

Untersuchungen am Milchsaft des Schöllkrautes (*Chelidonium majus* L.)

Autor(en): **Jans, Bruno Philipp**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **83 (1973)**

Heft 4

PDF erstellt am: **06.05.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-58456>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Untersuchungen am Milchsafte des Schöllkrautes (*Chelidonium majus* L.)

von *Bruno Philipp Jans*

Institut für Allgemeine Botanik
der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

Manuskript eingegangen am 8. Oktober 1973

Inhalt:

1. Gewinnung und dünnschichtchromatographische Trennung von Alkaloiden.
2. Zur Anreicherung von Alkaloiden in den Vakuolen des Schöllkraut-Milchsafte.
3. Zur Alkaloidwirkung

Zusammenfassung
Summary
Literaturverzeichnis

Zu den auffälligsten Äusserungen der Evolution gehört die Tendenz zur Diversifikation. Sie zeigt sich darin, dass sich die einzelnen Vertreter eines Verwandtschaftskreises oft stark in ihrer Gestalt, ihrem Lebensraum und ihrer Lebensweise unterscheiden. Analog dieser äusserlich wahrnehmbaren Auffächerung lässt sich eine biochemische, innere beobachten, deren Besonderheiten in immer grösserem Umfang bei der systematischen Einteilung der Lebewesen berücksichtigt werden. Die Aufsplitterung ist vor allem im sekundären Stoffwechsel der Pflanzen ausgeprägt. Unter diesem Begriff wird eine Vielzahl von Prozessen zusammengefasst, die physiologisch gesehen nicht unbedingt lebensnotwendig sind und welche zu den verschiedensten Produkten wie Duftstoffe, Aromastoffe, Harze, Polyterpene, Gerbstoffe, Alkaloide u.a.m. führen. Mannigfach ist die Art und Weise, wie diese Stoffe aufbewahrt bzw. ausgeschieden werden. Als Beispiele seien angegeben: Organelle, wie die Vakuolen im Falle von Gerbstoffen oder die Chromoplasten für Xanthophylle und Carotinoide, speziell umgestaltete Zellen, sogenannte Idioblasten, z.B. für Senföle bei Cruciferen und Liliaceen, Milchröhren für Polyterpene (*Hevea*, *Euphorbia*, etc.) oder Alkaloide (Papaveraceen, Apocynaceen, etc.). In anderen Fällen wiederum ist eine Ausscheidung in eigens dazu gebildete Hohlräume zu beobachten, z.B. lysigene Ölbehälter bei den Rutaceen und schizogene Harzgänge bei vielen Coniferen.

Besonders reich an sekundären Stoffwechselprodukten sind viele Arten aus der Familie der Mohngewächse (Papaveraceae). Im Schöllkraut (*Chelidonium majus* L.) sind neben ätherischen Ölen und gerbstoffartigen Verbindungen bis anhin mehr als zwanzig verschiedene Alkaloide nachgewiesen worden (Slavík 1965, Willaman und Li 1970, Vágújfalvi 1971). Die meisten dieser Alkaloide sind Isochinolinderivate (Mothes und Schütte 1969). Der Grossteil der Alkaloide ist in den Milchröhren angehäuft (Wehner 1911, Molisch 1923, Vágújfalvi 1970, Neumann et al. 1972). Mehrere liegen als Salze mit zum Teil charakteristischen, orangeroten bis zitronengelben Farbtönen vor. Sie sind verantwortlich für die gelbe bis orange Farbe des Milchsaftes.

Die Milchröhren des Schöllkrautes sind gegliedert (Mehran 1958); sie enthalten wie jene von *Papaver* nur sehr wenig Polyterpene, und zwar im Plasma (Schulze et al. 1967, Heinrich 1967, Neumann et al. 1972). Charakteristisch sind die zahlreichen kleinen Vakuolen, die, im Gegensatz zu jenen in den Zellen des umliegenden Gewebes, nicht miteinander zu einer grossen Zentralvakuole verschmelzen. Während junge Milchröhren verhältnismässig reich an Organellen wie Dictyosomen, Plastiden, Mitochondrien, usw. sind, weisen ältere fast nur noch Vakuolen auf (Matile et al. 1970, Neumann et al. 1972). Diese lassen sich durch Anschneiden der Milchröhren und fraktionierte Zentrifugation des ausfliessenden Milchsaftes leicht in grosser Reinheit isolieren und können in der Folge biochemisch untersucht werden. Es hat sich dabei herausgestellt, dass sie einerseits lysosomale Eigenschaften besitzen (Matile et al. 1970) und andererseits die in den Milchröhren angehäuften Alkaloide enthalten (Matile et al. 1970, Neumann et al. 1972). Unter geeigneten Bedingungen bleibt die Kompartimentierung auch in isolierten Vakuolen über längere Zeit erhalten; überdies nehmen isolierte Vakuolen zusätzlich gewisse, dem Medium zugegebene Alkaloide auf, wobei allerdings gleichzeitig ein anderer Stoff aus den Vakuolen ins Medium

übertritt. Dies gilt z.B. bei Zugabe von Sanguinarin. Der Vorgang scheint aufgrund der durchgeführten Versuche keine metabolische Energie zu benötigen (Matile et al. 1970). Die Weise, wie die Alkaloide in den Vakuolen angehäuft werden, ist bis anhin jedoch unklar geblieben. In der vorliegenden Arbeit wird daher der vermutlich physikalisch-chemische Mechanismus der Alkaloidspeicherung untersucht. Ein besonderes Interesse gilt dabei der Substanz, die durch gewisse Alkaloide, wie Sanguinarin, aus dem Zellsaft verdrängt werden kann.

Gibt man suspendierten Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes mehr Sanguinarin zu, als sie aufzunehmen vermögen, so lysieren sie in verhältnismässig kurzer Zeit. Das freie, gelöste Alkaloid scheint für die Vakuolen offenbar schädlich zu sein (Matile et al. 1970). In dieser Arbeit wird im weiteren über Versuche berichtet, welche den Einfluss des Sanguinarins und anderer Schöllkraut-Alkaloide auf Zellen und Vakuolen anderer Organismen abzuklären trachten.

Der vorliegende Bericht gliedert sich in drei Abschnitte:

In einem ersten werden die Extraktions- und Reinigungsverfahren geschildert, die bei der Gewinnung der Alkaloide aus getrockneten Stengeln und Blättern des Schöllkrautes angewendet worden sind. Ferner ist die dünnschichtchromatographische Trennung der Alkaloide des Schöllkraut-Milchsaftes beschrieben.

Der zweite befasst sich mit der Alkaloidspeicherung in den Vakuolen des Schöllkraut-Latexes. Zunächst wird die Verteilung einiger Milchsaftbestandteile untersucht und mit jener der Alkaloide verglichen. Dann werden Experimente beschrieben, die sich mit dem Mechanismus der Alkaloidspeicherung in den Vakuolen auseinandersetzen.

Im dritten Abschnitt wird die Wirkung einiger Schöllkraut-Alkaloide auf die Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes sowie auf Zellen und Vakuolen anderer Lebewesen untersucht. Im vorliegenden Falle sind hiezu praktisch nur Hefen verwendet worden.

1. Gewinnung und dünnschichtchromatographische Trennung von Alkaloiden

Wie bereits erwähnt, enthält der Milchsaft des Schöllkrautes zahlreiche Alkaloide. Es war deshalb notwendig, eine Auswahl zu treffen. Diese ist nach den folgenden Gesichtspunkten durchgeführt worden:

- Das Alkaloid muss in relativ grosser Menge vorhanden sein.
- Es muss leicht identifiziert werden können.

1.1. Material und Methoden

1.1.1. Material

Zur Alkaloidgewinnung sind die oberirdischen Teile des Schöllkrautes verwendet worden. Sie wurden hiezu entweder bei Zimmertemperatur oder bei 80°C getrocknet und danach zerkleinert. Für die Dünnschichtchromatographie wurde meist Milchsaft benützt. Dieser wurde direkt in Wasser, Methanol oder Aethanol aufgenommen, und zwar unmittelbar nach dem Schnitt durch Stengel oder Blattstiele. Um Oxydationen beim Aufbewahren der Proben zu verhindern, wurde Mercapto-Aethanol oder L-Cystein bis zu Endkonzentrationen von 1–5 mM hinzugegeben.

Zur Identifikation einzelner Alkaloide sind Vergleichssubstanzen herbeigezogen worden, nämlich Sanguinarin-Chlorid, Chelidonin, Stylopin (alle Koch-Light Laboratories Ltd, London) und Berberin-Chlorid (Fluka, Buchs).

1.1.2. Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Es wurde mit Kieselgel G DC-Platten mit oder ohne Fluoreszenzfarbstoff gearbeitet (Merck F₂₅₄, Art. Nr. 5715 bzw. 5721/0025). Die verwendeten Laufmittel sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Meist wurden die Lösungsmittel I und IV benützt.

Tabelle 1:

Übersicht über die erprobten Laufmittel.

Laufmittel	I	II	III	IV	V
Petrolaether *	—	80	60	—	—
(Siedepunkt ca. 60°C)	—	—	—	120	140
Benzol	85	120	90	80	70
Chloroform	—	10	10	10	10
Aethanol	15	30	20	30	30
Methanol	1	5	5	5	5
Wasser	2	15	10	15	15
Eisessig	—	—	—	+	+
Mercapto-Aethanol (0,4% Endkonz.)	—	—	—	+	+

* Teile im Laufmittel

Nachdem die Front des Laufmittels eine Strecke von ungefähr 16 cm zurückgelegt hatte, wurden die Platten an der Luft getrocknet und sogleich bei Tageslicht und im ultravioletten Licht (UV) bei 366 nm und 253,7 nm betrachtet.

Um die Alkaloide sichtbar zu machen, sind die folgenden Sprühreagenzien verwendet worden: Malonsäure-Salicylaldehyd, 4-Methylumbelliferon sowie Dragendorffs Reagens (Waldi 1962). Ferner wurden Anisaldehyd-Schwefelsäure und Rhodamin B benützt, um neben Alkaloiden auch andere Stoffe, z.B. Phenole und Terpene, anzufärben.

1.1.3. Isolation von Alkaloiden mittels Säulenchromatographie

Getrocknete und zerkleinerte Sprosssteile des Schöllkrautes wurden zunächst dreimal mit Chloroform-Methanol (80:20) und danach mit Methanol-Essigsäure (80:20) extrahiert. Die Auszüge wurden mit Hilfe eines Vakuum-Rotationsverdampfers fast bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit 0,2 n Natronlauge versetzt und anschliessend mit Chloroform ausgeschüttelt, wobei die Alkaloide in die organische Phase gelangten.

Diese wurde wiederum abgedampft und der Rückstand möglichst konzentriert in Chloroform-Methanol-Essigsäure (90:10:1) aufgelöst. Die säulenchromatographische Trennung wurde an Kieselgel (Merck, 70–325 Mesh) durchgeführt, der hiezu in Chloroform-Methanol-Essigsäure (90:10:1) aufgeschlämmt worden war. Dasselbe Gemisch wurde bis zur Elution des Chelerythrins verwendet, anschliessend Chloroform-Methanol-Essigsäure (70:30:1). Während des Trennvorganges liess sich das Wandern der einzelnen Alkaloide anhand ihrer charakteristischen Fluoreszenz im UV verfolgen. Die aufgefangenen Fraktionen wurden eingedickt und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf ihre Reinheit geprüft. War eine weitere Reinigung notwendig, wurde erneut an der oben beschriebenen Säule getrennt. Nach völliger Reinigung wurde umkristallisiert. Die in Frage kommenden Alkaloide wurden dazu in wenig Wasser gelöst und durch Zugabe von verdünnter Salzsäure zum Auskristallisieren gebracht. Die Reinheit der Substanzen wurde mit Schmelzpunktkontrollen und mittels DC geprüft.

1.1.4. Identifikation der Alkaloide

Nachdem die isolierten Alkaloide konstante Schmelzpunkte und dünnschichtchromatographische Reinheit erreicht hatten, wurden Ultraviolett- und Infrarot-Spektren aufgenommen. Die UV-Spektren wurden in methanolischer Lösung mit Hilfe eines Beckman DB-Gerätes mit Schreiber aufgezeichnet. Die IR-Spektren wurden mit einem Natriumchlorid-Spektrophotometer, Perkin-Elmer, Modell IR 137, gewonnen. Die erhaltenen Schmelzpunkte und Spektren wurden mit den in der Literatur veröffentlichten verglichen (Holubek u. Strouf 1965 und 1966, Sangster und Stuart 1965).

1.2. Ergebnisse

1.2.1. Zur Trennung von Alkaloiden mittels Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Vorversuche mit Hilfe von DC ergaben neben einer Reihe schwach gefärbter vier stark gefärbte Banden, die sich auch bei zweidimensionaler Trennung nicht weiter zerlegen liessen und in den Nachweisreaktionen für Alkaloide positiv reagierten. Da alle vier Alkaloide sowohl bei Tageslicht als auch im langwelligen Ultraviolett charakteristische Eigen- bzw. Fluoreszenzfarben zeigen (s. Tab. 2), also auch ohne Nachweisreaktionen zu erkennen sind, sind sie für die weiteren Versuche ausgewählt worden. Die Eigenfarbe ist jedoch nur im sauren und neutralen pH-Bereich zu beobachten, d.h. falls die Alkaloide als Kationen vorliegen.

Die R_f -Werte der vier ausgewählten Alkaloide A, B, C und D in Laufmittel I sind in der Tabelle 2 zusammengestellt, ebenso ihre Eigen- und Fluoreszenzfarbe. Während A und C anhand von Vergleichssubstanzen leicht identifiziert werden konnten, war dies bei B und D erst nach Säulenchromatographie möglich, als genügend Material zur Aufnahme von UV- und IR-Spektren sowie zur Bestimmung der Schmelzpunkte vorhanden war. Die vier Alkaloide sind aufgrund dieser drei Kriterien als Sanguinarin (A), Chelerythrin (B), Berberin (C) und Coptisin (D) identifiziert worden (Stukturformeln siehe Abbildung 1). Im Falle des Chelerythrins ist allerdings zu bemerken, dass sich die Verbindung stets etwa

4⁰ C unter dem in der Literatur angegebenen Schmelzpunkt von 213⁰ C zersetzt hat; trotzdem liessen die Chromatogramme keine Verunreinigungen erkennen. Überdies stimmen UV- und IR-Spektren mit den veröffentlichten (Holubek und Strouf 1965) gut überein.

Tabelle 2:

Eigenfarbe, Fluoreszenzfarbe und R_f-Werte der vier Alkaloide.

Alkaloid	Bezeichnung	Farbe im Tageslicht	Fluoreszenzfarbe bei 366 nm	R _f x 100 (*)
Sanguinarin	A	rotorange	orange	88
Chelerythrin	B	goldgelb- zitronengelb	goldgelb	78
Berberin	C	zitronengelb	grün	32
Coptisin	D	gelb-gelbbraun	zitronengelb	19

(*): Die Werte beziehen sich auf Laufmittel I (s. Tab. 1).

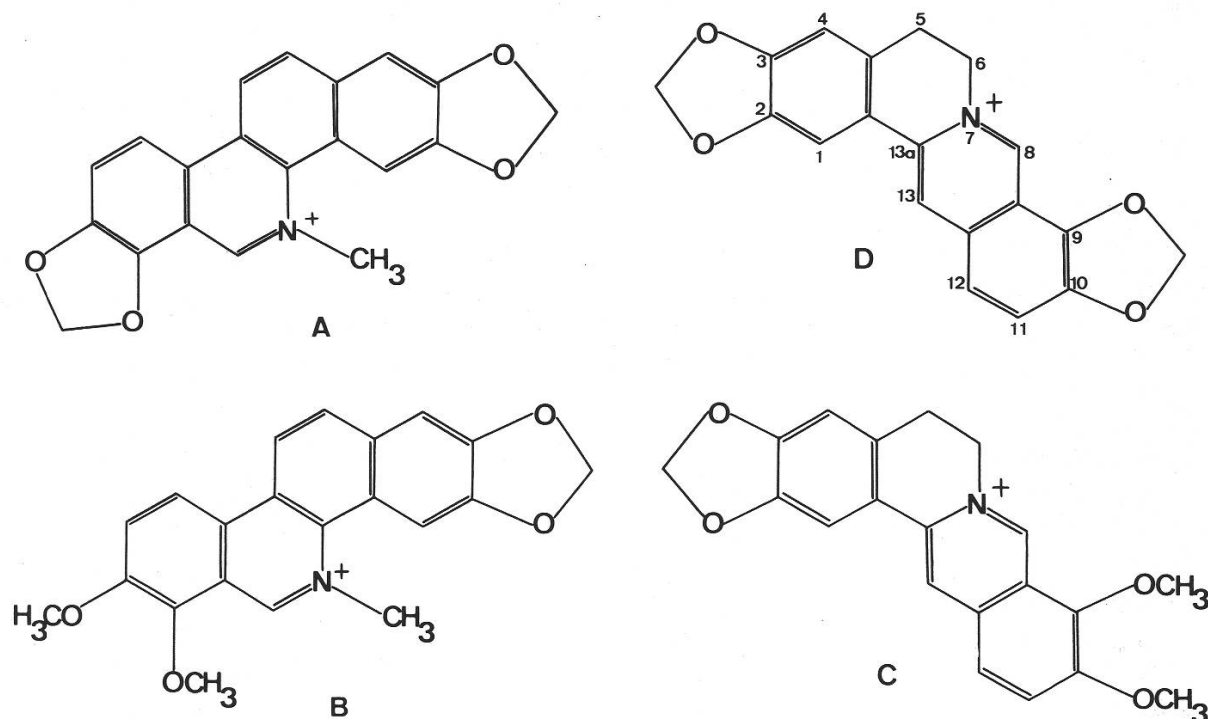


Abbildung 1:

Strukturformeln der Alkaloide Sanguinarin (A), Chelerythrin (B), Berberin (C) und Coptisin (D). Alle vier Alkaloide sind als Kationen dargestellt, d.h. in derselben Form, wie sie im Milchsaft vorliegen. Beim Dihydrocoptisin ist die Bindung 7–8 einfach.

