

ÜBER DEN UMSATZ VON FLAVONOLEN UND ISOFLAVONEN IN *CICER ARIETINUM**

W. BARZ und W. HÖSEL

Institut für Biologie II, Biochemie der Pflanzen, Universität Freiburg/Br., Germany

(Received 1 April 1970)

Abstract—Pulse labelling experiments have shown that in the leaves and stems of *Cicer arietinum* L. the flavonols kaempferol, quercetin, and isorhamnetin are subject to turnover. The isoflavones formononetin and biochanin A are also metabolized in the green parts as has earlier been shown to occur in root tissue. Cinnamic acid-(3-¹⁴C) proved to be superior to DL-phenylalanine-(1-¹⁴C) as a precursor in pulse labelling experiments with flavonoids. The biological half lives of the compounds investigated increase in the order: formononetin, quercetin, biochanin A, kaempferol, and isorhamnetin.

EINLEITUNG

ISOFLAVONE und 3-Phenylcumarine unterliegen in *Cicer arietinum* L. und *Phaseolus aureus* Roxb. einem schnellen Umsatz^{1,2} und vollständigem Abbau.³ Die Geschwindigkeiten von Biosynthese und Umsatz der Isoflavone Formononetin und Biochanin A in *C. arietinum* können durch Aenderung von Regulationsfaktoren, beispielsweise dem Phytochromsystem, sehr stark beeinflusst werden.⁴ Daher ergeben sich die stationären Konzentrationen dieser Pflanzeninhaltsstoffe im lebenden Gewebe aus dem Wechselspiel von Aufbau und Abbau, wobei entsprechend dem Einfluß der verschiedenen möglichen Regulationsfaktoren die eine oder die andere Reaktion überwiegen kann.

Wir haben diese Untersuchungen über phenolische Inhaltsstoffe von *Cicer arietinum* nun auf die drei kürzlich von uns isolierten Flavonole Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin (3'-Methylquercetin)⁵ ausgedehnt. Verschiedene neuere Arbeiten⁶⁻⁹ ergaben Hinweise, daß in verschiedenen Pflanzenarten Flavonole stoffwechselaktive Produkte sein können. Wir berichten hier über Versuche, einen Umsatz von Flavonolen in *C. arietinum* nachzuweisen, um möglicherweise ihren Stoffwechsel mit dem anderer Phenole zu korrelieren.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Lokalisation der Flavonole

Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin konnten in der Kichererbse nur in den Blättern und den Stengeln nachgewiesen werden, während das schon länger bekannte 7,4'-Dihydroxy-flavonol¹⁰ auf das Hypokotyl, die Kotyledonen und die Wurzeln beschränkt ist.

* Part V in the series "Stoffwechsel aromatischer Pflanzeninhaltsstoffe".

¹ W. BARZ, Z. *Naturforsch.* **24b**, 234 (1969).

² W. BARZ und B. ROTH-LAUTERBACH, Z. *Naturforsch.* **24b**, 638 (1969).

³ W. BARZ, CH. ADAMEK und J. BERLIN, *Phytochem.* **9**, 1735 (1970).

⁴ W. BARZ und CH. ADAMEK, *Planta* **90**, 191 (1970).

⁵ W. HÖSEL und W. BARZ, *Phytochem.* **9**, 2053 (1970).

⁶ A. W. GALSTON, in *Perspectives in Phytochemistry* (edited by J. B. HARBORNE and T. SWAIN), p. 193, Academic Press, London (1969).

⁷ S. V. DURMISHIDZE und A. G. SHALASHOILI, *Dokl. Biochem. Sec English Transl.* **181**, 207 (1968).

⁸ J. NOGUCHI und SH. MORI, *Arch. Biochem. Biophys.* **132**, 352 (1969).

⁹ L. J. DIETERMAN, S. H. WENDER, W. CHORNEY und J. SHOK, *Phytochem.* **8**, 2321 (1969).

¹⁰ E. WONG, P. J. MORTIMER und T. A. GEISSMAN, *Phytochem.* **4**, 89 (1965).

