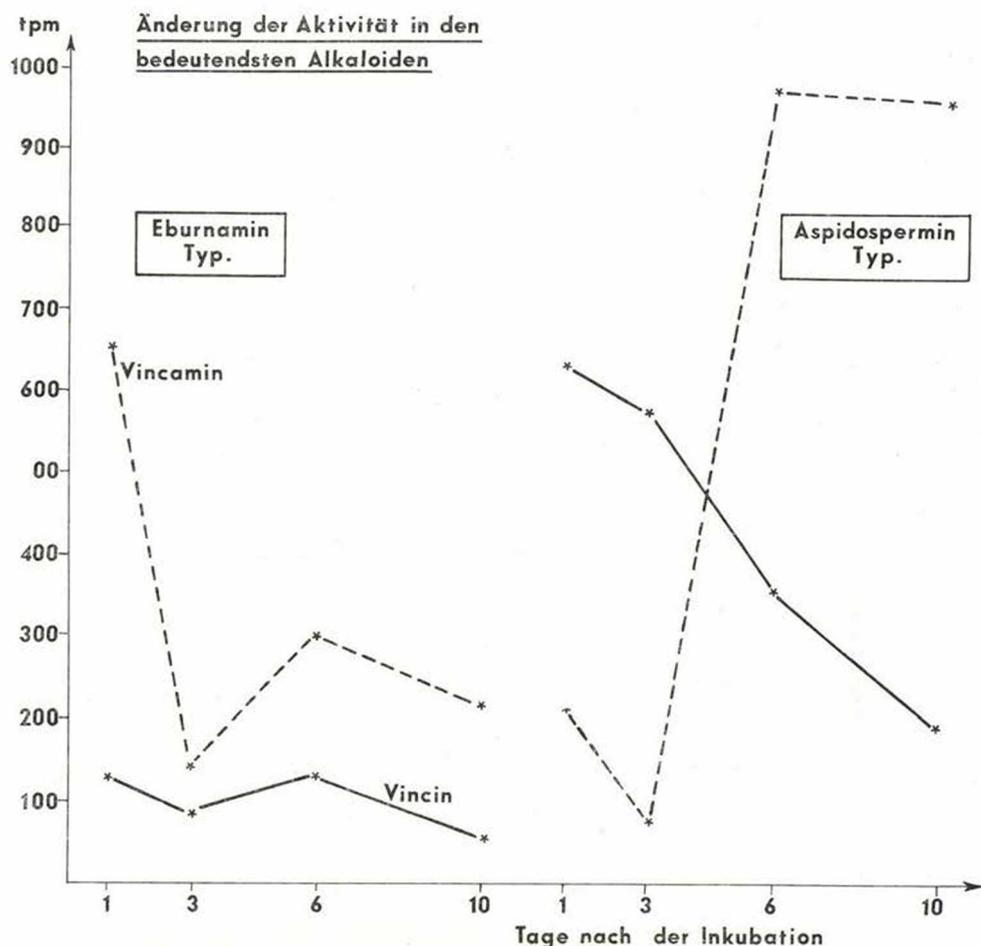


Abb. 2. Aktivitätsänderung in den bedeutendsten Alkaloiden

Rechts: ——— vincaminorein, - - - vincadiformin

Im Typ Aspidospermin können wir zuerst, und mit dem Vincamin vom Typ Eburnamin gleichzeitig, im Alkaloid Vincaminorein die größte Aktivität beobachten. In dieser Verbindung senkt die Aktivität ab bis zum Ende des Versuches, und bei Vincadiformin steigt sie dagegen kräftig zu. Vom 6. Tag nach der Inkubation hat diese Verbindung eine maximalische Aktivität, weit vor den anderen Alkaloiden. Deswegen sollen wir daran denken, daß das Vincadiformin das Endprodukt der Alkaloidbiogenese in der Pflanze sei. — Das Vincaminorein mit seiner zuerst hohen Aktivität steht am Beginn den biogenetischen Bildungsprozesses des Typs Aspidospermin. Seine offene Ringe können sich Vielleicht zu Vincadiformin schließen, und dieser Prozess kann eine Progression bei dem Typ Aspidospermin sein.