Da alle vier Alkaloide eine typische Eigenfarbe zeigen, ist ihr Spektrum auch im sichtbaren Licht aufgenommen worden (Abb. 2). Die maximale Absorption ist in diesem Spektralbereich im Vergleich zum Ultraviolett allerdings etwa 4–5 mal kleiner.

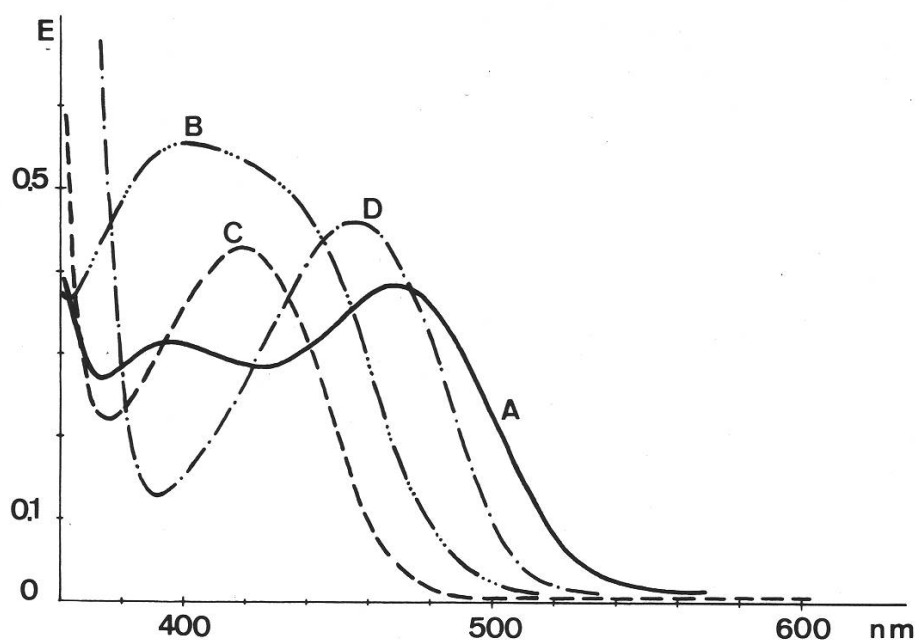


Abbildung 2:

Absorptionsspektren der vier ausgewählten Chelidonium-Alkaloide im sichtbaren Licht und im nahen Ultraviolett.

A Sanguinarin, B Chelerythrin, C Berberin, D Coptisin.

$E_{\max}$: A 468 und 396 nm, B 398 nm, C 420 nm, D 457 nm.

Ansätze: 30 μg Alkaloid pro ml Wasser; Lösung eingestellt auf pH 6.0.

1.2.2. Dihydrocoptisin, ein weiteres Schöllkraut-Alkaloid

Zunächst sind neben Laufmittel I nur II und III benützt worden, um Milchsafproben mittels DC aufzutrennen. Dabei schienen alle Alkaloide unter den gewählten Bedingungen stabil zu sein. Selbst die Oxydation der phenolischen Verbindungen des Milchsafes, die in Abwesenheit von Reduktionsmitteln eintritt, schien keinen Einfluss auf die vorhandenen Alkaloide zu haben, eine Vermutung, die sich aus dem folgenden Versuch ergab: Eine Probe frischen Milchsafes wird mittels DC aufgetrennt. Daraufhin werden die einzelnen Banden mit Wasser oder Methanol extrahiert. Von jedem Extrakt wird eine Probe auf eine neue DC-Platte aufgetragen und auf dieselbe Platte zusätzlich Proben von frischem und von länger aufbewahrtem Milchsaf gebracht. Beim länger aufbewahrten Saft sind die phenolischen Verbindungen bereits oxydiert und als schwarzer Niederschlag ausgefallen; er wird deshalb fortan als oxydierter Milchsaf bezeichnet. Vergleicht man nun die chromatographierten Proben miteinander, so fallen zunächst keinerlei Unterschiede hinsichtlich der R_f -Werte, Konzentrationen, Farben, Fluoreszenzfarben und der Spektren (220–760 nm) der einzelnen Alkaloide auf. Eine Ausnahme bildet lediglich die Region des Startpunktes; im oxydierten Milchsaf fehlen dort die phenolischen Verbindungen infolge Präzipitation der Melanine fast vollständig.

Dass jedoch zumindest im nicht oxydierten Milchsaf Veränderungen während des DC-Trennvorganges eintreten, wird aus einem Vergleich der Spektren des gesamten Milchsafes vor und nach DC ersichtlich. Während die maximale

Absorption von frischem Milchsafft vor dem Chromatographieren bei 400 nm liegt, ist sie nachher bei 450 nm. Der absolute Betrag nimmt dabei bei 400 nm ab und steigt bei 450 nm an. Nach der Chromatographie stimmt das Spektrum der wiedervereinigten Alkaloide mit jenem von oxydiertem Milchsafft überein, und zwar gleichgültig, ob dieser chromatographiert worden ist oder nicht (Abb. 3).

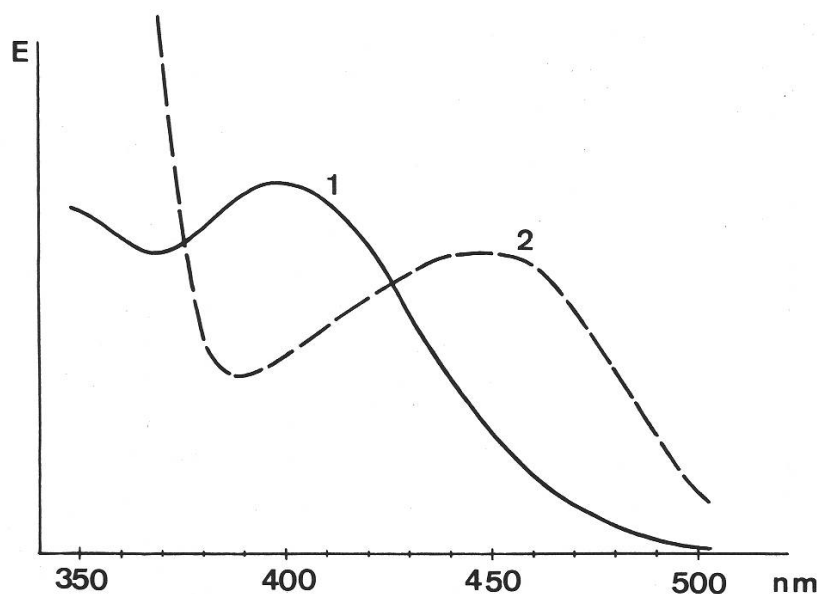


Abbildung 3:

Absorptionsspektren von frischem Milchsafft vor und nach DC, bzw. von nicht oxydiertem und von oxydiertem Milchsafft.

- 1 frischer Milchsafft vor DC bzw. nicht oxydierter Milchsafft ($E_{\max}$: 400 nm).
- 2 frischer Milchsafft nach DC bzw. oxydierter Milchsafft ($E_{\max}$: 450 nm).

Die Vermutung liegt somit nahe, dass die unterschiedlichen Spektren des chromatographierten respektive nicht chromatographierten frischen Milchsafftes auf Oxydation von Milchsafftbestandteilen während der DC zurückzuführen sind. Diese dürfte allerdings zu Beginn der Chromatographie stattfinden, weil ja die Chromatogramme von frischem und von oxydiertem Milchsafft keine Unterschiede zeigen. Kurz nach Beginn der Chromatographie kann man in der Tat bei frischen Milchsafftproben zwischen Berberin und Chelerythrin eine weitere, kräftige, gelbe Bande erkennen, die aber bald stehen bleibt, schwächer wird und von Berberin überholt wird. Danach ist sie nicht mehr zu sehen.

Zur Abklärung der Identität dieses vorübergehend auftretenden Stoffes sind in der Folge Laufmittel mit Mercapto-Aethanol als Reduktionsmittel verwendet worden (Trenngemische IV und V in Tab. 1). Andere reduzierende Verbindungen anstelle von Mercapto-Aethanol haben sich nicht bewährt. Die Chromatogramme mit den neuen Laufmitteln zeigen als wesentlichsten Unterschied zu den bisher beschriebenen eine zusätzliche, sehr markante Bande zwischen Berberin und Chelerythrin (Tabelle 3). Ihre Farbe ist intensiv zitronengelb; die Fluoreszenz bei 366 nm ist nur ganz schwach dunkelolivgrün; im kurzwelligen Erregerlicht (253.7 nm) erscheint die Bande als dunkler Streifen. Die Coptisin-Bande ist im

Vergleich zur Trennung mit Laufmittel I bedeutend schwächer. Die Absorptionsspektren von frischem Milchsaff stimmen vor und nach DC mit den Laufmitteln IV und V gut miteinander überein; in beiden Fällen liegt die maximale Absorption bei 400 nm (s. Abb. 3). Wird oxydierter Milchsaff mit Trenngemischen, die Mercapto-Aethanol enthalten, chromatographiert, so treten dieselben Banden auf wie mit den Laufmitteln ohne Mercapto-Aethanol; es lassen sich keine neuen Flecke ermitteln.

Lässt man ein Chromatogramm von nicht oxydiertem Milchsaff, das mit Laufmittel IV oder V angefertigt worden ist, einige Tage stehen, so verfärbt sich die neue Bande (fortan als Bande E bezeichnet) allmählich von zitronengelb nach gelb-gelbbraun, d.h. sie nimmt immer mehr die Farbe des Coptisins an. Der gleiche Effekt kann innerhalb von ca. 30 Minuten erreicht werden, wenn das Chromatogramm bei 100°C gelagert wird. Es scheint aufgrund der folgenden Sachverhalte, dass sich der Stoff in Bande E tatsächlich in Coptisin umwandelt: Wird eine Probe von nicht oxydiertem Milchsaff einer zweidimensionalen Chromatographie mit Mercapto-Aethanol enthaltenden Laufmitteln unterzogen, so tritt bei der Bande E neben dem typisch zitronengelb leuchtenden Fleck ein mit verlängertem zeitlichem Intervall zwischen erster und zweiter Trennung immer grösser werdender gelb bis gelbbrauner Fleck auf. Sein R_f-Wert stimmt mit jenem des Coptisins überein, ebenso sein Spektrum zwischen 220 und 760 nm. Umgekehrt wird der zitronengelbe Fleck immer kleiner. Der Coptisinfleck ist überdies in Chromatogrammen, die ohne Mercapto-Aethanol angefertigt werden, bedeutend grösser; dafür fehlt dort die Bande E (Tab. 3).

Der in Abbildung 3 dargestellte Unterschied der Absorptionsspektren von nicht oxydiertem und von oxydiertem bzw. mit Trenngemisch I chromatographiertem Milchsaff dürfte demzufolge der Oxydation eines Alkaloids zuzuschreiben sein, als deren Produkt Coptisin entsteht.

Tabelle 3:

Beziehung zwischen Alkaloidspektrum und Laufmittel bei DC-Auftrennung von nicht oxydiertem Milchsaff. Vergleich zweier Chromatogramme:

Laufmittel I: ohne Reduktionsmittel

Laufmittel IV: mit 0,4% Mercapto-Aethanol als Reduktionsmittel.

In beiden Fällen ist gleichviel Milchsaff aufgetragen worden.

Alkaloid	R _f x 100		Gehalt an Alkaloiden	
	Laufmittel I	Laufmittel IV	Laufmittel I	Laufmittel IV
Sanguinarin (A)*	88	76	3,14 µg	3,29 µg
Chelerythrin (B)	78	72	1,51	1,72
Berberin (C)	32	30	3,18	2,17
Coptisin (D)	19	24	13,92	5,76
Dihydrocoptisin (E)**	—	69	—	10,57

* Bezeichnung der entsprechenden Bande im Chromatogramm in Klammern.

** Zur Bestimmung des Gehaltes sind die Chromatogramme 45 Minuten bei 100°C gelagert worden, wodurch Dihydrocoptisin in Coptisin übergegangen ist.

Ein dem Coptisin sehr nahe verwandtes Alkaloid ist das Stylopin (d,l-Tetrahydrocoptisin), das auch im Milchsaft des Schöllkrautes nachgewiesen werden kann. Stylopin ist jedoch farblos und im verwendeten pH-Bereich von 6.7 bis 7.0 schlecht löslich in Wasser. Bei DC blieb die Reinsubstanz zudem stets stabil. Die Verbindung in Bande E steht allem Anschein nach zwischen Stylopin und Coptisin; denn sowohl bei Oxydation von Stylopin als auch bei Reduktion von Coptisin konnte sie mittels DC in minimier Ausbeute neben anderen Produkten nachgewiesen werden. Zwischen Stylopin und Coptisin steht das Dihydrocoptisin. Dieses Alkaloid ist denn auch in Gegenwart von Luftsauerstoff instabil und wird zu Coptisin oxydiert (Klasék et al. 1968).

Im Rahmen der durchgeführten Versuche war es unmöglich, Schmelzpunkt und IR-Spektrum des Dihydrocoptisins zu bestimmen. Es ist lediglich das Absorptionsspektrum zwischen 220 und 760 nm aufgenommen worden (Abb. 4).

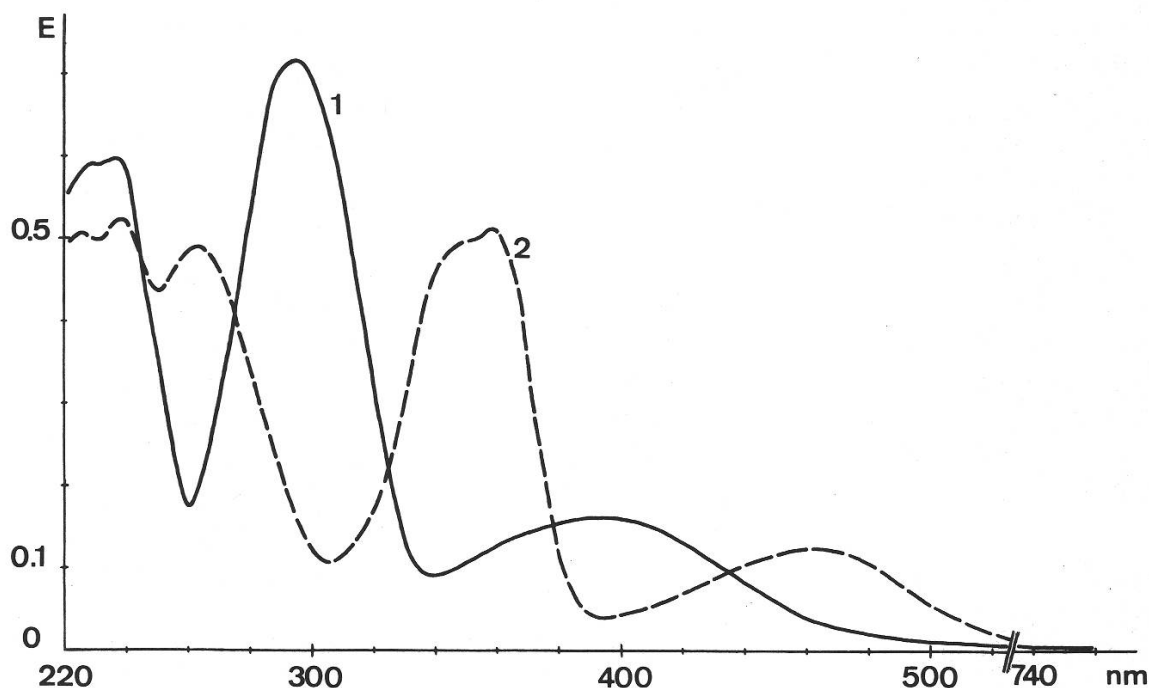


Abbildung 4:

Absorptionsspektren von Coptisin und von Dihydrocoptisin.

1 Dihydrocoptisin

$E_{\max}$: 228 nm, 237 nm, 295 nm und 394 nm.

2 Coptisin

$E_{\max}$: 225 nm (4.38), 241 nm (4.36), 265 nm (4.34), 357 nm (4.36) und 457 nm.

In () sind die Werte für $\log \epsilon$ angegeben (Holubek und Strouf 1965).

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, ist das Dihydrocoptisin im Milchsaft in wesentlich höherer Konzentration vorhanden, als die vier übrigen Alkaloide.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass neben Dihydrocoptisin noch andere leicht oxydierbare Alkaloide im Milchsaft vorhanden sind, wie z.B. Dihydroberberin. Für die Gegenwart dieses Alkaloids liegt ein Hinweis vor; denn mit den Laufmitteln IV und V chromatographierte Proben wiesen eine ganz schwache

Bande mit R_f -Werten von 0.38 bzw. 0.20 auf, die anfänglich keine Fluoreszenz bei 366 nm zeigte und nur im kurzwelligen Ultraviolett als dunkler Fleck erkennbar war, die aber nach einiger Zeit bei 366 nm die gleiche Fluoreszenz wie das Berberin aufwies.