Die Isoflavone Formononetin und Biochanin A sind dagegen in allen Organen der Kichererbse verbreitet.⁴

Versuche mit DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C)

Zur Bestimmung eines Umsatzes der als Aglyka wie auch als verschiedene Glykoside⁵ vorliegenden Flavonole wurde ein Pulsmarkierungsexperiment¹ ausgeführt. Dazu erhielten insgesamt 115 sieben Tage alte Cicerpflanzen in 400 ml Wasser 80 μ C DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C) über die Wurzeln während 20 Stunden zugeführt. Die radioaktive Verbindung wurde zu 91 Prozent von den Pflanzen aufgenommen. Von jeweils 15 Pflanzen wurden zwischen 5 und 144 Stunden nach Beendigung der Fütterung die Stengel auf Höhe der Kotyledonen abgetrennt und auf Flavonolaglyka (siehe Experimenteller Teil) aufgearbeitet. Die isolierten und gereinigten Flavonole wie auch die aus den oberirdischen Teilen isolierten Proben von Formononetin und Biochanin A erwiesen sich jedoch als völlig radioinaktiv. Die aus den Wurzeln und den Hypokotylen isolierten Isoflavone zeigten dagegen die üblichen Einbauraten^{1,4} zwischen 0,4–0,8 Prozent. Damit war gezeigt, daß die applizierte Vorstufe völlig im Bereich der Wurzeln umgesetzt worden war und nicht mehr für eine Markierung der in den grünen Teilen gebildeten Flavonole zur Verfügung stand. Die in früheren Arbeiten^{1,2,4} erhaltenen Ergebnisse über den Umsatz von Formononetin und Biochanin A und die Lichtabhängigkeit ihres Metabolismus waren mit der gleichen Applikationstechnik ausgeführt worden, so daß alle früheren Schlußfolgerungen aus der radioaktiven Markierung in Bezug auf Umsatz, biologische Halbwertszeit und Synthesegeschwindigkeit nur auf die in den Wurzeln und im Bereich des Hypokotyls lokalisierten Isoflavonmengen zutreffen. Es war demnach ebenfalls zu prüfen, ob auch die in den oberirdischen Teilen der Kichererbse gebildeten Isoflavone gleich schnellem Umsatz wie in den Wurzeln unterliegen.

Zur radioaktiven Markierung der in den Stengeln und Blättern gebildeten Phenole erwies sich eine Injektionstechnik mit Mikroinjektionsnadeln als geeignet. DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C) in Mikrolitermengen (0,5 μ C in 10 μ l Wasser pro Pflanze) in den Grenzbereich von Hypokotyl und Stengel von 7 Tage alten Kichererbsenpflanzen injiziert, führte innerhalb von 8 Stunden zu folgenden Einbauraten: Kämpferol 0,24 Prozent, Quercetin 0,05 Prozent und Isorhamnetin 0,07 Prozent.

Mit dieser Technik haben wir in Kichererbsenpflanzen zwischen dem 8 und 16. Tag nach Beginn der Keimung nach Injektion von DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C) den Umsatz von Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin verfolgt. In Abb. 1 sind die aus den oberirdischen Teilen von jeweils 15 Pflanzen erhaltenen Flavonolmengen sowie die spezifische Radioaktivität und die Gesamtradioaktivität der gereinigten Flavonolproben dargestellt. Während des Versuchs findet fortlaufend Flavonolsynthese statt, wie aus dem Anstieg der Ausbeutekurven und dem Abfall der spezifischen Radioaktivität hervorgeht. Die Kurven der isolierten Gesamtaktivität steigen bei Kämpferol und Isorhamnetin in diesem Zeitraum leicht an, während nur bei Quercetin ein sehr schwacher Abfall zu sehen ist, der auf einen Umsatz schließen läßt. Eine genauere Analyse der Kurven von Kämpferol und Isorhamnetin zeigt jedoch, daß einem Anstieg der isolierten Mengen auf das 5- bis 6-fache und einem Zuwachs der Gesamtradioaktivität um den Faktor 1,5–1,3 nur ein Abfall der spezifischen Radioaktivität um den Faktor 3 gegenübersteht. Diese Werte schließen einen Umsatz nicht aus, da sonst ein wesentlich größerer Anstieg der Kurven für die Gesamtaktivität beobachtet werden müßte. Wir erklären den leichten Anstieg mit der schon früher bei ähnlichen Versuchen mit Phenylalanin gemachten Beobachtung,² daß über den Versuchszeitraum laufend noch radioaktive Vorstufe in die Flavonole nachgeschoben worden ist, so