Bei den übrigen Alkaloiden können wir auch eine schwache Aktivität finden, dementsprechend gilt ferner auch für sie, daß sie das Tryptophan als einen Präkursor einbauen. — Das Vincanorin und Vincadin haben am Beginn eine beträchtlichere Aktivität und geben diese ab, dagegen wächst in Vincaminin die Aktivität wieder schwach an. — Es findet eine rhythmische und langsame Alkaloidbildung statt.

Tabelle II.

Verteilung der aus Tryptophan 2-¹⁴C eingebauten Aktivität in den untersuchten Alkaloiden der *Vinca minor* L.

Zahl der Tage nach der Inkubation	Typ Eburnamin					Typ Aspidospermin		
	Vincamin	Vincin	Vincaminin	Vincanorin	Epivincamin	Vincaminorein	Vincadifformin	Vincadin
1	655	141	78	137	64	643	213	102
3	141	90	52	31	54	584	84	51
6	302	121	35	20	54	360	961	49
10	239	56	110	62	90	200	957	35

Die Werte sind in tpm angegeben

Zusammenfassung

Der Einbau des Tryptophan 2-¹⁴C wurde in die Alkaloide von *Vinca minor* L. untersucht. Die Aktivität des verwendeten Tryptophans war 3.33 μ C/mg, 792 μ C/mMol. Der Versuch wurde mit frisch eingewurzelten Pflanzen in dreimaliger Wiederholung, mit je 10 Exemplaren vorgenommen. Die Proben wurden unmittelbar nach 24 stündiger Inkubation gleich (als eintägig bezeichnet), dann aus einer Nährlösung nach 3,6 und 10 Tage entnommen, und auf Alkaloidspektrum, mit Hinblick auf die Aktivitätsverteilung untersucht. Die papierchromatographische Methode von Trojanek und Mitarbeitern (1961) wurde angewendet. Kontrolluntersuchungen wurden mittels Dünnschicht-Chromatographie nach Neubauer u. Mothes (1961) und mit Autoradiographie vorgenommen. Von den Papierchromatogrammen wurden die untersuchten Alkaloidflecken eluiert und ihre Aktivität mit einem Szintillationsdetektor gemessen.

Es wurde festgestellt, daß sich das radioaktive Tryptophan in die Alkaloide einbaut, demnach ihre Präkursor-Verbindung ist. Die untersuchten Alkaloiden des Typ Eburnamin und Aspidospermin wurden gleichzeitig radioaktiv, was auf ihre parallele Bildung schließen läßt. Ferner konnten im Verlauf der Versuche Korrelationen zwischen den Alkaloiden Vincamin-Vincin beobachtet werden. Bei Vincaminorein und Vincadifformin findet ein gegengesetzter Bildungsweg statt. — Es kommt deutlich vor, daß der Ringschluß beim Typ Aspidospermin gegen den offeneren Gerüst eine biogenetische Progression ist.