1.3. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie stark das ursprüngliche Alkaloidspektrum durch die Methoden zur Anreicherung oder Trennung der einzelnen Substanzen verändert werden kann. Auch Nyomárkay (1971) findet beachtliche Unterschiede im Alkaloidgehalt der Proben von Schöllkrautpflanzen, wenn sie dieselben auf verschiedene Weisen trocknet. Die höchsten Gehalte verzeichnet sie in grünen Proben und in getrockneten, welche zu Beginn der Trocknung auf 105°C erhitzt und hierauf bei Zimmertemperatur oder bei 60°C gelagert wurden. Wesentlich geringere Alkaloidmengen findet sie nach Trocknung bei Zimmertemperatur oder bei 60°C ohne vorherige Erhitzung auf 105°C. Sie schreibt die Unterschiede Enzymen zu, durch deren Tätigkeit Alkaloide verändert werden. Im ersten Falle würden diese denaturiert, im zweiten dagegen nicht. Neben eventuell vorhandenen, Alkaloide abbauenden Enzymen könnten vor allem Phenoloxidasen in Frage kommen. Bei Trocknung ohne vorherige Erhitzung auf 105°C können diese die phenolischen Verbindungen beim Absterben der welkenden Gewebe ungehindert angreifen. Die dabei entstehenden Produkte (vor allem Chinone) sind reaktionsfreudig; sie setzen sich mit anderen Verbindungen um und die sich bildenden Melaninpräzipitate stellen Gemenge von phenolischen Verbindungen, Proteinen und anderen Zellinhaltsstoffen, unter anderen auch Alkaloide, dar. Im zweiten Falle, also bei kurzer Erhitzung auf 105°C zu Beginn der Trocknung, sind die Phenoloxidasen denaturiert worden. Die Oxydation der phenolischen Verbindungen verläuft somit langsamer, so dass sich bis zur völligen Trocknung weniger Melaninpräzipitate bilden dürften. In den hitzebehandelten Proben herrschen zudem andere Bedingungen, weil die zelluläre Organisation zerstört worden ist und die Kompartimentierung einzelner Stoffe somit schon zu Beginn der Trocknung aufgehoben ist. Es kann dies eine vermehrte Ausfällung von phenolischen Verbindungen mit denaturierten Proteinen bewirken.

Aus den vorliegenden Resultaten darf geschlossen werden, dass Dihydrocoptisin bei jeder Trocknung von Schöllkraut-Material zerstört werden dürfte, es sei denn, die Proben werden in Sauerstoff-freier Atmosphäre getrocknet und aufbewahrt. Auch bei den gängigen Verfahren zur Isolation grösserer Mengen von Alkaloiden mittels Säulenchromatographie wird das Dihydrocoptisin in Coptisin umgewandelt. Hingegen dürfte das Alkaloid in frisch bereiteten wässrigen oder alkoholischen Extrakten zumindest anfänglich vorhanden sein. Dasselbe kann auch für die phenolischen Verbindungen gesagt werden. Es bleibt abzuklären, wie stark die pharmakologischen Eigenschaften von Schöllkrautproben (siehe auch 3.3., S. 337) durch die Anwesenheit bzw. das Fehlen von Dihydrocoptisin und den ursprünglich vorhandenen phenolischen Verbindungen beeinflusst werden.

Die in diesem Abschnitt aufgezeigte Beziehung zwischen Coptisin und Dihydrocoptisin lässt vermuten, dass das Coptisin auch in den Milchröhren des Schöllkrautes durch Oxydationsprozesse spontan aus Dihydrocoptisin entstehen kann. Reduzierende Verbindungen, wie z.B. Ascorbinsäure, dürften die Oxydation wohl stark verzögern, nicht aber ganz verhindern. Einmal gebildetes Coptisin wird kaum wieder zu Dihydrocoptisin reduziert. Jedenfalls sind diesbezügliche Versuche mit Ascorbinsäure und Coptisin *in vitro* ohne Erfolg geblieben.

2. Zur Anreicherung von Alkaloiden in den Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes

Der vorliegende Abschnitt umfasst zwei Teile. Der erste geht von der eingangs erwähnten Beobachtung aus, dass Sanguinarin von Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes aufgenommen wird, wobei diese gleichzeitig andere Verbindungen ins Medium abgeben. Es wird die Natur der durch Sanguinarin offenbar aus dem Zellsaft verdrängten Stoffe untersucht. Ferner wird geprüft, ob neben Sanguinarin auch andere Alkaloide Inhaltsstoffe der Vakuolen zu verdrängen vermögen.

Der zweite Teil setzt sich mit dem Mechanismus der Speicherung von Alkaloiden in den Vakuolen auseinander. Das Augenmerk wird vor allem auf mögliche Ladungspartner der Alkaloide gerichtet; denn diese liegen im Zellsaft beim herrschenden pH von ca. 6.7 grösstenteils als Kationen vor.

2.1. Material und Methoden

2.1.1. Pflanzenmaterial

Es wurde mit Milchsaft aus den oberirdischen Teilen des Schöllkrautes gearbeitet. Die Pflanzen sind entweder im Freien oder im Gewächshaus (16–20°C; 16 Std./Tag Belichtungszeit) aufgezogen worden. Zur Gewinnung des Milchsaftes wurden die Pflanzen mit einer Rasierklinge angeschnitten. Der austretende Latex wurde sofort mit einer Pasteurpipette sorgfältig weggesogen und im folgenden Medium suspendiert: 0.45 m Sorbit, 0.01 m Citrat-NaOH (pH 6.7), 0.001 m L-Cystein (=Sorbit-Medium).

2.1.2. Isolation der Vakuolen aus Schöllkraut-Milchsaft

Durch zweimalige Zentrifugation (30 Min. bei 600 x g) wurden die Vakuolen vom übrigen Milchsaft getrennt und gereinigt; sie sedimentierten aufgrund ihrer hohen spezifischen Dichte von 1.25 schnell (Matile et al. 1970). Die erhaltene Vakuolenfraktion wurde im oben beschriebenen Sorbitmedium aufgeschlämmt, wobei jedoch der Gehalt an L-Cystein oft auf 2 bis 5 x 10⁻⁴ m erniedrigt wurde.

2.1.3. Dünnschicht-Chromatographie

Die Alkaloide wurden nach der im Abschnitt 1.1.2. beschriebenen Methode chromatographiert. Zur Auftrennung der anionischen Vakuoleninhaltsstoffe wurden die in Tabelle 4 angegebenen Laufmittel benützt; sie eigneten sich vor allem zur Trennung von phenolischen Säuren, Catechinen, Gerbstoffen, Flavonoiden, Chelidonsäure und Chelidamsäure.

Tabelle 4:

Laufmittel zur Trennung anionischer Zellsaftbestandteile.

Laufmittel	VI	VII	VIII
Petrolaether *	20	20	20
Chloroform	40	40	40
Aethanol	40	40	40
Methanol	20	20	20
Wasser	15	25	25
Eisessig	30	40	30

* Teilé im Laufmittel

Die Chromatogramme wurden mit Kieselgel G DC-Platten Merck mit und ohne Fluoreszenzfarbstoff angefertigt.

2.1.4. Dünnschicht-Elektrophorese

In Anlehnung an Pastuska und Trinks (1961) wurden Kieselgel G DC-Platten zur elektrophoretischen Trennung anionischer Zellsaftbestandteile verwendet. Als Elektrolyt diente ein Gemisch von 80 ml Aethanol, 30 ml Wasser, 4 g Borsäure und 2 g kristallwasserhaltigem Natriumacetat, wobei das pH mit Eisessig auf 4.5 eingestellt wurde. Die Spannung betrug 20 V/cm Laufstrecke, die Stromstärke 40 bis 45 mA, die Temperatur 4°C und die Trenndauer 2 bis 3 Stunden.

2.1.5. Sichtbarmachung

Alkaloide wurden mit den in Abschnitt 1.1.2. angegebenen Reagenzien angefärbt und phenolische Verbindungen mit den folgenden Sprühlösungen sichtbar gemacht: Aluminiumchlorid (1% aethanolische Lösung), Echtblausalz B (0.5% wässrige Lösung), Eisen-III-Chlorid (1% wässrige Lösung), Vanillin-Salzsäure (2% in HCl [1.19]), Phosphormolybdänwolframsäure (Folin-Ciocalteu-Reagens) und Anisaldehyd-Schwefelsäure (Waldi 1962).

Säuren wurden mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol-Na (0.1% aethanolische Lösung) sichtbar gemacht (Waldi 1962).

Als allgemeine Sprühreagenzien für organische Verbindungen wurden zudem sodaalkalische Permanganatlösung (Randerath 1962) verwendet, ferner Jod (0.3% in Chloroform), wobei die Platten nach wenigen Minuten mit 0.5% Stärkelösung nachbehandelt wurden, um die durch Jod angefärbten Flecke deutlicher sichtbar zu machen.

2.1.6. Versuche zur Aufnahme von Alkaloiden durch die Vakuolen

Isolierten Vakuolen wurde Sanguinarin, Chelerythrin, Berberin oder Coptisin in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Die Chloride der Alkaloide wurden dabei vorher in Sorbitmedium aufgelöst. Berberin wurde von Fluka AG, Buchs bezogen, Sanguinarin von Koch-Light Laboratories Ltd, London. Chelerythrin, Coptisin und ein Grossteil des verwendeten Sanguinarins wurden aus Chelidonium isoliert (vergl. Abschnitt 1.1.3.).

Die Aufnahme von Alkaloiden aus dem Medium wurde wie folgt überprüft:

a) Die Aufnahme des zugegebenen Alkaloids wurde photometrisch verfolgt (Matile et al. 1970). Um Störungen durch andere Vakuoleninhaltsstoffe (phenolische, gerbstoffartige Verbindungen, Chelidonsäure, andere Alkaloide, usw.) möglichst auszuschalten, wurde bei den Absorptionsmaxima der zugegebenen Alkaloide im sichtbaren Licht gearbeitet (Sanguinarin 396 und 468 nm, Chelerythrin 398 nm, Berberin 420 nm, Coptisin 455 nm). Als Messgerät wurde ein Beckman DB Spektrophotometer mit Schreiber benützt.

b) Die Aufnahme zugegebener Alkaloide in die Vakuolen wurde quantitativ bestimmt. Die Ansätze wurden hierzu nach Alkaloidzugabe 10 bis 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann 15 Minuten bei 3000x g zentrifugiert. Überstände und Sedimente wurden sodann lyophilisiert, die Rückstände in wenig Wasser gelöst und mit Aceton versetzt, um Sorbit und Citrat auszufällen. Nachdem die Niederschläge abzentrifugiert worden waren, wurde der Aceton verdampft. Alle Proben wurden sodann nochmals lyophilisiert und die Rückstände in wenig Wasser/Essigsäure (5:1) aufgenommen. Nach DC von Aliquoten jedes Ansatzes wurden die einzelnen Alkaloidbanden mit Methanol/Essigsäure (14:1) extrahiert und ihr Gehalt photometrisch ermittelt. Gemessen wurde bei 282 nm im Falle von Sanguinarin und Chelerythrin und bei 265 nm im Falle von Berberin und Coptisin. Als Messgerät diente entweder ein Beckman DU Photometer oder ein Beckman DB Spektrophotometer.

2.1.7. Selektive Ausfällung von Alkaloiden

Die Experimente wurden hauptsächlich mit Sanguinarin und Coptisin durchgeführt. Die Alkaloide (1 mg/ml Wasser) wurden einzeln oder als Gemisch den Lösungen folgender Stoffe beigegeben: Gallus-Säure, Kaffee-Säure, Chelidonsäure, Chlorogensäure, Tannin, Catechin/Epicatechin sowie Gemischen dieser Verbindungen. Die Endkonzentration in den Ansätzen betrug 0.003–0.3 m für die Säuren, 0.13–2.0 mg/ml für Tannin, 0.1–0.3 mg/ml für Catechin/Epicatechin und 0.1–0.4 mg/ml für die Alkaloide. Das pH lag bei 6.5.

Die Ansätze wurden 70 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann 15 Minuten bei 3000x g zentrifugiert und die Sedimente in Aethanol/Wasser (90:10) wieder aufgelöst.

Mittels DC wurde die Verteilung der Alkaloide in den Sedimenten und Überständen überprüft. Für qualitative und halbquantitative Bestimmungen wurden die Chromatogramme im sichtbaren und im ultravioletten Licht betrachtet. Quantitative Bestimmungen wurden nur in den Ansätzen mit Sanguinarin oder Coptisin durchgeführt. Hierzu wurden jedem Ansatz zwei gleiche Volumenteile entnommen, der eine mit vier Teilen absoluten Alkohols (= Probe A) und der andere mit vier Teilen Alkohol/Essigsäure (9:1) (= Probe B) versetzt. Anschliessend wurden die Extinktionen bei den Absorptionsmaxima der beiden Alkaloide gemessen: für Sanguinarin bei 474 nm und für Coptisin bei 458 nm. In den Proben A zeigt Sanguinarin keine Absorption im sichtbaren Licht, wohl aber in den Proben B. Coptisin dagegen weist in beiden Fällen eine gleich hohe Absorption auf. In einem Ansatz, der zugleich Sanguinarin und Coptisin enthält, lassen sich demnach beide Alkaloide recht einfach photometrisch bestimmen: das Coptisin direkt anhand der Extinktion in der Probe A und das Sanguinarin aus der Extinktionsdifferenz zwischen den Proben A und B.

Der Gehalt an Sanguinarin und Coptisin liess sich auch rechnerisch ermitteln: In den Proben B wurde die Extinktion noch zusätzlich bei 400 nm gemessen. Mit Hilfe von Absorptionsspektren reiner Lösungen der beiden Alkaloide wurden die folgenden Extinktionsquotienten berechnet:

$$\begin{array}{lll} \text{Sanguinarin:} & E_{400}/E_{474} = 0.8 & E_{458}/E_{474} = 0.9 & E_{400}/E_{458} = 0.9 \\ \text{Coptisin:} & E_{400}/E_{474} = 0.29 = E_{400}/E_{458} & E_{458}/E_{474} = 1 \end{array}$$

Wird die Extinktion bei 474 nm von Sanguinarin mit x, jene von Coptisin mit y bezeichnet, so lassen sich für jeden Ansatz die folgenden Gleichungen aufstellen:

$$\begin{array}{ll} 1. & x + y = E_{474} \\ 2. & 0.8 x + 0.29 y = E_{400} \\ 3. & 0.9 x + y = E_{458} \end{array}$$

Da die berechneten Werte mit den durch Vergleichsmessung der Proben A und B ermittelten gut übereinstimmen, wurde die Berechnungsmethode vor allem bei Ansätzen mit geringen Extinktionen angewendet (Keine Verdünnung notwendig wie bei den Vergleichsmessungen; nur Zugabe von wenig Essigsäure erforderlich).

2.1.8. Nachweis und quantitative Bestimmung von Chelidonsäure

Auf Kieselgel G DC-Platten wurde die Chelidonsäure mit dem Anthronreagens für Ketosen (Waldi 1962) sichtbar gemacht. Die Säure war zudem im kurzwelligen Ultraviolett (253.7 nm) als dunkler Fleck erkennbar, falls die Platten mit Fluoreszenzfarbstoff benützt wurden. Die Absorption der Chelidonsäure im UV wurde auch zur quantitativen Bestimmung herangezogen: die entsprechenden Flecken auf den DC-Platten wurden mit dest. Wasser eluiert. Dann wurde die Extinktion bei 268 nm, dem Absorptionsmaximum der Chelidonsäure (Riegel und Reinhard 1926), gemessen.

Als Referenz ist Chelidonsäure-Monohydrat 99% (EGA-Chemie KG, Steinheim) verwendet worden.

2.1.9. Enzymologie

a) Saure Phosphatase

Substrat: 4-Nitrophenol-phosphat (1mg/ml)
Puffer: 0.05–0.2 m Citrat-NaOH; pH 5.0
Inkubation: 120 Minuten bei 37°C
Aktivitätseinheit: $\Delta E_{400}/60$ min
(Linhardt und Walter 1963)

b) Phenoloxydase

Die Substrate sind in Tabelle 5 angegeben; als Puffer wurde 0.1 m Tris-Citrat (pH 7.0) gebraucht. Die Inkubation erfolgte bei 25°C. Für quantitative Bestimmungen wurden die Extinktionsänderungen der Ansätze direkt mit einem Beckman DB Spektrophotometer mit Schreiber aufgezeichnet. Die Aktivität wurde durch die Steigung der Kurven zu Beginn der Inkubation ausgedrückt ($\Delta E/\text{min}$). Bei qualitativen Untersuchungen wurde die Methode von Drawert und Gebbing (1963) benützt: Auf einem runden Filterpapier wurden bis fünf verschiedene Substrate am Rande aufgetupft (je 2 bis 3 Tropfen; Konzentration bis 10% w/v) und die Enzymprobe in der Mitte aufgetragen. Nach wenigen Minuten liessen sich in den Berührungszonen von Enzymprobe und Substraten Reaktionsfronten beobachten.

Tabelle 5:

Verwendete Substrate zur Bestimmung der Phenoloxydase-Aktivitäten

Substrat	Konzentration	ΔE gemessen bei nm
d,l Dihydroxyphenylalanin	0,004–0,01 m	470
Dopamin	0,004–0,01 m	470
Brenzcatechin	0,004–0,01 m	400 oder 520
Resorcin	0,01 –0,1 m	390
Hydrochinon	0,01 –0,1 m	480
Catechin/Epicatechin	1,2 –3 mg/ml	430
Chlorogensäure	0,005–0,01 m	460 und 720
Gallus-Säure	0,01 m	440
Phenol	0,02 –0,1 m	428
m-Cresol	0,01 –0,1 m	460
Guajacol	0,01 –0,1 m	436
Chinhydron	0,01 –0,1 m	540
p-Phenylendiamin	0,001–0,01 m	520
Tyrosin	gesättigte Lösung	468

c) *Peroxidase*

Die Bestimmung nach Pütter (1970) wurde etwas modifiziert; die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

H-Donator: p-Phenylendiamin ($1,5 \times 10^{-3}$ m)
Substrat: H_2O_2 (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Inkubationsgemisch)
Puffer: Phospat (0,1 m; pH 7,0)
Inkubation bei 25°C ; Akt. Einheit: $\Delta\text{E}_{520}/\text{min}$
Statt p-Phenylendiamin wurde auch Guajacol benützt ($\Delta\text{E}_{436}/\text{min}$).

d) *Katalase*

Die Bestimmung wurde nach der Methode von Aebi (1970) durchgeführt.