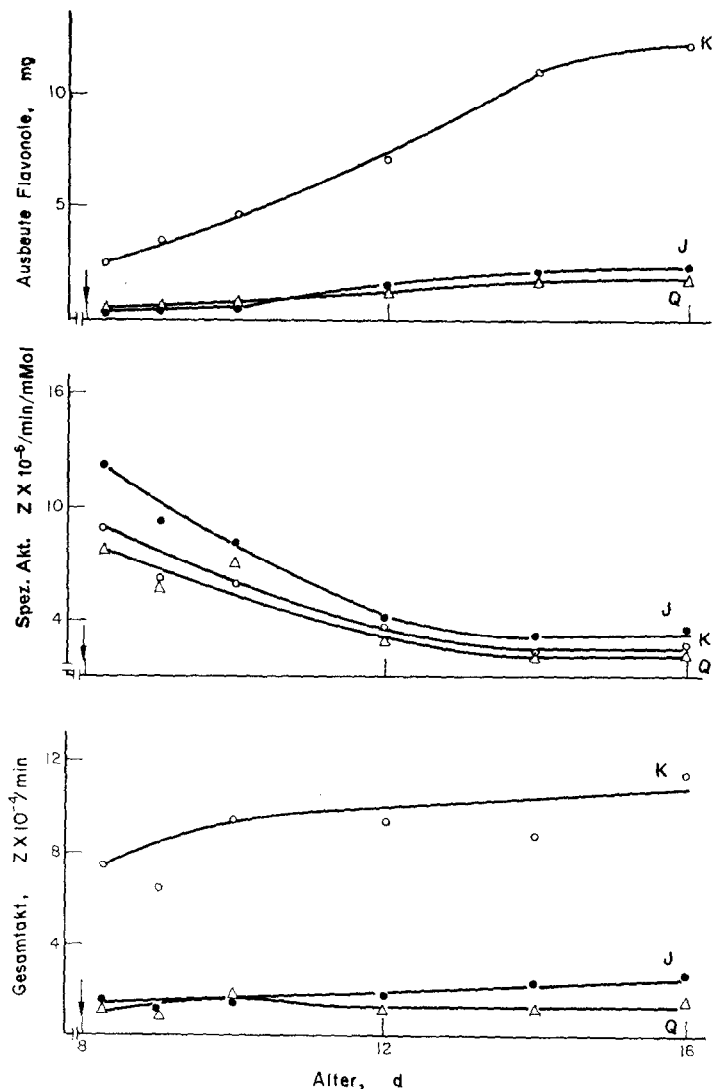


ABB. 1. AUSBEUTEN AN KÄMPFEROL (K), QUERCETIN (Q) UND ISORHAMNETIN (I) SOWIE VERLAUF DER SPEZIFISCHEN UND GESAMT-RADIOAKTIVITÄT. DIE INJEKTION (↓) VON DL-PHENYLALANIN-(1-¹⁴C) ERFOLGTE AM 8 TAGE.

daß ein Umsatz überdeckt worden ist. Diese Vermutung wird durch die nicht in Abb. 1 dargestellten Ergebnisse mit Formononetin und Biochanin A aus diesem Versuch bestätigt, bei denen die Kurven für die Gesamtradioaktivität nach einem leichten Anstieg über mehrere Tage horizontal verlaufen und dann erst abfallen.

Versuche mit Zimtsäure-(3-¹⁴C)

Da radioaktives Phenylalanin offensichtlich im Vergleich zur Geschwindigkeit des Flavonolstoffwechsels zu langsam verbraucht wird, haben wir vergleichbare Versuche mit Zimtsäure-(3-¹⁴C) ausgeführt.