SCHRIFTTUM

- Baxter, R. M. — Kandel, St. — Onakya, I. 1963. Studies on the Biosynthesis of the Ergot Alkaloids. 2. Intern. Arbeitstagung Biochem. Phys. d. Alkaloide. Halle/Saale. Akad. Verl. Berlin, 335—341.
- Böjthe Horváth, K. 1966. Adatok a *Vinca minor* L. piridokantinvázis alkaloidjainak biogeneziséhez. (Beiträge zur Biogenese der Piridokantin-Alkaloide von *Vinca minor* L.). Doktorarbeit. Budapest.
- Clauder, O. — Gesztes, K. — Szász, K. 1962. Tetrahedron Letters **21**: 1147.
- Clauder, O. in Erdei-Grúz, T. 1964. Természettudományi Lexikon (Naturwissenschaftliches Lexikon) A—C. Akad. Kiadó, Budapest. p. 126.
- Doby, G. 1965. Plant Biochemistry. Akad. Kiadó, Budapest.
- Gröger, D. 1963. Über den gegenwärtigen Stand der Erforschung d. Biosynthese d. Mutterkornalkaloide. 2. Intern. Arbeitstagung Biochem. u. Phys. d. Alkaloide. Halle/Saale. Akad. Verl. Berlin. 305—308.
- Hesse, M. 1964. Indolalkaloide in Tabellen. Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg.
- Hubay, R. 1966. A télizöld meténg (*Vinca minor* L.) kultúrába vételének problémái és a műtrágyázás hatása (Probleme der Inkulturnahme von *Vinca minor* L. und die Wirkung der Zufuhr von Kunstdünger). Herba Hung. **5**: 17.
- Leete, E. 1966. Biosynthesis of the Indole Alkaloids. 3. Intern. Arbeitstagung Biochem. Phys. d. Alkaloide. Halle/Saale. Akad. Verl. Berlin, 455—464.
- Leete, E. — Ahmed, A. — Kompis, I. 1965. Biosynthesis of the Vinca Alkaloids I. Feeding experiments with Tryptophan 2-¹⁴C, and Acetate 1-¹⁴. Journ. Amer. Chem. Soc. **87**: 4168—4174.
- Manske, R. H. F. 1968. The Alkaloids XI. Academic Press, New York—London.
- Márk, G. 1963. A *Vinca minor* L. télizöld meténg termesztése (Züchtung der *Vinca minor* L.) II. Heilpflanzen-symposium, Sopron. Vortrag.
- Máthé, I. — Frau Szabó, E. 1963. Adatok a *Vinca minor* L. tájak szerinti hatóanyag-változásához (Beiträge zur regionalen Änderung im Wirkstoffgehalt von *Vinca minor* L.). Herba Hung. **2**: 291—299.
- Mothes, K. — Winkler, K. — Gröger, D. — Floss, H. G. — Mothes, U. — Weyand, F. 1962. Über die Umwandlung von Elimoklavin in Lysergsäurederivate. Tetrahedron Letters **21**: 633—942.
- Neubauer, D. — Mothes, K. 1961. Für Dünnschichtchromatographie der Mohnalkaloide. Planta med. **94**: 466—470.
- Plieninger, H. — Fischer, R. — Liede, V. 1964. Untersuchung zur Biosynthese der Mutterkorn-Alkaloide. II. Ann. Chem. **672**: 233—241.
- Robinson, R. 1955. The Structural Relation of Natural Products. Clarendon Press, Oxford.
- Romeike, A. 1957. Biogenese von Alkaloiden (Übersicht). 1. Intern. Arbeitstagung Biochem. Phys. d. Alkaloide. Halle/Saale. Akad. Verl. Berlin, 43—50.
- Sárkány-Kiss, I. 1962. A hatóanyag-tartalom változása különböző eredetű *Vinca minor* állományok földfeletti hajtásaiban a tenyészidő folyamán (Änderung des Wirkstoffgehaltes in den oberirdischen Sprossen von *Vinca minor*-Beständen verschiedener Herkunft während der Vegetationszeit). Herba Hung. **1**: 155.
- Suhadolnik, R. M. — Chenoweth, R. G. 1958. Biosynthesis of Gliotoxin. 1. Incorporation of Phenylalanine 1- and 2-¹⁴C. Journ. Amer. Chem. Soc. **80**: 4391—4392.
- Szász, K. — Kováts, T. — Karácsóny, M. — Lőrincz, Cs. — Bayer, I. 1959. Über die Alkaloide von Immergrün, *Vinca minor*. Planta med. **7**: 234—245.
- Trojanek, J. — Kavková, K. — Strouf, O. — Cekan, Z. 1961. Über Alkaloide IV. Über die Isolierung von Vincin, eines neuen Alkaloids aus *Vinca minor* L. Coll. Czech. Chem. Commun. **5**: 867—873.
- Váradí, J. — Verzár Petri, G. 1966. A *Vinca minor* L. tápoldatos nevelése és a növények légzésének vizsgálata (Züchtung der *Vinca minor* L. in Nährlösung und Untersuchung der Respiration der Pflanze). Pharm. Acta. Hung. **36**: 27—31.
- Verzár Petri, G. — Váradí, J. — Szarvas, T. 1968. Incorporation of 2-¹⁴C Tryptophan into the free amino acid spectrum of *Vinca minor* L. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. **19**: 75—81.
- Wildmann, W. C. — Fales, H. M. — Battersby, A. R. 1962. Biosynthesis in the *Amaryllidaceae*. The incorporation of 3-¹⁴C Tyrosine in *Sprekalia formosissima*. Journ. Amer. Chem. Soc. **84**: 681—682.