2.1.10. *Dichtegradienten-Zentrifugation*

Proben von frisch gewonnenem Milchsaft (je 9 ml) wurden auf lineare Urografin-Gradienten (Methylglucosamin-Salz der Urografinsäure; Schering AG, Berlin) geladen und in einer Spinco Ultrazentrifuge mit einem Rotor SW 25 zunächst bei $2000 \times g$, anschliessend bei $60'000 \times g$ zentrifugiert. Die Zentrifugationszeiten betrugen 15 Minuten bzw. 6 Stunden. Der Gradient reichte von 0% Urografin/0.45 m Sorbit bis 50% Urografin/0 m Sorbit; sein Volumen betrug 24 ml.

Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten mit einem LKB-Fraktionensammler zerlegt.

2.2. Ergebnisse

2.2.1. *Verteilung einiger Stoffe im Milchsaft*

a) *Alkaloide, Chelidonsäure und phenolische Verbindungen*

Von einer Milchsaft-Suspension wurden die Vakuolen abzentrifugiert und gereinigt. Anschliessend wurde der Gehalt an Alkaloiden, Chelidonsäure und phenolischen Verbindungen in der Vakuolenfraktion und im restlichen Milchsaft bestimmt. Hierzu wurden Aliquote beider Fraktionen mittels DC oder Dünnschicht-Elektrophorese in ihre Bestandteile zerlegt. Die Auftrennungen mit Hilfe von DC sind dabei stets besser gewesen als jene mittels Dünnschicht-Elektrophorese, weshalb die meisten Bestimmungen mit Hilfe von DC ausgeführt worden sind.

Die Ergebnisse (s. Tab. 6) zeigen, dass mit Ausnahme des Dihydrocoptisins alle aufgeführten Alkaloide in den Vakuolen in deutlich grösseren Mengen vorhanden sind als im gesamten übrigen Milchsaft. Dihydrocoptisin hingegen kommt wie die Chelidonsäure etwa zu gleichen Teilen in den beiden Fraktionen vor. Werden statt der vorhandenen Mengen die Konzentrationen in den beiden Fraktionen miteinander verglichen, so zeigt sich eine augenfällige Anhäufung in den Vakuolen: alle aufgeführten Alkaloide, auch Dihydrocoptisin, kommen in den Vakuolen in wesentlich höheren Konzentrationen vor als im restlichen Milchsaft. Dasselbe gilt auch für die Chelidonsäure und die phenolischen Verbindungen (Tab. 7). Bei den letzteren dürfte es sich zur Hauptsache um ein Flavonol handeln (vergl. Kwasniewski 1958).

Tabelle 6:

Gehalt der Vakuolenfraktion und des restlichen Milchsafte an Alkaloiden und Chelidonsäure. Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen, die mit den Laufmitteln IV (Alkaloide) und VII (Chelidonsäure) angefertigt worden sind.

Verbindung	Vollst. Milchsafte	Vakuolen-fraktion (A)	Restl. Milchsafte (B)	A/B
Sanguinarin	332 µg	365 µg	64 µg	5,71
Chelerythrin	174	139	21	6,62
Berberin	218	128	77	1,66
Coptisin	582	432	99	4,36
Dihydrocoptisin *	1100	704	611	1,15
Chelidonsäure	2380	1340	1204	1,11

* Dihydrocoptisin ist zur Auswertung durch 45-minütiges Lagern der Chromatogramme bei 90 bis 110°C in Coptisin übergeführt worden.

Tabelle 7:

Verteilung einiger Stoffe in Milchsafteproben aus älteren und jüngeren Stengelstücken; Vergleich zwischen den Konzentrationen in den Vakuolen und im übrigen Milchsafte. Die Ergebnisse sind aus Dünnschicht-Chromatogrammen (Laufmittel IV für Alkaloide und VII für Chelidonsäure und phenolische Verbindungen) gewonnen worden.

Verbindung	Milchsafte aus älteren Stengelstücken			Milchsafte aus jungen Stengelstücken		
	Vakuolen (A)	Restl. Milchsafte (B)	A/B	Vakuolen (A)	Restl. Milchsafte (B)	A/B
Sanguinarin	0,1265 m	0,0065 m	19,5	0,0309 m	0,0029 m	10,7
Chelerythrin	0,0606 m	0,0044 m	13,8	0,0113 m	0,0014 m	8,1
Berberin	0,0352 m	0,0131 m	2,69	0,0282 m	0,0129 m	2,18
Coptisin	0,0253 m	0,0566 m	0,45	0,0160 m	0,0666 m	0,24
Dihydrocoptisin *	0,2545 m	0,0239 m	10,7	0,2560 m	0,0180 m	14,2
Chelidonsäure	0,4970 m	0,1596 m	3,11	0,4210 m	0,1567 m	2,69
Phenol. Verbindg. E _{287 nm} **	621	98	6,34	508	60	8,47

* Dihydrocoptisin ist zur Auswertung durch 45-minütiges Lagern der Chromatogramme bei 90 bis 110°C in Coptisin übergeführt worden.

** Die R_F-Werte sind verschieden: Vakuolenfraktion ca. 0,66; Restl. Milchsafte ca. 0,21.

Für Konzentrationsmessungen wurde eine bestimmte Menge Milchsafte mittels Masspipetten abgezapft, im 50- oder 100-fachen Volumen von Sorbitmedium (siehe 2.1.1.) aufgeschlämmt und anschliessend 30 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Die Sedimente wurden in einem kleinen Volumen von Sorbitmedium suspendiert, in enge, graduierte Zentrifugentuben gegeben und nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert. Dann wurde das Volumen der Sedimente bestimmt und diese hierauf in einem bestimmten Volumen Sorbitmedium aufgeschlämmt.

Wird Milchsafte aus jüngerem Stengelabschnitten (Internodien, die sich noch im Streckungswachstum befinden) mit solchem aus älteren, ausgewachsenen verglichen, so fällt die relativ grosse Übereinstimmung zwischen beiden auf. Es gilt dies vor allem bezüglich Verteilung und Konzentration an phenolischen Verbindungen, Chelidonsäure, Berberin und Dihydrocoptisin (Tab. 7). Meist ist der Gehalt in den Proben aus älteren Stengelstücken etwas höher. Grössere Unterschiede treten dagegen bei Sanguinarin und Chelerythrin auf; die Proben aus älteren Stengelabschnitten enthalten im Vergleich zu jenen aus jungen etwa vier bis fünfmal mehr Sanguinarin und Chelerythrin.

Die relativ hohen Werte für Coptisin in den Fraktionen „Restl. Milchsafte“ in Tabelle 7 sind wohl der teilweisen Oxydation des Dihydrocoptisins zuzuschreiben. Dieses Alkaloid ist in den erwähnten Fraktionen im Verhältnis zum Coptisin deutlich untervertreten (vergl. Tab. 6).

b) Enzyme

Einige hydrolytische Enzyme sind im Milchsafte analog wie Dihydrocoptisin und Chelidonsäure verteilt: die in der Vakuolenfraktion und im restlichen Milchsafte gemessenen Aktivitäten sind etwa gleich hoch, oft sogar etwas höher im restlichen Milchsafte, aber die spezifischen Aktivitäten (Aktivität/mg Protein) sind in den Vakuolen bedeutend grösser. Es gilt dies z.B. für die saure Protease, die saure Phosphatase und die RN-ase. Demgegenüber sind die Aktivitäten von Amylase und von Phenoloxydase fast ausschliesslich auf die Fraktion „Restlicher Milchsafte“ beschränkt (Matile et al. 1970). In Abbildung 5 ist die Verteilung der Aktivitäten von saurer Phosphatase und von Phenoloxydase in einem Urografin-Gradienten von Schöllkraut-Latex wiedergegeben. Es geht daraus hervor, dass ein Grossteil der Phenoloxydase-Aktivität und der nicht an die Vakuolen gebundenen Phosphatase-Aktivität mit Partikeln von geringer spezifischer Dichte ($1.03-1.16 \text{ g/cm}^3$) assoziiert, resp. löslich ist. Für die Phenoloxydase könnte eine Lokalisation in Plastiden in Frage kommen (Pujarniscle 1972).

Die Phenoloxydase-Aktivität umfasst ein breites Substratspektrum; es werden Dihydroxyphenylalanin (DOPA), Dopamin, Brenzcatechin, Chlorogensäure, Catechin/Epicatechin, Phenol und Tyrosin oxydiert, daneben auch Gallus-Säure, Hydrochinon, Resorcin, p-Phenylendiamin, Chinhydron, m-Cresol und Guajacol, wenn dem Inkubationsgemisch eine Spur von DOPA, Dopamin, Brenzcatechin, Chlorogensäure oder Catechin/Epicatechin beigegeben wird. Besonders leicht umgesetzt werden DOPA, Dopamin, auch Brenzcatechin sowie Catechin/Epicatechin. Die Phenoloxydase-Aktivität kann durch Natriumdiaethyldithiocarbamat ($2 \times 10^{-4} \text{ m}$), Kaliumcyanid ($2 \times 10^{-3} \text{ m}$) und Hydroxylamin ($2-3 \times 10^{-2} \text{ m}$) vollständig gehemmt werden, nicht aber mit EDTA. Die Hemmung mit Natriumdiaethyldithiocarbamat kann durch Zugabe von Kupferionen wieder teilweise rückgängig gemacht werden, im Maximum bis zu 25% der ursprünglichen Aktivität. Weitere Störfaktoren sind Reduktionsmittel wie L-Cystein und Mercapto-Aethanol, ferner die während der Enzymreaktion gebildeten Oxydationsprodukte. Wird eine Enzymprobe über längere Zeit in einer Umgebung, die Reaktionsprodukte der Phenoloxydase-Aktivität enthält,

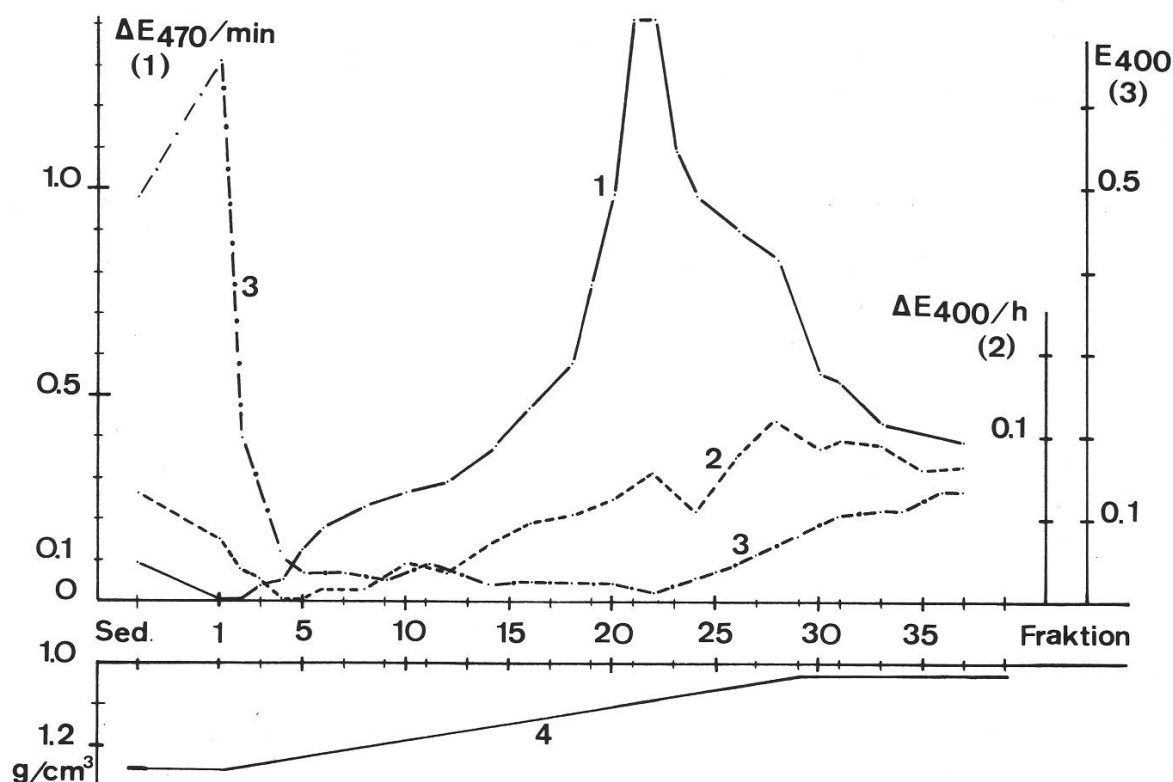


Abbildung 5:

Verteilung der Aktivitäten von saurer Phosphatase und von Phenoloxydase in einem Urografen-Gradienten von Schöllkraut-Milchsaft.

- 1 Phenoloxydase (Substrat: Dopamin 4×10^{-3} m in 0.05 m Triscitrat; pH 7.0); $\Delta E_{470}/\text{min}$
- 2 Saure Phosphatase (Substrat: 4-Nitrophenyl-phosphat 1 mg/ml in 0.05 m Citrat-NaOH; pH 5.0); $\Delta E_{400}/\text{h}$
- 3 Extinktion der Alkaloide bei 400 nm
- 4 Profil der Dichte im Urografen-Gradienten

aufbewahrt, so wird sie irreversibel inaktiviert. Dieser Befund steht im Einklang mit jenen von Anderson (1968) und Loomis und Battaile (1966).

Parallel zur Phenoloxydase-Aktivität konnte auch eine Peroxydaseähnliche Aktivität nachgewiesen werden. Diese ist allerdings ganz schwach gewesen und konnte mit den gleichen Verbindungen gehemmt werden wie die Phenoloxydase-Aktivität.

Es ist nicht gelungen, Katalase-Aktivität im Milchsaft nachzuweisen.

2.2.2. Zur Anhäufung von Alkaloiden in den Vakuolen

Ausgehend von den von Matile et al. (1970) beschriebenen Versuchen zur Aufnahme von Sanguinarin durch die Vakuolen wurde zunächst der gegen Sanguinarin ausgetauschte Stoff identifiziert. Folgende Kriterien weisen darauf hin, dass es sich um Dihydrocoptisin handelt:

Zugabe von Sanguinarin zu einer Suspension von Vakuolen und anschliessende Zentrifugation ergibt eine Verstärkung der Dihydrocoptisinbande im Überstand und eine Verminderung derselben im aus Vakuolen bestehenden Sediment, wenn die beiden Fraktionen Überstand und Sediment mittels DC analysiert werden.

Nach Oxydation durch Luftsauerstoff fehlt die Dihydrocoptisinbande sowohl im Überstand wie im Sediment; statt dessen ist nun die Coptisinbande stärker im Überstand bzw. schwächer im Sediment.

Die Zunahme der Extinktion bei 400 nm im Überstand nach Sanguinarinzugabe weist ebenfalls auf Dihydrocoptisin hin. Neben Chelerythrin ist dieses Alkaloid nämlich die einzige Verbindung, die ein Absorptionsmaximum um 400 nm aufweist und zudem in grösseren Mengen vorhanden ist.

Neben Dihydrocoptisin dürften andere Verbindungen nur in geringem Umfange durch Sanguinarin verdrängt werden. Auf jeden Fall zeigen die Chromatogramme von Ansätzen mit und ohne Sanguinarinzugabe ausser den Banden von Dihydrocoptisin und Sanguinarin weder im Sediment noch im Überstand signifikante Unterschiede hinsichtlich Fleckengrösse, Farb- und Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellsaftbestandteile.

Anstelle von Sanguinarin wurden nun den isolierten Vakuolen die Alkaloide Chelerythrin, Berberin oder Coptisin zugesetzt. In jedem Falle wurde geprüft, ob das zugegebene Alkaloid von den Vakuolen aufgenommen wird, resp. ob es imstande ist, ein anderes zu verdrängen. Diese Fragen wurden hauptsächlich mittels DC und anschliessender quantitativer Bestimmung des Alkaloidgehaltes in den einzelnen Banden abgeklärt. Direkte photometrische Verfolgung der Alkaloidaufnahme durch die Vakuolen hat nur beim Sanguinarin befriedigende Ergebnisse gezeitigt.

Gibt man einer Suspension von Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes Chelerythrin zu, so lassen sich entsprechende Vorgänge wie bei Sanguinarin beobachten: In beiden Fällen wird das verabreichte Alkaloid in den Vakuolen angehäuft und Dihydrocoptisin nach aussen abgegeben (Tab. 8). Bei Coptisin und Berberin hingegen ist keine Aufnahme in die Vakuolen feststellbar; nach Zentrifugation der Organelle verbleibt jeweils praktisch die gesamte Menge des zugesetzten Alkaloids im Überstand zurück. Tabelle 8 und Abb. 6 stellen eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse dar.

Die Werte für Sanguinarin sind allerdings durchwegs zu tief, weil bei der Behandlung der Ansätze vor DC (Lyophilisation, Ausfällung des Sorbits, etc; siehe 2.1.6.) stets 40 bis 50% des Sanguinarins verändert wurden. Bei den übrigen Alkaloiden dürfte der Verlust zwischen 10 und 15% betragen.