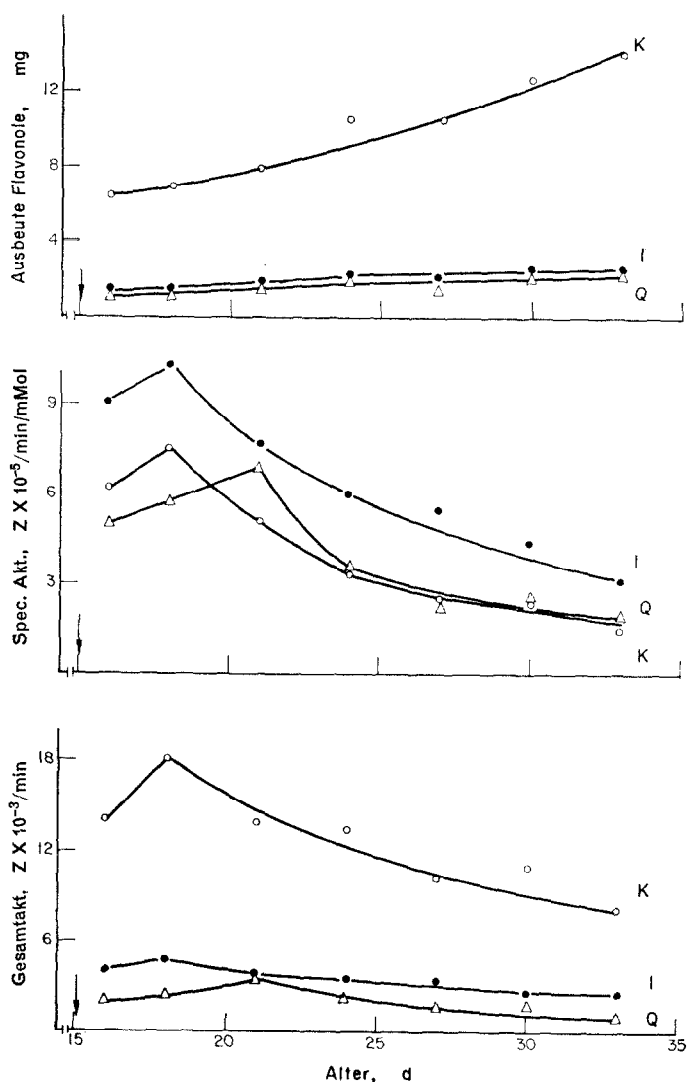


ABB. 2. AUSBEUTEN AN FLAVONOLEN SOWIE VERLAUF DER SPEZIFISCHEN UND GESAMT-RADIOAKTIVITÄT NACH GABE (↓) VON ZIMTSÄURE-(3-¹⁴C). ERKLÄRUNG DER SYMBOLE SIEHE ABB. 1.

In Abb. 2 sind die Ergebnisse eines Pulsmarkierungsversuches mit Kichererbsenpflanzen zwischen dem 15 und 33. Tag nach Beginn der Keimung dargestellt, die einen Umsatz von Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin eindeutig beweisen. Während einer Wachstumsphase, die noch durch einen linearen Anstieg der isolierten Flavonolmengen gekennzeichnet ist, findet schon ein deutlicher Umsatz statt; die Syntheserate ist jedoch noch größer als die Umsatzgeschwindigkeit. Hierin unterscheiden sich die Flavonole von den Isoflavonen, bei denen schon in jungen Pflanzen ein steady-state aus Aufbau und Abbau beobachtet wird.¹¹

¹¹ H. GRISEBACH und W. BARZ, *Naturwiss.* **56**, 538 (1969).