Aus arbeitstechnischen Gründen ist bei länger dauernden Versuchsserien, wie sie der Tabelle 8 zugrunde liegen, Laufmittel I verwendet worden. Dies hatte zur Folge, dass Coptisin und Dihydrocoptisin in einer einzigen Bande zusammenliefen (wegen der Oxydation des Dihydrocoptisins zu Coptisin, vergl. Abschnitt 1.2.2.). Die Wahl von Laufmittel I erwies sich jedoch als sinnvoll, weil bei längeren Versuchsserien ohnehin stets ein Teil des Dihydrocoptisins in Coptisin übergang, was die Reproduzierbarkeit quantitativer Bestimmungen dieser beiden Alkaloide stark beeinträchtigte. Mit Laufmittel I dagegen wurden reproduzierbare Ergebnisse erzielt. Unterschiede im Gehalt entsprechender Coptisin/Dihydrocoptisin-Banden zwischen Ansätzen mit und ohne Alkaloidzugabe dürfen indessen aus den oben angeführten Gründen den Veränderungen des Gehaltes an Dihydrocoptisin zugeschrieben werden.

Werden den Vakuolen Gemische von Alkaloiden verabreicht, so ist eine signifikante Aufnahme nur im Falle von Sanguinarin und Chelerythrin zu verzeichnen. Diese beiden Alkaloide scheinen demnach eine besonders grosse Affinität zum Vakuoleninhalt zu besitzen. Sie vermögen offenbar das Coptisin beziehungsweise Dihydrocoptisin aus den Vakuolen zu verdrängen. Umgekehrt ist die Affinität von Berberin zum Zellsaft so gering, dass es weder Dihydrocoptisin noch Sanguinarin oder Chelerythrin daraus zu verdrängen vermag.

Tabelle 8:

Zur Aufnahme von Alkaloiden durch isolierte Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes

Zugegebenes Alkaloid	Zeitpunkt der Alkaloid-Zug.	Frakt.*	Sanguinarin E _{282 nm}	Chelerythrin E _{282 nm}	Berberin E _{265 nm}	Coptisin/ Dihydrocoptisin E _{265 nm}
Kein Alkaloid zugegeben		U	0.030	0.006	0.005	0.125
		S	0.120	0.098	0.102	0.750
Sanguinarin	vor Zentrifugation	U	0.047	0.013	0.026	0.423
		S	0.300	0.183	0.104	0.378
	nach Zentr. zu U	U	0.383	0.001	0.003	0.061
		S	0.116	0.124	0.119	0.720
Chelerythrin (a)	vor Zentrifugation	U	0.026	0.021	0.007	0.269
		S	0.102	0.321	0.105	0.545
	nach Zentr. zu U	U	0.038	0.382	0.001	0.074
		S	0.115	0.114	0.137	0.690
Chelerythrin (b)	vor Zentrifugation	U	0.031	0.098	0.037	0.578
		S	0.090	0.615	0.072	0.155
	nach Zentr. zu U	U	0.023	0.728	0.001	0.074
		S	0.085	0.098	0.095	0.675
Berberin	vor Zentrifugation	U	0.022	0.008	0.815	0.116
		S	0.080	0.112	0.128	0.740
	nach Zentr. zu U	U	0.011	0.006	0.865	0.075
		S	0.087	0.097	0.111	0.740
Coptisin	vor Zentrifugation	U	0.034	0.055	0.032	0.750
		S	0.129	0.155	0.123	0.730
	nach Zentr. zu U	U	0.047	0.037	0.046	0.745
		S	0.105	0.110	0.144	0.713

* Etwa 10 Minuten nach Alkaloidzugabe wurden die Proben zentrifugiert → Überstand (U) und Sediment (S).

Mengen an verabreichtem Alkaloid: Chelerythrin (a) 0,1 mg/3 ml Inkubationsgemisch, sonst überall 0,2 mg/3 ml Inkubationsgemisch.

Trübung der Vakuolensuspension im Inkubationsgemisch: E₆₅₀ = 1.63.

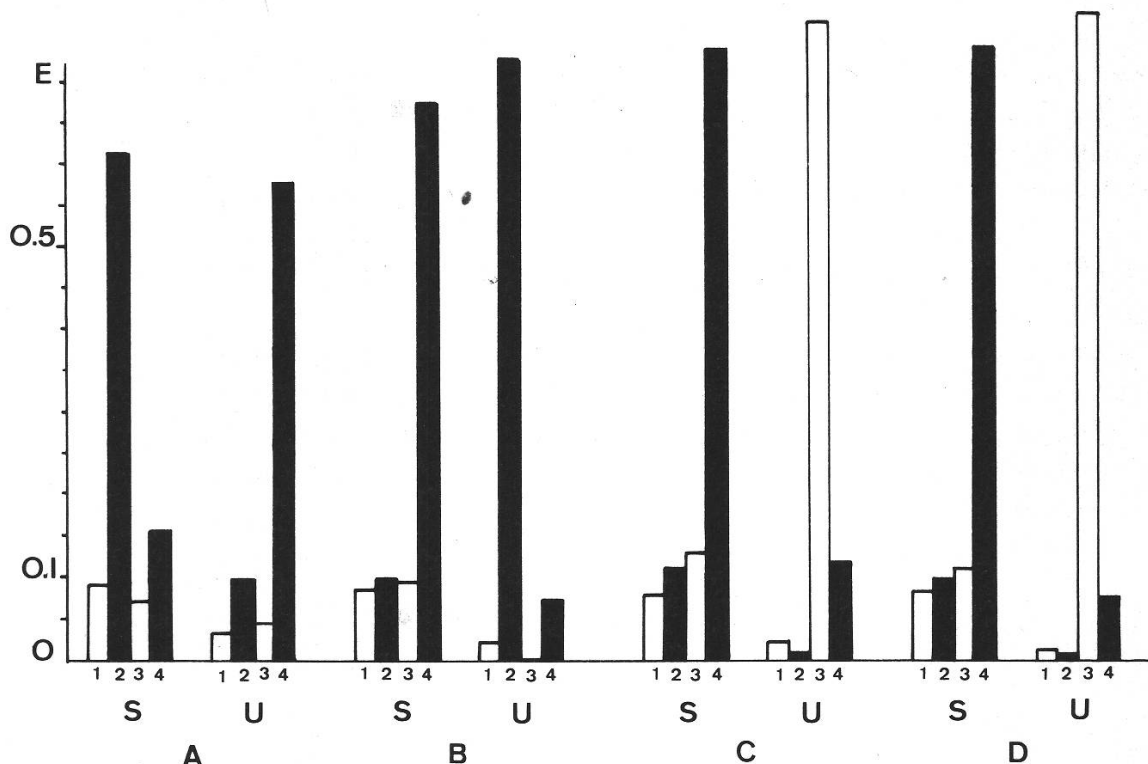


Abbildung 6:

Aufnahme bzw. Austausch von Alkaloiden durch isolierte Vakuolen aus dem Milchsafte des Schöllkrautes. Unterschiedliches Verhalten der Vakuolen gegenüber Chelerythrin und Berberin.

A Chelerythrin 10 Minuten vor Zentrifugation der Ansätze zugegeben (vergl. Tab. 8).

B Chelerythrin nach Zentrifugation der Ansätze zum Überstand gegeben.

C Berberin 10 Minuten vor Zentrifugation der Ansätze zugegeben.

D Berberin erst nach Zentrifugation der Ansätze zum Überstand gegeben.

S Sediment nach Zentrifugation der Ansätze, aus Vakuolen bestehend.

U Überstand nach Zentrifugation der Ansätze.

1 Sanguinarin ($E_{282 \text{ nm}}$),

2 Chelerythrin ($E_{282 \text{ nm}}$)

3 Berberin ($E_{265 \text{ nm}}$)

4 Coptisin/Dihydrocoptisin ($E_{265 \text{ nm}}$)

(Trübung der Vak. Susp. im Inkubationsgemisch: $E_{650} = 1.63$).

2.2.3. Zum Mechanismus der Alkaloid-Akkumulation in den Vakuolen

In einer früheren Arbeit ist festgehalten worden, dass der Durchtritt der Alkaloide durch den Tonoplasten höchst wahrscheinlich ohne Aufwand an metabolischer Energie erfolgt; es scheint sich um einen gewöhnlichen Diffusionsvorgang zu handeln (Matile et al. 1970). Das Akkumulationsvermögen der Vakuolen für Alkaloide dürfte demnach nicht auf spezifische Transportmechanismen am Tonoplasten zurückzuführen sein. Das Augenmerk ist in der Folge auf die Anwesenheit von negativen Ladungspartnern zu den positiv geladenen Alkaloiden in den Vakuolen gerichtet worden. Dabei fielen in Betracht: Polyphosphate, Polyuronsäuren, saure Proteine, phenolische Verbindungen oder organische Säuren.

Nachweisversuche für Polyphosphate und Polyuronsäuren sind negativ verlaufen; der Proteingehalt der Vakuolen ist ebenfalls recht gering (Matile et al. 1970). Hingegen sind in den Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes beachtliche Mengen von Chelidonsäure eingelagert und, in bescheidenerem Umfang, gerbstoffartige Verbindungen (vergl. Tab. 6 und 7). Die letzteren vermögen neben vielen anderen Stoffen auch Alkaloide auszufällen (Rompp 1966, Karrer 1963). In Modellversuchen ist geprüft worden, ob dies auch für die Schöllkraut-alkaloide zutrifft.

Alle verwendeten Alkaloide werden durch Tanninlösungen fast quantitativ ausgefällt. Die Niederschläge können durch Senken des pH wieder weitgehend in Lösung gebracht werden. Werden Gemische von Alkaloiden verabreicht, so ist keine Bevorzugung des einen oder anderen Alkaloids festzustellen, auch nicht,

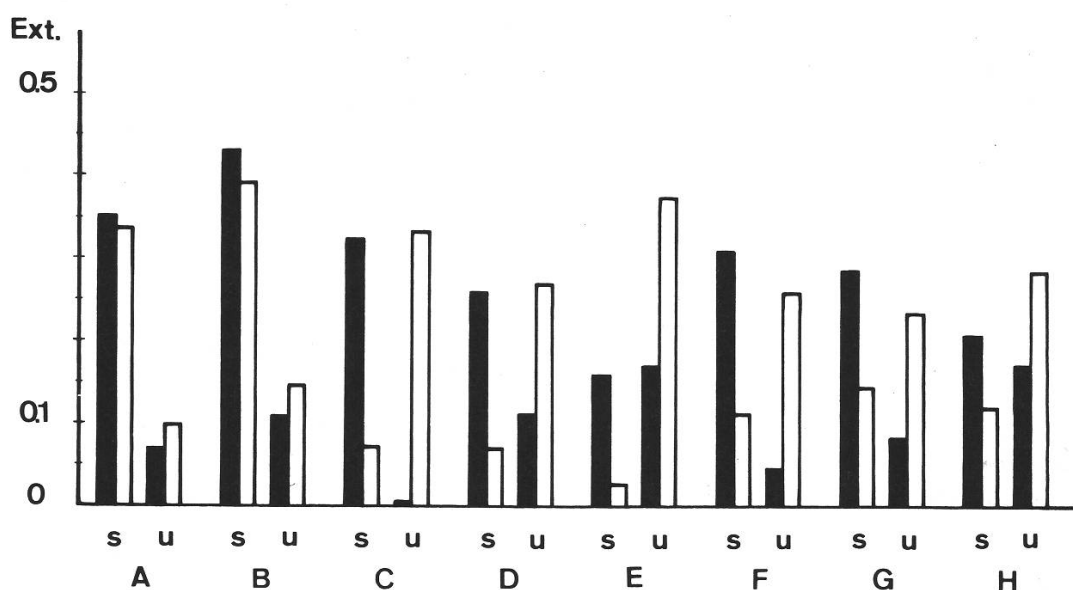


Abbildung 7:

Fällung von Sanguinarin und Coptisin in Gegenwart von Tannin, Gallus-Säure, Kaffee-Säure und Chelidonsäure.

In allen Ansätzen ist ein Gemisch von Sanguinarin/Coptisin (1:1) verwendet worden.

■ Sanguinarin ($E_{474 \text{ nm}}$)

□ Coptisin ($E_{458 \text{ nm}}$)

S Sediment

U Überstand nach Zentrifugation der Ansätze

Ansätze: (In Klammern sind die Endkonzentrationen angegeben)

A Tannin (2.5 mg/ml); Alkaloide in geringem Überschuss
(Konz. der Alkaloide je 0.32 mg/ml)

B Tannin (2.5 mg/ml); Alkaloide (je 0.4 mg/ml) in etwas grösserem Überschuss

C Gallus-Säure (0.004 m)

D Kaffee-Säure (0.0067 m)

E Chelidonsäure (0.0067 m)

F Gallus-Säure (0.002 m) und Tannin (0.13 mg/ml)

G Kaffee-Säure (0.0034 m) und Tannin (0.13 mg/ml)

H Chelidonsäure (0.0034 m) und Tannin (0.13 mg/ml)

In den Ansätzen C bis H betrug der Alkaloidgehalt stets total 0.267 mg/ml.

wenn die Alkaloide im Überschuss zugegeben werden. In Abbildung 7 sind die Verhältnisse für ein Gemisch von Sanguinarin und Coptisin wiedergegeben (Abb. 7, A und B). Mit Catechin/Epicatechin und dem Flavonoid Quercetin sind analoge Ergebnisse erzielt worden wie mit Tannin. Gerbstoffartige, phenolische Verbindungen fällen allem Anschein nach auch Schöllkrautalkaloide aus. Da dies aber nicht selektiv geschieht, dürften sie nur zum Teil für die Alkaloidspeicherung in den Vakuolen verantwortlich sein.

Gewisse phenolische Säuren, wie die Kaffee-Säure und die Gallus-Säure vermögen dagegen Alkaloide selektiv auszufällen. Dasselbe gilt auch für die Chelidonsäure, wenn auch in deutlich geringerem Masse. Mit allen drei erwähnten Säuren werden Sanguinarin und Chelerythrin ausgefällt, Berberin und Coptisin hingegen nicht oder bedeutend schlechter. Die Niederschläge gehen beim Ansäuern wieder grösstenteils in Lösung. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse von Versuchen zur Ausfällung von Sanguinarin und Coptisin mit den genannten Säuren und mit Tannin festgehalten.

Von den drei aufgeführten Säuren ist nur die Chelidonsäure im Milchsaft des Schöllkrautes nachweisbar. Sie kommt aber dort in so grosser Konzentration in den Vakuolen vor (siehe Tab. 7), dass sie als selektiv bindendes Prinzip durchaus in Betracht gezogen werden muss.

Ansätze, die im Vergleich zur Alkaloid-Menge einen grossen Überschuss an Chelidonsäure enthalten, zeigen indessen bei Zugabe von Sanguinarin oder Chelerythrin nur schwache Niederschlagsbildungen. Es entstehen jedoch Kolloide, was anhand des deutlich feststellbaren Tyndalleffekts nachgewiesen werden kann. Keine oder nur sehr schwache Kolloidbildungen sind nach Zugabe von Coptisin oder Berberin zu beobachten.

Tabelle 9:

Zur Aufnahme von Chelidonsäure durch die Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes
(In allen Ansätzen ist der Chelidonsäure-Gehalt in mg angegeben).

zugegeb. Chelidonsäure	Zusätze	1			2			3		
		S	U	% CheSre in S	S	U	% CheSre in S	S	U	% CheSre in S
mg	—	0,124	0,170	42,2	0,161	0,153	51,3	0,099	0,065	60,4
,5 mg	—	0,146	0,712	17,0	0,198	0,623	24,1	0,117	0,548	17,6
,0 mg	—	0,161	1,220	11,7	0,212	1,157	15,5	0,143	1,118	11,3
,0 mg	—	0,177	2,068	7,9	0,220	1,913	10,3	0,170	1,852	8,4
,5 mg	10 ⁻³ m ATP*	0,137	0,625	18,0	0,196	0,610	24,3	0,142	0,686	17,1

Die Ansätze wurden 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurden sie 15 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert → Überstand (U) und Sediment (S), welches aus Vakuolen bestand.

- 1 Suspension von Milchsaft aus älteren Stengelstücken
- 2 Vakuolenfraktion aus 1
- 3 Vakuolenfraktion aus Milchsaft von jüngeren Stengelstücken

* Ansatz ohne Mg²⁺, da sonst Gefahr zur Bildung von Aggregaten unter den Vakuolen bestand. Im Zellsaft gibt es ohnehin mit Chelidonsäure versalzte Mg²⁺-Ionen (Wehner 1911).

Andere, im Milchsaft vorhandene Säuren, wie Bernsteinsäure und Citronensäure (Wehner 1911) haben mit keinem Alkaloid zu Ausfällungen oder Kolloiden geführt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Fähigkeit der Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes, Alkaloide zu speichern, wenigstens zum Teil ihrem Gehalt an gerbstoffartigen, phenolischen Verbindungen zugeschrieben werden dürfte, während ihre Eigenschaft, einzelne Alkaloide, wie Sanguinarin und Chelerythrin, selektiv anzureichern auf die in grosser Menge in ihnen vorhandene Chelidonsäure zurückzuführen ist. Ein beachtlicher Teil der Alkaloide, zumindest im Falle des Dihydrocoptisins, dürfte ohnehin mit Chelidonsäure versalzt und damit gegen Sanguinarin oder Chelerythrin austauschbar sein.

Unklar aber bleibt, wie beispielsweise die Chelidonsäure, d.h. ein für die Alkaloid-Akkumulation offenbar mitverantwortliches Prinzip, in die Vakuolen gelangt. Versuche, die Aufnahme von Chelidonsäure durch Zugabe von energiereichen Verbindungen zu stimulieren, sind ergebnislos verlaufen. Eine schwache Aufnahme findet nur bei relativ grossen Aussenkonzentrationen von Chelidonsäure statt (Tab. 9).

Die Versuche zur Aufnahme von Chelidonsäure durch die Vakuolen sind analog jenen zur Aufnahme von Alkaloiden durchgeführt worden: Suspensionen von Vakuolen wurden mit Chelidonsäure versetzt und nach einiger Zeit zentrifugiert. Dann wurden die Sedimente in 80% Äthanol aufgenommen und Cystein oder Mercapto-Äthanol bis zu einer Endkonzentration von 10^{-2} m zugegeben. Die Ansätze wurden mittels DC aufgetrennt (Laufmittel VIII) und die Chelidonsäure-Flecken (erkenntlich an ihrer Absorption bei 253.7 nm und ihrem R_f -Wert von 0.19) mit destilliertem Wasser extrahiert. Hierauf wurde die Extinktion bei 268 nm gemessen.

2.3. Diskussion

2.3.1. Zur Alkaloid-Akkumulation im Latex des Schöllkrautes

In früheren Arbeiten ist die lysosomale Funktion der Vakuolen im Milchsaft des Schöllkrautes hervorgehoben worden, ebenso deren Vermögen, Alkaloide in ihrem Innern anzureichern (Jans 1969, Matile et al. 1970). Auch Neumann et al. (1972) beschreiben die Vakuolen im Schöllkraut-Latex als Akkumulationsorganelle für Alkaloide. In den Milchröhren finden sie allerdings auch Alkaloide entlang der Innenseite der Zellwände angehäuft. Werden Stengel oder Blätter des Schöllkrautes mit Protopin T gefüttert, so wird dieses Alkaloid nach Neumann et al. (1972) in die Milchröhren transportiert; einige Stunden nach der Fütterung enthalten nur noch die Milchsaftgefässe und die Verstärkungsleisten der Xylemgefässe das verabreichte Protopin T. Aus dem Versuch darf geschlossen werden, dass Alkaloide aus dem benachbarten, parenchymatischen Gewebe in die Milchröhren transportiert werden können. Die Anhäufung von Alkaloiden im Latex ist nach Vágújfalvi (1971) charakteristisch für die Milchgefässe enthaltenden Papaveraceen; sie stellt aber unter den Milchsaft führenden Pflanzenfamilien eher die Ausnahme dar.

Der von Neumann et al. (1972) beobachtete Alkaloidtransport in die Milchröhren des Schöllkrautes lässt die Möglichkeit zu, dass Alkaloide sowohl in den Milchröhren als auch im übrigen Gewebe gebildet werden können. Die Verhältnisse beim Schöllkraut würden somit jenen bei Papaver gleichen, wo nach Fairbairn et al. (1968) noch im ausgeflossenen Milchsafte Synthese von Alkaloiden, z.B. Morphin, stattfindet und wo Sárkány et al. (1970) Alkaloidsynthese in meristematischen Geweben (also nicht in Milchröhren) nachgewiesen haben.

2.3.2. Zum Mechanismus der Alkaloidanhäufung in den Vakuolen

Die Vakuolen des Schöllkraut-Milchsafte (vor allem jene aus älteren Stengelstücken) enthalten recht hohe Konzentrationen an Alkaloiden und Chelidonsäure (s. Tab. 7). Sie vermögen diese Stoffe auch nach Isolation mehrere Stunden lang ohne messbaren Aufwand an metabolischer Energie aufzubewahren. Es darf daher auf die Bildung von Komplexen zwischen den Alkaloiden und Inhaltsstoffen des Zellsafte geschlossen werden, wobei der Tonoplast in bezug auf die Komplexe impermeabel ist. Das Gleichgewicht dürfte dabei auf der Seite der Komplexe liegen, am ausgeprägtesten im Falle von Sanguinarin und Chelerythrin, weil beide Alkaloide, wenn sie frei in Lösung sind, von isolierten Vakuolen aufgenommen werden. Die beiden Alkaloide vermögen überdies Dihydrocoptisin aus dem Zellsafte zu verdrängen. Es scheint sich bei diesem Vorgang um einen Ionenaustausch zu handeln: Sanguinarin und Chelerythrin werden anstelle von Dihydrocoptisin und eventuell auch von Metallkationen in den Zellsafte aufgenommen, und das sich einspielende Gleichgewicht kann als ein Donnan-Gleichgewicht bezeichnet werden.

Die Voraussetzungen zur Bildung von Komplexen zwischen Alkaloiden, Chelidonsäure und phenolischen Verbindungen sind aufgrund der in 2.2.3. aufgeführten Versuchsergebnissen durchaus gegeben, vor allem für die beiden Alkaloide Sanguinarin und Chelerythrin. Möglicherweise stellen die in der Elektronenmikroskopie zu beobachtenden osmiophilen Präzipitate in den Vakuolen von Milchröhren, hauptsächlich in älteren Stengelstücken (Matile et al. 1970; Neumann et al. 1972), derartige Komplexe dar. Jedenfalls vermögen die Alkaloide, die Chelidonsäure und die phenolischen Verbindungen aufgrund ihrer Doppelbindungen mit Osmiumtetroxyd zu reagieren.

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, ist das Verhältnis der Konzentrationen von Chelidonsäure und Alkaloiden in Milchsafte aus jungen Stengelstücken zugunsten der Chelidonsäure verschoben. Es erweckt dies den Verdacht, dass sich die Milchröhren gleichsam auf die Aufnahme der Alkaloide vorbereiten, indem zuerst Chelidonsäure in grösserem Umfange hergestellt wird. Als Ladungspartner zur anfänglich überschüssigen Chelidonsäure kommen Metallkationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} in Frage, ferner Ammoniumionen. Alle drei Kationen sind schon von Wehner (1911) in grösserem Umfange im Milchsafte des Schöllkrautes nachgewiesen worden.

Es ist kaum anzunehmen, dass Dihydrocoptisin *in situ* durch Sanguinarin oder Chelerythrin in grösserem Ausmasse verdrängt wird. Es ist eher an eine zusätzliche Produktion von Chelidonsäure zu denken, um einen eventuellen

Alkaloidüberschuss auszugleichen. Bei mechanischen Schädigungen (z.B. Verletzungen durch Knicken oder Quetschen von Pflanzenteilen) dürfte es hingegen kurzfristig zur Verdrängung von Dihydrocoptisin aus den Vakuolen kommen, wenn durch die Schädigung Vakuolen platzen, Sanguinarin und Chelerythrin in grösserem Umfange frei werden und nun in die noch intakten Organelle aufgenommen werden.

2.3.3. Phenolische Verbindungen

Auffällig ist, wie unterschiedlich sich die phenolische Komponente in der Vakuolenfraktion und im restlichen Milchsafte bei Dünnschichtchromatographie verhält: Ihr R_f -Wert beträgt in der Vakuolenfraktion 0.66 und im restlichen Milchsafte 0.21 (siehe Tab. 7). Hingegen reagieren beide mit denselben Sprühreagenzien und ergeben dabei die gleichen Farbqualitäten. Da die phenolischen Verbindungen zur Hauptsache in den Vakuolen lokalisiert sind, könnte es sich bei jenen im restlichen Milchsafte um Vorstufen handeln, die später ebenfalls in die Vakuolen transportiert werden. Gleich wahrscheinlich ist jedoch die Annahme, dass es sich um einen Artefakt handelt, weil es sich um phenolische Verbindungen handeln könnte, die beim Bersten von Vakuolen während der Milchsaftegewinnung frei geworden sind und sich mit anderen Latexbestandteilen, insbesondere mit Proteinen, verbunden haben.

Sollte dies tatsächlich der Fall sein, würde das Verhältnis des Gehaltes an phenolischen Komponenten in den beiden Fraktionen „restlicher Milchsafte“ und „Vakuolenfraktion“ ein Mass für den Prozentsatz an intakt gebliebenen Vakuolen darstellen.

2.3.4. Zur Verteilung der Phenoloxydase-Aktivität

Die Phenoloxydase-Aktivität im Schöllkraut-Milchsafte scheint entweder löslich oder mit Partikeln von geringer spezifischer Dichte assoziiert zu sein, während praktisch keine Aktivität in der Vakuolenfraktion nachgewiesen werden kann. (s. Abb. 5). Die Phenoloxydase-Aktivität im Schöllkraut-Latex scheint somit ganz anders verteilt zu sein als in jenem von *Papaver somniferum* L., wo Roberts (1971) den weitaus grössten Teil der Aktivität mit Vesikeln verbunden vorfand, die bei 1000 g sedimentierten. Diese Vesikeln entsprechen in ihren physikalischen Eigenschaften bei Zentrifugation und in ihrer Morphologie sonst etwa den Vakuolen des Schöllkraut-Milchsafte und den Lutoiden, die Pujarniscle (1969) im Latex von *Hevea brasiliensis* beschrieben hat.

Beim Schöllkraut lässt sich die Verteilung von Phenoloxydase und ihrem Substrat in verschiedenen Kompartimenten im Latex mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation zeigen. Bei *Papaver*, wo beide in der gleichen Fraktion zusammen auftreten, muss angenommen werden, dass das Enzym auf der Aussenseite der Vesikel ist, die phenolische Verbindungen enthalten, oder aber, dass die Fraktion ein Gemisch verschiedener Vesikeln darstellt, die entweder phenolische Verbindungen oder aber Enzyme, unter anderen auch Phenoloxydase aufweisen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Phenoloxydasen mit

den phenolischen Verbindungen, die durch Platzen einiger Vakuolen bei Gewinnung des Milchsafte frei geworden sind, reagiert haben und nun als Aggregate mit den Organellen der 1000 g Fraktion sedimentieren. Diese Möglichkeit ist nicht ganz auszuschliessen, da Roberts (1971) nirgends die Verwendung von Schutzmitteln gegen unerwünschte Phenoloxydase-Aktivitäten erwähnt. Aggregationen von Enzymen, besonders von Phenoloxydase mit phenolischen Verbindungen entstehen aber ohne Schutzmittel (Thiole, Polyvinylpyrrolidon u.a.) recht bald (Anderson 1968). Roberts (1971) hat ihr Ausgangsmaterial mittels fraktionierter Zentrifugation erhalten. Vielleicht würde eine Dichtegradienten-Zentrifugation neues Licht auf die angetönten Fragen werfen. Insbesondere könnte Auskunft über die Einheitlichkeit der 1000 g Fraktion gewonnen werden.

3. Zur Alkaloidwirkung

Wie eingangs erwähnt, lysieren die Vakuolen des Schöllkraut-Milchsafte in einem Sanguinarin enthaltenden Medium, falls das Alkaloid aus irgend einem Grunde dauernd im Medium anwesend ist. Entsprechende Bedingungen liegen beispielsweise vor, falls im Medium mehr Sanguinarin vorhanden ist, als die Vakuolen aufzunehmen vermögen. Die Lyse der Vakuolen dürfte dabei kaum auf osmotische Übersättigung in ihnen zurückzuführen sein; denn ihre Kapazität für Sanguinarin bleibt über einen Konzentrationsbereich von 0.3 bis 0.9 m Sorbit im Medium praktisch konstant (Matile et al. 1970).

Neben Sanguinarin wurden isolierten Vakuolen auch Chelerythrin, Berberin und Coptisin zugegeben. In allen Fällen wurde die Wirkung der Alkaloide auf die Stabilität der Vakuolen untersucht.

Im weitem wurde geprüft, ob die Alkaloide ähnliche Wirkungen auf Membranen anderer Organismen zeigen, wie auf den Tonoplasten des Schöllkraut-Latex. Diese Untersuchungen sind fast ausschliesslich mit Sphäroplasten und Vakuolen von Bäckerhefe durchgeführt worden.

3.1. Material und Methoden

3.1.1. *Milchsaft*

Milchsaft aus Stengeln und Blättern des Schöllkrautes wurde nach dem unter 2.1.1. beschriebenen Verfahren gewonnen und daraus Vakuolen nach der in 2.1.2. angegebenen Methode isoliert.

3.1.2. *Hefen*

Bäckerhefe (Stamm BG H 1022) wurde in einem synthetischen Medium, welches 5% Glucose (in einigen Fällen nur 2%), Mineralsalze und Vitamine enthielt, kultiviert. Die Zellpopulationen wurden in Schüttelkultur bis zum Ende der ersten logarithmischen Wachstums-

phase (vergl. Wiemken 1969) wachsen gelassen. Dann wurden sie mit einem gleich grossen Volumenteil frischen Kulturmediums versetzt und nochmals für zwei Stunden inkubiert. Danach wurden die Hefezellen geerntet und zweimal mit destilliertem, kaltem Wasser gewaschen.

3.1.3. Herstellung von Sphäroplasten

Die gewaschenen Hefezellen wurden zunächst 30 Minuten mit 0.1 m Cysteamin in 0.5 m Sorbit, 0.01 m Citrat-NaOH (pH 6.0) behandelt (5 ml/g Nassgewicht). Dann wurden sie mit 2 ml Helicasemedium pro Gramm Nassgewicht versetzt (10–15 mg Helicase/ml, 0.6 m Sorbit, 0.01 m Citrat-NaOH; pH 6.0). Die Helicase wurde von der Industrie Biologique Française S.A., Gennevilliers, bezogen.

Die Ansätze wurden im Schüttelinkubator bei 30°C gehalten. Die Sphäroplastenbildung konnte im Phasenkontrast-Mikroskop verfolgt werden; sie dauerte ungefähr 90 Minuten. Nach zweistündiger Inkubation im Helicasemedium wurden die Sphäroplasten 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und die Sedimente sorgfältig in Sorbitmedium (0.6 m Sorbit, 0.01 m Citrat-NaOH; pH 6.0) aufgeschlämmt, nochmals wie beschrieben zentrifugiert und suspendiert. In Anlehnung an Wiemken (1969) wurden die Sphäroplasten zur weiteren Reinigung auf einen Stufengradienten mit 6% und 9% Ficoll (Pharmacia Uppsala, Schweden) in 0.6 m Sorbit, 0.01 m Citrat-NaOH (pH 6.0) geladen und 30 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Die sedimentierten Sphäroplasten wurden wiederum in Sorbitmedium aufgenommen.

3.1.4. Isotonische Isolation von Hefe-Vakuolen

Die Hefe-Vakuolen wurden nach der Methode von Jans et al. (in Vorbereitung) unter Verwendung von isotonischen Lösungen isoliert.

3.1.5. Zur Wirkung der Alkaloide auf Schöllkraut-Vakuolen

Suspensionen von frisch gewonnenem Milchsafft oder von isolierten Vakuolen wurden mit steigenden Mengen von Alkaloiden versetzt. Die Stabilität der Vakuolen wurde anhand der Trübung respektive der Extinktion bei 650 nm verfolgt. Da die Alkaloide bei dieser Wellenlänge nicht absorbieren, stellt die gemessene Extinktion ein Mass für die Streuung des Lichtes an den Vakuolen und somit indirekt für deren Konzentration dar.

10 bis 60 Minuten nach der Alkaloidzugabe wurden die Proben 15 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Hierauf wurde die Verteilung der Stoffe in Überstand und Sediment bestimmt, um Auskünfte über die Einflüsse der Alkaloide auf die Permeabilität der Vakuolen zu erhalten.

3.1.6. Zur Wirkung der Alkaloide auf Hefe-Vakuolen

Suspendierte Hefe-Vakuolen wurden wie die Schöllkraut-Vakuolen mit verschiedenen Alkaloidmengen versetzt. Dann wurde ihre Stabilität und ihr Speichervermögen für Mikromoleküle geprüft. Zur Bestimmung der Stabilität wurde entweder die Extinktion bei 650 nm gemessen oder die Konzentration an intakten Vakuolen mikroskopisch in der Zählkammer bestimmt. Das Speichervermögen für Mikromoleküle wurde vor allem mittels DC kontrolliert. Hierzu wurden die Proben zentrifugiert (20 Minuten bei 3000 g) und die Verteilung der Mikromoleküle in Überstand und Sediment (Vakuolen) bestimmt. Die Ansätze wurden meist zuvor lyophilisiert und in einem kleinen Volumen des folgenden Gemisches aufgenommen: Aethanol : Wasser : Essigsäure : Ammoniak (25%) = 40 : 20 : 1 : 0.1 (Schaffner 1969).

3.1.7. Dünnschichtchromatographie

a) Schöllkraut-Vakuolen

Für Stoffbestimmungen wurden die Laufmittel I, IV (Seite 309) und VII (Seite 318) benützt. Die Chromatogramme wurden mit den auf Seite 318 beschriebenen Reagenzien besprüht, bisweilen auch mit Ninhydrin (Waldi 1962).

b) Hefe-Vakuolen

Die Inhaltsstoffe der Hefe-Vakuolen wurden auf Kieselgel-DC-Platten mit oder ohne Fluoreszenzfarbstoff getrennt. Meist wurde das folgende Laufmittel von Schaffner (1969) verwendet: Äthanol : Wasser : Essigsäure : Ammoniak (25%) = 10 : 7.4 : 1 : 0.6. Nach beendigem Lauf wurden die Platten an der Luft getrocknet und hierauf im kurzwelligen Ultraviolett (253.7 nm) betrachtet. Anschliessend wurden sie mit Anisaldehyd, Ninhydrin, Rhodamin B oder Jod- und Stärkelösung besprüht.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Wirkung der Alkaloide auf die Stabilität der Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes

Eine dem Sanguinarin durchaus vergleichbare Wirkung zeigt Chelerythrin; wie im Falle von Sanguinarin lysieren die Vakuolen auch in Gegenwart dieses Alkaloids, falls die angebotene Menge ihr Aufnahmevermögen übersteigt. Die Lyse der Vakuolen kann photometrisch anhand der Extinktionsabnahme bei 650 nm verfolgt werden. Selbstverständlich hängt das Eintreten der Lyse vom Verhältnis der Kapazität des Zellsaftes, also der Menge der verwendeten Vakuolen, zur Konzentration der zugesetzten Alkaloide ab. Bei gleichbleibender Menge der Vakuolen tritt die Lyse mit steigender Konzentration der verabreichten Alkaloide immer schneller ein. Unter den gewählten Bedingungen war die durch Alkaloidüberschuss ausgelöste Lyse nach 10 bis 60 Minuten vollständig.