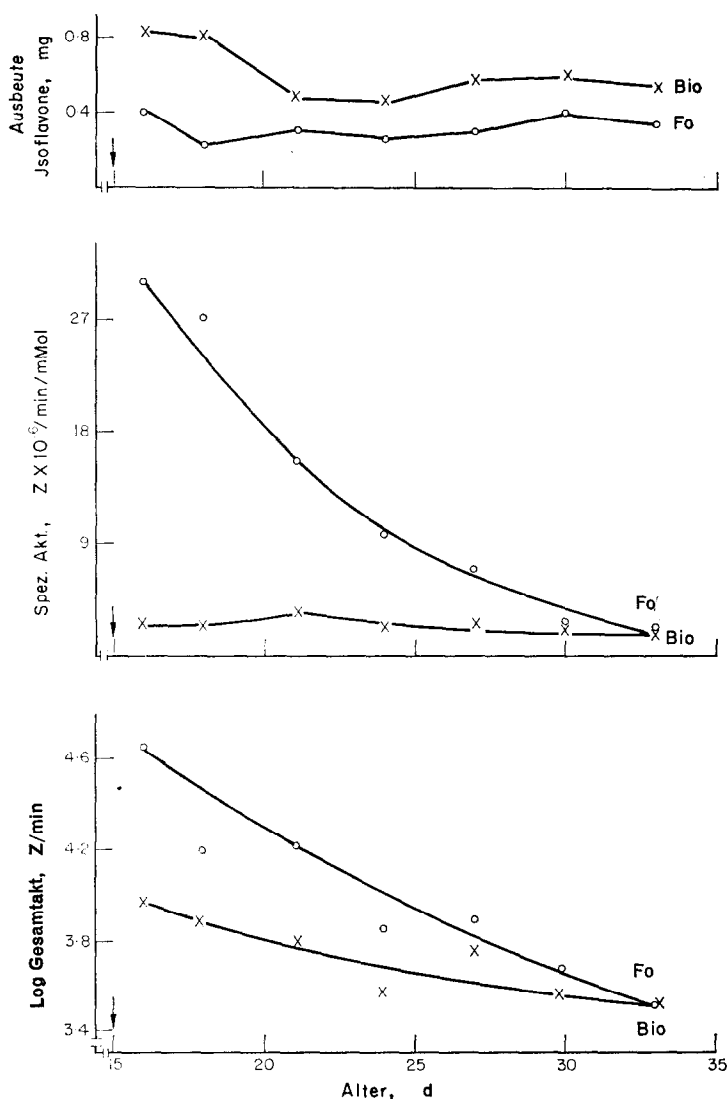


ABB. 3. AUSBEUTEN AN FORMONONETIN (Fo) UND BIOCHANIN A (Bio) SOWIE VERLAUF DER SPEZIFISCHEN UND GESAMT-RADIOAKTIVITÄT NACH GABE (↓) VON ZIMTSÄURE-(3-¹⁴C).

Wie oben erwähnt, ist für unsere Arbeiten über die Lichtabhängigkeit des Phenolstoffwechsels^{4,12} eine Kenntnis des Isoflavonumsatzes in den oberirdischen Teilen der Kichererbse von Interesse, da möglicherweise in den verschiedenen Organen der Phenolstoffwechsel unterschiedlich reguliert werden kann.⁴ Abb. 3 zeigt die aus dem Versuch mit Zimtsäure-(3-¹⁴C) erhaltenen Werte für Formononetin und Biochanin A. Beide Verbindungen unterliegen auch in diesen Pflanzenorganen einem Umsatz, wobei sich die

¹² W. BARZ, W. HÖSEL und CH. ADAMEK, *Phytochem.*, 10, 343 (1971).

früheren^{1,2} Ergebnisse bestätigen, daß der Formononetinstoffwechsel wesentlich rascher abläuft als der von Biochanin A.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, daß alle fünf untersuchten Polyphenole in den Blättern und den Stengeln einem Umsatz unterliegen. Da die Flavonole nicht im Hypokotyl oder den Wurzeln gefunden werden und für die Isoflavone ein Transport in den Wurzelbereich auszuschließen ist,¹³ kann der beobachtete Umsatz nicht durch Transport in andere Teile der Pflanze vorgetäuscht worden sein. Nach den Abklingkurven liegen die biologischen Halbwertszeiten in folgender Größenordnung: bei Formononetin 78 Stunden, Quercetin 168 Stunden, Biochanin A 228 Stunden, Kämpferol 288 Stunden und Isorhamnetin 360 Stunden. Aus den Kurven der Abb. 2 und 3 kann man schließen, daß die applizierte Zimtsäure rasch umgesetzt worden ist, so daß wohl keine über längere Zeit nachgelieferte Radioaktivität die biologischen Halbwertszeiten verfälscht hat. Diese Aussage findet ihre Bestätigung in dem Wert für Formononetin, da in den früheren Untersuchungen^{1,2} ähnliche Halbwertszeiten für Formononetin gefunden wurden. Biochanin A scheint in den oberirdischen Teilen der Kichererbse einem schnelleren Stoffwechsel zu unterliegen als in den Wurzeln,^{1,2} in denen ein ausgesprochenes Synthesemaximum durchlaufen wird mit anschließendem sehr geringen Umsatz.