Verschiedene Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Instabilität der Vakuolen durch die freien, im Medium enthaltenen Alkaloide verursacht wird. Beispielsweise kann durch Erniedrigung des pH von 6.7 auf 6.0 ein Teil der anionischen Ladungspartner im Zellsaft aufprotoniert und dadurch die Aufnahmekapazität für Sanguinarin und Chelerythrin herabgesetzt werden; die Lyse tritt dann bei relativ geringerer Konzentration der Alkaloide ein. Ein ähnlicher Effekt kann durch Inkubation bei 10⁰ C statt bei 25⁰ C erreicht werden; die Geschwindigkeit der Aufnahme fällt dabei auf ca. einen Viertel der normalen ab, die Alkaloide verbleiben länger im Medium und die Vakuolen sind wesentlich labiler als bei 25⁰ C.

Im Gegensatz zu Sanguinarin und Chelerythrin zeigen Berberin, Coptisin und Dihydrocoptisin keine Beeinträchtigung der Stabilität der Vakuolen. Die Stoffverteilung nach Zentrifugation ist durchaus vergleichbar mit den Nullproben: mit Ausnahme der zugegebenen Alkaloide sind praktisch alle Vakuoleninhaltsstoffe im Sediment.

Es fällt somit auf, dass gerade jene Alkaloide bevorzugt in die Vakuolen aufgenommen werden, welche in vitro deren Lyse bewirken können, falls sie nicht mehr, oder zu langsam, aus dem Medium in den Zellsaft übertreten (siehe auch Tab. 8 und Abb. 6). In Tabelle 10 sind diese Befunde als Übersicht zusammengestellt.

Tabelle 10:

Wirkung einiger Schöllkraut-Alkaloide auf isolierte Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes

Zugegebenes Alkaloid	Aufnahme in die Vakuolen	Ausgetauschtes Alkaloid	Stabilität der Vakuolen
Sanguinarin	+	Dihydrocoptisin	Lyse
Chelerythrin	+	Dihydrocoptisin	Lyse
Berberin	—	—	stabil
Coptisin	—	—	stabil
Dihydrocoptisin	—	—	stabil

3.2.2. Wirkung der Alkaloide auf Hefe-Vakuolen

Werden isotonisch isolierte Hefe-Vakuolen mit Sanguinarin versetzt, so verlieren sie nach und nach ihren Inhalt an Mikromolekülen (z.B. Aminosäuren und Nukleotidderivate). Im Phasenkontrast-Mikroskop lässt sich der Verlust an Inhaltsstoffen indirekt beobachten: Die Vakuolen, welche normalerweise wegen ihrer etwas grösseren Dichte in 0.6 m Sorbit als dunkle Vesikel sichtbar sind, werden in Gegenwart von Sanguinarin zusehends heller, bis sie denselben Grauton wie die Umgebung angenommen haben und nur mehr schwer zu erkennen sind. Ein Platzen der Organelle ist indessen nicht festzustellen.

Eindeutiger lässt sich der Verlust an Inhaltsstoffen mittels DC nachweisen: 10 bis 60 Minuten nach Zugabe der Alkaloide werden die Vakuolen abzentrifugiert und der Gehalt an Mikromolekülen in Sediment und Überstand bestimmt. In den Ansätzen mit Sanguinarin verlieren die Vakuolen dabei stets einen Grossteil der Inhaltsstoffe (Abb. 8). Der Effekt ist bis zu Endkonzentrationen von 10^{-4} m ausgeprägt; bei geringeren Alkaloidmengen sind die Auswirkungen nicht mehr sicher nachweisbar.

Wird den Vakuolen anstelle von Sanguinarin Berberin oder Coptisin verabreicht, so bleiben die Mikromoleküle im Zellsaft lokalisiert. Die Vakuolen sind in ihrem Verhalten von den Kontrollansätzen ohne Alkaloid nicht zu unterscheiden, und zwar sowohl hinsichtlich der Inhaltsstoffe (DC-Untersuchungen) als auch bei Beobachtungen im Phasenkontrast-Mikroskop.

Die Veränderung des Speicherungsvermögens für Mikromoleküle durch Sanguinarin lässt sich sehr schön am Beispiel von S-Adenosyl-Methionin zeigen: Hefezellen werden auf einem Medium gezüchtet, welches zusätzlich 5 mM Methionin enthält. In der Folge bilden sie, besonders in der stationären Wachstumsphase, S-Adenosyl-Methionin, das in den Vakuolen angereichert wird (Svihla et al. 1963). Werden aus solchen Hefezellen Vakuolen durch isotonische Lyse von Sphäroplasten gewonnen, so bleibt das S-Adenosyl-Methionin im Zellsaft. Nach DC ist die Verbindung leicht zu erkennen: sie absorbiert kurzwelliges UV (253,7 nm), reagiert mit Ninhydrin (Aminosäure-Anteil) und mit Anisaldehyd (Zucker-Anteil).

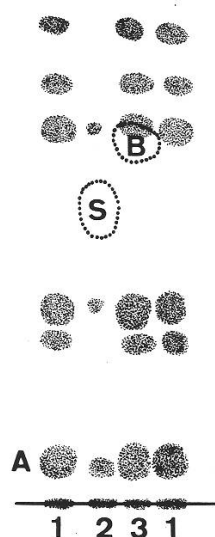


Abbildung 8:

Einfluss von Schöllkraut-Alkaloiden auf das Speicherungsvermögen der Hefe-Vakuolen für Mikromoleküle.

Dünnschichtchromatogramm verschiedener Ansätze.

Sprühreagens: Ninhydrin.

- 1 Vakuolen ohne zugegebene Alkaloide
- 2 Vakuolen in 5×10^{-4} m Sanguinarin-Chlorid
- 3 Vakuolen in 5×10^{-4} m Berberin-Chlorid
- S Sanguinarin-Flecken
- B Berberin-Flecken
- A S-Adenosyl-Methionin

Die Vakuolen sind in allen Ansätzen in 0.6 m Sorbit, 0.01 m Citrat-NaOH (pH 6.0) suspendiert gewesen.

Ein analoges Bild wie 3 liefern auch die Coptisin-Ansätze.

Nach Zugabe von Sanguinarin verlieren die Hefe-Vakuolen in relativ kurzer Zeit ihren Gehalt an S-Adenosyl-Methionin, während das Zusetzen von Berberin oder Coptisin ohne Wirkung zu sein scheint.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass der Einfluss des Sanguinarins auf isolierte Vakuolen bedeutend geringer ist, wenn diese in einem Medium aufbewahrt werden, welchem lösliche Fraktion eines Homogenates aus Hefezellen zugefügt wird. Es dürfte sich um einen analogen Effekt handeln wie die Abnahme der baktericiden Wirksamkeit des Alkaloids in Gegenwart von Blutserum (Drobot'ka et al. 1958, Vichkanova et al. 1969). Es ist dies wahrscheinlich auf eine unspezifische Bindung des Alkaloids an Carboxylgruppen, Phosphat, etc. zurückzuführen.

3.3. Diskussion

Das Schöllkraut ist eine altbekannte Arzneipflanze. Hartwell (1970) gibt eine reichhaltige Zusammenstellung von Berichten über die Verwendung des Schöllkrautes für pharmazeutische Zwecke. Es geht daraus hervor, dass die Pflanze schon zur Zeit von Paracelsus und noch vorher als wirksamer Helfer gegen Warzen, Tumore und krebsartige Geschwüre Beachtung gefunden hat. Zu diesem Zwecke wird sie noch bis in die Gegenwart gebraucht. Recht unterschiedlich sind die Behandlungsmethoden; es werden entweder nur bestimmte Teile (z.B. Wurzel, Blätter, Blüten) oder die ganze Pflanze benützt, als Pulver oder Extrakt bzw. Tee; in anderen Fällen wird nur der Milchsafte verwendet.

Untersuchungen in neuerer Zeit haben das Schöllkraut als Arzneipflanze bestätigt (Hermann 1956, Sokoloff et al. 1964, Furusava et al. 1969) und ihm die folgenden Eigenschaften zuerkannt: Die Schöllkraut-Droge wirkt schwach beruhigend auf das Zentralnervensystem; sie zeigt spasmolytische Wirkung auf Darm und Bronchien; nachgewiesen ist auch eine cholekinetische Wirksamkeit (Karsten et al. 1962). Die Pflanze enthält fungistatische (Gertig et al. 1958),

bactericide, infusoricidale (Bodalski et al. 1957), ebenso Antitumor-Faktoren (Sokoloff et al. 1964). Es ist schon der Verdacht geäußert worden, die hemmende Wirkung von Schöllkraut-Drogen, besonders von Milchsaft, auf Warzen und Geschwüre sei auf Proteasen zurückzuführen (Pelikan 1958). Diese Vermutung dürfte kaum zutreffen; die proteolytischen Aktivitäten, auch von Milchsaft, sind gering (Matile et al. 1970). Vielmehr sind praktisch ausschliesslich die Alkaloide als Träger der verschiedenen Wirkungen zu betrachten. Als Beispiele seien angeführt:

Sanguinarin, örtlich aufgetragen, bewirkt lokale Anästhesie. Es verursacht Erhöhung des Blutdruckes, regt die Atemtätigkeit an (Osol und Farrar 1955, Kelentei 1960), ebenso den Speichelfluss, verstärkt die Darmperistaltik und beeinflusst die Motorik (Osol und Farrar 1955, Lieb und Scherf 1956, Nicol'shaya 1966). Das Alkaloid hemmt die Aktivität der Cholinesterase (Nicol'shaya 1966) und bewirkt, ähnlich wie Colchizin, Chromosomenverdoppelung (Osol und Farrar 1955). Sanguinarin ist wirksam gegen Bakterien, Pilze, Infusorien, Nematoden und Phagen (Bodalski et al. 1957, Bodalski et al. 1959, Fencel und Košeński 1960, Nicol'shaya 1966, Vichkanova 1969). Es ist cytotoxisch (Svejda et al. 1969). Chronisch verabreicht kann es carzinogen sein, besonders sein Metabolit, das 3,4-Benzacridin (Hakim 1968).

Chelerythrin ist in seinen Eigenschaften dem Sanguinarin sehr ähnlich. Seine pharmakologischen Wirkungen und seine Giftigkeit sind etwas geringer als jene von Sanguinarin (Osol und Farrar 1955, Bodalski et al. 1957 und 1958, Masayuki 1965). Das Alkaloid bewirkt zunächst eine Erhöhung, dann ein Absinken des Blutdruckes. Es reizt die sensitiven Nervenenden (Benigui et al. 1962).

Coptisin ist cytotoxisch, ohne Antitumor-Wirkung (Svejda et al. 1969, Kim et al. 1969); das Alkaloid hat Antiacetylcholin-Wirkung, aber bedeutend weniger als seine reduzierte Form, das d, l-Tetrahydrocoptisin (d, l-Stylopin) (Kitabatake et al. 1964).

Während die Wirkung der einzelnen Alkaloide zum Teil schon recht gut erforscht ist, herrscht noch weitgehende Unklarheit über die Wirkungsmechanismen. Bei den mit Berberin verwandten Alkaloiden scheint die Wertigkeit des Stickstoffs von einiger Bedeutung zu sein. Jedenfalls haben Berezhinskaya et al. (1968) beobachtet, dass Alkaloide mit quarternärem Stickstoff (im vorliegenden Falle Berberin und Palmatin) eine stärkere Hemmung der Cholinesterase zeigten als die analogen Alkaloide mit tertiärem Stickstoff (Tetrahydroformen obiger Alkaloide). Nach Kitabatake et al. (1964) zeigt Coptisin (quarternärer Stickstoff) schwache, d, l-Tetrahydrocoptisin (Stylopin) dagegen starke Antiacetylcholin-Wirkung. Coptisin bewirkt deutlich Uteruskontraktion, Stylopin dagegen nur schwache.

Von erheblicher Bedeutung für die Wirkung der Alkaloide dürfte ferner ihr lipophiler Charakter sein. Durch Interaktion mit den Zellmembranen kann deren Permeabilität verändert werden, was empfindliche Störungen der zellulären Ordnung (Stoffverteilung, Potential) hervorrufen kann. Modak et al. (1970) finden, dass Berberin in Cholerabakterien (*Vibrio comma* und *Vibrio eltor*) das Gleichgewicht an Fettsäuren in allen Lipidfraktionen stört. Wirkungen der Alkaloide auf Vakuolen bzw. Tonoplasten sind in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt worden. Im Falle der Hefe-Vakuolen wird dadurch die Permeabilität

des Tonoplasten für Mikromoleküle wesentlich verändert. Bemerkenswert ist dabei der Zusammenhang zwischen Lipophilie und Wirkung der Alkaloide: die beiden lipophileren Alkaloide Sanguinarin und Chelerythrin (siehe R_f -Werte bei DC, S. 311) haben Wirkungen an Vakuolen gezeigt, während die beiden polareren, Berberin und Coptisin, scheinbar ohne Wirkungen geblieben sind. Dieser Befund steht im Einklang mit jenem von Svejda et al. (1969), wonach Berberin weniger cytotoxisch ist als Chelerythrin und vor allem als Sanguinarin.

Neben dem lipophilen Charakter der Alkaloide dürfte auch deren Vermögen, mit Protein und anderen Zellinhaltsstoffen Aggregate zu bilden, entscheidend sein für deren Einflüsse auf Zellen und Gewebe. Komplexe zwischen Alkaloiden und Zellinhalten ziehen die intrazelluläre Ordnung stark in Mitleidenschaft. Kommt es anderseits zur Bildung von Aggregaten ausserhalb der Zellen, so dürfte dadurch die Wirksamkeit der betreffenden Alkaloide gegenüber Zellen und Geweben herabgesetzt werden. Dies ist möglicherweise der Grund für den von Drobot'ko et al. (1958) und Vichkanova et al. (1969) beobachteten Aktivitätsschwund der beiden Alkaloide Chelerythrin und Sanguinarin gegenüber Bakterien, wenn diese in Gegenwart von Blutserum oder Pferdeserum den Alkaloiden ausgesetzt werden. Die auf Seite 337 erwähnte Abnahme des Effekts von Sanguinarin auf Hefe-Vakuolen in Gegenwart von löslicher Fraktion aus einem Homogenat von Hefezellen ist wahrscheinlich ebenfalls auf Komplexe zwischen dem Alkaloid und Homogenats-Bestandteilen zurückzuführen. Dass es zu Aggregationen kommen kann, lässt sich zum Beispiel mit einer Lösung von Serumalbumin aus Rinderblut zeigen: wird eine 5%-ige Albuminlösung mit Sanguinarin (z.B. 3×10^{-4} m) versetzt, so ist eine teilweise Ausfällung des Alkaloids zu beobachten. Ob ein Alkaloid mit verschiedenen Stoffen Aggregate zu bilden vermag oder nicht, ist entscheidend für die Weise, wie es therapeutisch angewendet werden kann. Dass die Schöllkraut-Drogen im allgemeinen von aussen her auf die betroffenen Gewebe gegeben werden (z.B. als Kompressen oder Pasten bei Hautkrankheiten oder als Tee bei Magen- oder Darmgeschwüren) und nicht intravenös, erscheint sinnvoll, wenn man bedenkt, dass sie mehrere Alkaloide enthalten, die zu Aggregationen mit verschiedenen Stoffen neigen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Akkumulation von Alkaloiden in den Vakuolen des Schöllkraut-Milchsaftes auseinander. Sie befasst sich ferner mit der Wirkung einiger Schöllkraut-Alkaloide auf Vakuolen. Es ist mit den Alkaloiden Sanguinarin, Chelerythrin, Berberin und Coptisin gearbeitet worden. Alle vier Alkaloide sind leicht identifizierbar und wurden mittels Säulenchromatographie aus den oberirdischen Teilen des Schöllkrautes isoliert.

Dünnschichtchromatographische Auftrennungen von Schöllkraut-Latex haben ergeben, dass das Alkaloidspektrum während des Trennvorganges durch Oxydation verändert wird, es sei denn, das Laufmittel enthalte ein leichtflüchtiges Reduktionsmittel, wie z.B. Mercapto-Aethanol. Ein Vergleich von

Chromatogrammen mit und ohne Mercapto-Aethanol zeigt, dass ein Grossteil des üblicherweise gefundenen Coptisins von Dihydrocoptisin stammt, das während der Trennung oxydiert wird. Das Dihydrocoptisin dürfte in beachtlichen Mengen im Milchsaft des Schöllkrautes vorhanden sein.

Im *Chelidonium*-Latex sind alle untersuchten Alkaloide deutlich in den Vakuolen angereichert; dasselbe gilt auch für die phenolischen Verbindungen und die Chelidonsäure.

Mehrere hydrolytische Enzyme besitzen in den Vakuolen eine grössere spezifische Aktivität als im restlichen Milchsaft. Amylase und Phenoloxydase können nicht in den Vakuolen nachgewiesen werden, wohl aber im übrigen Milchsaft.

Sanguinarin und Chelerythrin haben eine grössere Affinität zum Vakuoleninhalt als Berberin, Coptisin oder Dihydrocoptisin; letzteres kann durch Zugabe von Sanguinarin oder Chelerythrin sogar aus den Vakuolen verdrängt werden.

Die Alkaloide werden im Zellsaft allem Anschein nach durch phenolische Verbindungen und Chelidonsäure gebunden, wobei die Chelidonsäure für die unterschiedliche Affinität der Alkaloide zum Zellsaft verantwortlich sein dürfte. Die Akkumulation von Alkaloiden in den Vakuolen kann auf die Bildung von Komplexen zwischen den Alkaloiden und Chelidonsäure sowie den phenolischen Verbindungen zurückgeführt werden, für welche der Tonoplast impermeabel ist.

Werden Vakuolen aus dem Milchsaft des Schöllkrautes dauernd in einem Medium, das Sanguinarin oder Chelerythrin enthält, aufbewahrt, so werden sie instabil und lysieren. Berberin, Coptisin und Dihydrocoptisin scheinen keinen Verlust der Stabilität zu verursachen.

Isotonisch isolierte Hefe-Vakuolen verlieren in Gegenwart von Sanguinarin ihre Fähigkeit, Mikromoleküle im Zellsaft aufzubewahren. Der Einfluss des Alkaloids wird durch die lösliche Fraktion eines Hefe-Homogenates stark vermindert. Coptisin und Berberin scheinen im Gegensatz zu Sanguinarin die Permeabilität des Hefetonoplasten für Mikromoleküle nicht zu verändern.

Resumé

Le travail présenté ici traite de l'accumulation d'alcaloïdes dans les vacuoles du latex de la grande chélidoine et décrit les effets qu'exercent quelques-uns de ces alcaloïdes sur les vacuoles. Les alcaloïdes suivants ont été employés: la sanguinarine, la chélérythrine, la berbérine et la coptisine. Ces composés sont faciles à identifier; ils ont été isolés des tiges et des feuilles de la grande chélidoine par chromatographie sur colonnes.

Les analyses du latex par chromatographie sur couches minces ont montré que le spectre des alcaloïdes varie durant la séparation, sous l'influence d'oxydation, si le solvant ne contient pas un réducteur volatil, comme par exemple, le mercapto-éthanol. Il en résulte que la plus grande partie de la coptisine, généralement retrouvée sur les chromatogrammes, provient de la dihydrocoptisine, oxydée durant la séparation chromatographique. Il semble que la dihydrocoptisine se trouve en quantité considérable dans le latex de la grande chélidoine.

Dans le latex, tous les alcaloïdes examinés sont bien concentrés dans les vacuoles de même que les composés phénoliques et l'acide chélidonique.

Plusieurs enzymes hydrolytiques possèdent une activité spécifique plus élevée dans les vacuoles, que dans le reste du latex. L'amylase et la phénoloxydase, en revanche, n'ont pas pu être détectées dans les vacuoles, mais seulement dans les parties cytoplasmiques du latex.

L'affinité de la sanguinarine et de la chélérythrine avec le contenu vacuolaire est plus élevée que celle de la berbérine, la coptisine et la dihydrocoptisine; cette dernière peut même être remplacée dans les vacuoles par la sanguinarine ou la chélérythrine lorsqu'on ajoute ces deux alcaloïdes aux vacuoles en suspension.

Dans les vacuoles, il semble que les alcaloïdes soient retenus par des composés phénoliques et l'acide chélidonique, ce dernier étant responsable de l'affinité différente des alcaloïdes avec le contenu vacuolaire. L'accumulation d'alcaloïdes dans les vacuoles du latex peut être expliquée par la formation de complexes entre les alcaloïdes et l'acide chélidonique ainsi que des composés phénoliques, c'est à dire des complexes pour lesquels le tonoplaste est imperméable.

La présence continue de sanguinarine ou de chélérythrine dans le médium dans lequel les vacuoles du latex de la grande chélidoine sont en suspension mène à une perte de stabilité et à la lyse de ces organelles. La berbérine, la coptisine et la dihydrocoptisine ne semblent pas influencer la stabilité des vacuoles.

En présence de sanguinarine, les vacuoles de levures, isolées isotoniement, perdent leur pouvoir de garder des micromolécules dans leur suc. Cet effet de l'alcaloïde est fortement réduit si on ajoute au milieu, dans lequel les vacuoles sont en suspension, la fraction soluble d'un homogénat de levures. La coptisine et la berbérine, en revanche, ne semblent pas influencer la perméabilité du tonoplaste pour les micromolécules.

Summary

This work concerns itself with the accumulation of alkaloids in the vacuoles of the latex of *Chelidonium majus* L. It also deals with the effect of some of these alkaloids on the vacuoles. I worked with the alkaloids sanguinarine, chelerythrine, berberine and coptisine. All four alkaloids are easily identified and were isolated from the shoot by column chromatography.

Thin-layer-chromatographic separation of the latex of *Chelidonium* showed that the spectrum of alkaloids changed because of oxydation during the isolation procedure. Oxydation is prevented, if a weak volatile reductant, such as mercapto-aethanol, is added to the chromatographic solvent. A comparison of the chromatograms run with and without mercapto-aethanol shows that a major part of the coptisine derives from the dihydrocoptisine which has been oxydized during chromatography. Dihydrocoptisine is probably present in the latex of *Chelidonium* in considerable amounts.

All four alkaloids of the latex of *Chelidonium* are markedly enriched in the vacuoles. The same holds true for phenolic compounds and chelidonic acid. The specific activity of several hydrolytic enzymes is higher in the vacuoles than

in the rest of the latex. Amylase and phenoloxydase are only found in the cytoplasmic parts of the latex.

Sanguinarine and chelerythrine have a greater affinity to the vacuolar content than berberine, coptisine and dihydrocoptisine. The latter can be displaced from the vacuoles through the addition of sanguinarine.

The alkaloids are probably bound in the vacuoles by phenolic compounds and chelidonic acid. Chelidonic acid may be responsible for the differential affinity of the alkaloids to the vacuolar content. The accumulation of the alkaloids in the vacuoles is probably due to the formation of complexes with the phenolic compounds and with chelidonic acid. These complexes can not move through the tonoplast.

The continuous presence of sanguinarine and chelerythrine in the medium in which vacuoles are suspended causes loss of stability and lysis of the vacuoles from the latex of *Chelidonium*. Berberine, coptisine and dihydrocoptisine do not appear to have this effect.

Isotonically isolated vacuoles from yeast lose their ability to retain micro-molecules in the presence of sanguinarine. The effect of this alkaloid is strongly reduced by the addition of the soluble fraction of a yeast homogenate. Coptisine and berberine in contrast do not change the permeability of the tonoplast for micromolecules.

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Philippe Matile, möchte ich für seine Anregungen und Diskussionen recht herzlich danken. Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Albert Frey-Wyssling für die Übernahme des Korreferates. Herrn Paul Frick, Obergärtner am Institut für allgemeine Botanik an der ETH, möchte ich für die Pflege und Aufzucht der Schöllkrautpflanzen danken. Schliesslich danke ich allen meinen Gefährten im Labor, insbesondere Herrn Gotthold Schaffner und Herrn Jürg Meyer, für ihre Hilfe in Rat und Tat.

Literatur-Verzeichnis

- Aebi H. in H.U. Bergmeyer, 1970. Methoden der enzymatischen Analyse, p. 637, Verlag Chemie, Weinheim.
- Anderson J.W. 1968. Extraction of Enzymes and Subcellular Organelles from Plant Tissues. Phytochem. 7, 1973.
- Benigui R., C. Capra und P.E. Cattorini, 1962. Piante Medicinali-Chimia, Farmacologia e Terapia. Inverni & Della Beffa Milano.
- Berezhinskaya V.V., E.E. Aleshinskaya und E.A. Trutnerva, 1968. Anticholinesterase activity of some isoquinoline alkaloids. Farmakol. Toksikol. 31, 296.
- Bodalski T. und H. Rządowska, 1957. Infusoricidal action of some alkaloids of *Chelidonium majus*. Dissertationes Pharm. 9, 266.
- Bodalski T., M. Kantoč und H. Rządowska, 1957. Antiphage activity of some alkaloids of *Chelidonium majus*. Dissertationes Pharm. 9, 273.
- Bodalski T., H. Peleżarska und M. Ujec, 1958. Action of some alkaloids of *Chelidonium majus* on *Trichomonas vaginalis* in vitro. Arch. Immunol. Terap. Doświadczalnej 6, 705.
- Dravert F. und H. Gebbing, 1963. Ein qualitativer Schnelltest auf Phenoloxydase. Die Naturwiss. 50, 523.
- Drobot'ko V.G., E. Ya. Rashba, B.E. Afzenman, S.I. Zelepukha, S.I. Novikova und M.B. Kaganskaya, 1959. Antibacterial activity of alkaloids obtained from *Valeriana officinalis*, *Chelidonium majus*, *Nuphar luteum* and *Asarum europaeum*. Antibiotiki 1958, 22, zit. in CA 53, 12589.
- Fairbairn J.W., M. Djoté und A. Paterson, 1968. The Alkaloids of *Papaver somniferum* L. — VII. Phytochem., 7, 2111.

- Fairbairn J.W., J.M. Palmer und A. Paterson, 1968. The Alkaloids of *Papaver somniferum* L.—VIII. Phytochem., 7, 2117.
- Frencel J. und R. Košeński, 1960. Fungistatic action in vitro of some alkaloids from *Chelidonium majus* L., Dissertationes Pharm., 12, 7.
- Furusawa E., Sh. Furusawa, M. Kroposki und W. Cutting, 1969. Higher plants as a source of antiviral agents. Progr. Antimicrobiol. Anticancer Chemother., Proc. Int. Congr. Chemother. 6th, 2, 810.
- Gertig H., I. Alkiewicz und E. Janiakowa, 1957. Fungistatic activity of preparations and of some compounds isolated from *Chelidonium*. Acta Polon Pharm. 14, 101.
- Hakim S.A.E. 1968. Sanguinarine, Carcinogenic contaminant in Indian edible oils. Ind. J. Cancer 5, 183.
- Hartwell J.L. 1970. Plants Used Against Cancer. Lloydia 33, 322.
- Heinrich G. 1967. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Milchröhren von *Taraxacum bicorne*. Flora 158, 413.
- Herrmann G. 1956. Therapy with medicinal plants in present medicine. Med. Monatsschr. 10, 790.
- Holubek J. und O. Strouf, 1965/1966. Spectral Data and Physical Constants of Alkaloids. Acad. Publ. House of the Czechoslovak. Acad. of Sciences, Prag. Bd. I und II.
- Jans B. 1969. Isolation und Charakterisierung von Vakuolen aus dem Milchsaft von *Chelidonium majus* L. Diplomarbeit ETH Zürich.
- Karrer P. 1963. Lehrbuch der organischen Chemie, p. 567 f, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Karsten G., U. Weber und E. Stahl, 1962. Lehrbuch der Pharmakognosie für Hochschulen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Kelentei B. 1960. Pharmacology of Chelidonine and Sanguinarine. Arzneimittelforsch. 10, 135.
- Kim H.K., N.R. Farnsworth, R. Blomster und H.H.S. Fong, 1969. Biological and phytochemical evaluation of plants. V. Isolation of two cytotoxic alkaloids from *Chelidonium majus*. J. Pharm. Sci. 58, 372.
- Kitabatake Y., K. Ito und M. Tajima, 1964. Effect of corydalis and its components on mouse small intestine and uterus. Yakugaku Zasshi 84, 73, zit. nach CA 61, 7575e (1964).
- Klásek A., V. Šimánek und F. Šantavý, 1968. Conversion of Rhoenagenediol to Coptisine. Tetr. Lett. 43, 4549.
- Kwasniewski V. 1958. Ein Flavonol in den oberirdischen Teilen des *Chelidonium majus* L. Arzneimittelforsch. 8, 245.
- Lieb W.A. und H.J. Scherf, 1956. Papaveraceae alkaloids and eye pressure. Klin. Monatsbl. Augenheilk. 128, 686.
- Linhardt K. und K. Walter, in H.U. Bergmeyer, 1963. Methods of Enzymatic Analysis, p. 783, Acad. Press, New York und London.
- Loomis W.D. und J. Battaile, 1966. Plant Phenolic Compounds and the Isolation of Plant Enzymes. Phytochem. 5, 423.
- Matile Ph., B. Jans, R. Rickenbacher, 1970. Vacuoles of *Chelidonium* Latex: Lysosomal Property and Accumulation of Alkaloids. Biochem. Physiol. Pfl. 161, 447.
- Mehran A.-R. 1958. Contribution à l'étude des acides aminés du latex d'*Euphorbia cyparissias* L. et de *Chelidonium majus* L., Thèse Nr. 1291, Imprimerie Genévoise, Genève.
- Modak Sh., M.J. Modak und A. Venkataraman, 1970. Mechanism of action of berberine on *Vibrio cholerae* and *Vibrio cholerae* biotype el tor. Ind. J. Med. Res. 58, 1510.
- Molisch H. 1923. Mikrochemie der Pflanze. 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena, p. 297.
- Mothes K. und H.R. Schütte, 1969. Biosynthese der Alkaloide. Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
- Neumann D. und E. Müller, 1972. Beiträge zur Physiologie der Alkaloide, III. Teil. Biochem. Physiol. Pflanzen 163, 375.
- Nikol'shaya B.S. 1966. Pharmacology of sanguinarine, an anticholinesterase alkaloid. Farmakol. i Toksikol. 29, 90, zit. nach CA 64, 14'811 d.
- Nyomárcay K.M. 1971. Die Wirkung der Trocknung auf die Ausbildung des Alkaloid-Spektrums von *Chelidonium majus* L. Ann. Univ. Sci. Budapest. de Rolando Eötvös Nom., Sect. Biol. 13, 127.

- Masayuki Onda, K. Takiguchi, M. Hirakura, H. Fukushima, M. Akagawa und F. Naoi, 1965. The constituents of *Macleaya cordata*. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 39, 168, zit. nach CA 63, 18'964 f.
- Osol A. und G.E. Farrar, 1955. The dispensatory of the united states of america, 25th edition. J.B. Lippincott Company, Philadelphia-Montréal.
- Pastuska G. und Helga Trinks, 1961. Die Dünnschicht-Elektrophorese und ihre Anwendung zur Trennung von Phenolen und Phenolcarbonsäuren. Chem. Zeitg. 85, 535.
- Pelikan W. 1958. Heilpflanzenkunde, p. 118. Philosophisch-anthroposophischer Verlag, Dornach.
- Pujarniscle S. 1969. Étude biochimique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Mull. Arg. Différences et analogies avec les lysosomes. Dissertation Nr. 0.3379, Faculté des sciences d'ORSAY; Université de Paris.
- 1972. Compartimentation de diverses oxydo-réductases dans le latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth). Müll. Arg.; Phys. Vég. 3, 459.
- Pütter J., in H.U. Bergmeyer, 1970. Methoden der enzymatischen Analyse, p. 648, Verlag Chemie, Weinheim.
- Randerath K. 1962. Dünnschicht-Chromatographie, p. 174 f, Verlag Chemie, GmbH, Weinheim.
- Riegel E.R. und M.C. Reinhard, 1926. Ultraviolett Absorption of a Series of Eight Organic Substances of the γ -Pyrone Type in Water Solution. J. Am. Chem. Soc. 48, 1334.
- Roberts M.F. 1971. Polyphenoloxydases in the 1000xg fraction of *Papaver somniferum*-Latex. Phytochemistry 10, 3021.
- Rompp H. 1966. Chemie-Lexikon IV, 6334. Franckh'sche Verlagsbuchhandl., Stuttgart.
- Sangster A.W. und K.L. Stuart, 1965. Ultraviolett spectra of alkaloids. Chemical Reviews 65, 69.
- Sárkány S. et al. 1970. Über die histologischen und feinstrukturellen Beziehungen und die Frage der Alkaloidbildung im Samen und in den Keimpflanzen von *Papaver somniferum* L. Die Pharmazie, 25, 625.
- Schaffner G. 1969. Kompartimentierung von S-Adenosylmethionin in der Hefe. Diplomarbeit ETH Zürich.
- Schulze Ch., E. Schnepf und K. Mothes, 1967. Über die Lokalisation der Kautschuckpartikel in verschiedenen Typen von Milchröhren. Flora 158, 458.
- Slavík J., L. Slavíková und J. Brabenec, 1965. Alkaloide der Mohngewächse (Papaveraceae). XXX: Über weitere Alkaloide aus der Wurzel von *Chelidonium majus* L. Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 30, 211.
- Sokoloff B., C.C. Saelhof, Y. Takenchi und R. Powella, 1964. Antitumor factors present in *Chelidonium majus*. I. Chelidonine and protopine. Growth 28, 225.
- Svejda J., J. Slavík, R. Dvořak und R. Adamek, 1969. Changes in L-cells after treatment with (isoquinoline) alkaloids. Scr. Med. 42, 291.
- Svihla G. und F. Schlenk, 1960. S-Adenosylmethionine in the vacuole of *Candida utilis*. J. Bacteriol. 79, 841.
- Svihla G., J.C. Dainko und F. Schlenk, 1963. Ultraviolett microscopy of purine compounds in the yeast vacuole. J. Bacteriol. 85, 399.
- Vágújfalvi D. 1971. Die Alkaloidakkumulation im Latex. Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 17, 217.
- Vichkanova S.A., M.A. Rubinchik, V.V. Adgina und T.S. Fedorchenko, 1969. Chemotherapeutic action of Sanguinarine. Farmakol. Toksikol. (Moscow) 32, 325; zit. nach CA 71, 59'405 e.
- Vichkanova S.A. und V.V. Adgina, 1971. Antifungal properties of sanguinarine. Antibiotiki 16, 609; zit. nach CA 75, 95'744 f.
- Waldi D. 1962. Sprühreagenzien für die Dünnschicht-Chromatographie. In: E. Stahl: Dünnschicht-Chromatographie; Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Wehner C. 1911. Die Pflanzenfarbstoffe. Springer-Verlag, Berlin.
- Wiemken A. 1969. Eigenschaften der Hefevakuole. Diss. Nr. 4340, ETH Zürich.
- Willaman J.J. und H.L. Li, 1970. Alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids. Lloydia 33, 158.

Bruno Philipp Jans
Trichtenhausenstrasse 47
8053 Zürich