Ein Vergleich der Abb. 1 und 2 zeigt sehr deutlich, daß bei Pulsmarkierungsexperimenten die Auswahl der aktiven Vorstufe von entscheidender Bedeutung ist, da deren Umsatzgeschwindigkeit im Vergleich zur Abbaugeschwindigkeit der untersuchten Produkte groß sein sollte. Das unterschiedliche Alter der jeweils verwendeten Pflanzen scheint uns von geringer Bedeutung zu sein, da auch bei wesentlich jüngeren Pflanzen schon ein Umsatz der Flavonole stattfindet.¹²

Die Werte für die spezifische Aktivität von Quercetin und Isorhamnetin (Abb. 1 und 2) liefern einen indirekten Hinweis, daß Isorhamnetin nicht durch einfache Methylierung aus Quercetin gebildet wird, da sonst, zumindest kurz nach der Applikation der Vorstufe, Quercetin die höhere spezifische Aktivität haben müßte. Andere Befunde¹² deuten ebenfalls darauf hin, daß beide Produkte unabhängig voneinander gebildet werden.

Unsere Befunde bilden einen weiteren Hinweis, daß Flavonole stoffwechselaktive Produkte darstellen. Diese Ansicht ist bereits von Galston⁶ auf Grund der aufgefundenen Beziehungen zwischen Aenderungen der Flavonolkonzentrationen und Wachstumsvorgängen in *Pisum sativum* ausgesprochen worden. Da über Quercetinglykosid-abbauende Enzyme aus Pflanzen kurz berichtet worden ist,⁸ möchten wir auch für den in *Cicer arietinum* L. gefundenen Umsatz einen Abbau vermuten.

EXPERIMENTELLER TEIL

Chemikalien

DL-Phenylalanin-(1-¹⁴C) (spez. Akt. 25 mc/mmole) bezogen wir vom Radiochemical Center, Amersham, England, und Zimtsäure-(3-¹⁴C) (spez. Akt. 9 mc/mmole) vom Département des Radioéléments, Gif-sur-Yvette, Frankreich. Quercetin wurde durch Säurehydrolyse aus Rutin erhalten und Kämpferol nach bekannten Vorschriften synthetisiert.¹⁴ Das 7,4'-Dihydroxyflavonol war ein synthetisches Produkt.¹⁰

Anzucht der Pflanzen

Die unter fließendem Wasser von 20° 48 Stunden vorgekeimten Samen wurden in einer Phytokammer des Instituts (Osram XQO, Xenonlangbogenlampe) in hydroponischer Lösung wie früher beschrieben angezogen.²

¹³ G. SCHULTZ, *Z. Pflanzenphysiol.* **61**, 29 (1969).

¹⁴ R. ROBINSON und J. SHEINODA, *J. Chem. Soc.* 1937, 1980 (1925).

Applikation der radioaktiven Substrate

DL-Phenylalanin-(1- ^{14}C) wurde unter denselben Temperatur und Lichtbedingungen wie bei der Anzucht der Pflanzen in wässriger Lösung über die Wurzeln appliziert.^{1, 2} Für die Injektion wurden Phenylalanin oder Zimtsäure in Wasser bzw. NaHCO_3 -Lösung (0,4%, pH 8) mit einer Mikroliter-Injektionsspritze in Portionen von 5 bis 10 Mikroliter vorsichtig schräg in den obersten Teil des Hypokotyls eingespritzt. Eine Schädigung durch die mechanische Verletzung oder Gewebenekrose wurden in keinem Fall beobachtet.

Isolierung der Flavonole und Isoflavone

Von den Cicerpflanzen wurden die Stengel auf Höhe der Kotyledonen abgetrennt und in 100 cm³ sied 80% Aethanol eingetragen. Nach 10 min wurden die Pflanzen mit 80% Aethanol im Waring-Blendor zerkleinert und das Homogenat noch zweimal mit je 100 cm³ 80% Aethanol in der Siedehitze 10 min extrahiert. Die vereinigten Alkoholextrakte wurden i.V. zur Trockne gebracht und der Rückstand mit 5 × 50 cm³ Petroläther digeriert. Das verbleibende Pulver wurde mit 20 cm³ Methanol und 20 cm³ 1 N H_2SO_4 2 Stunden unter Rückfluß hydrolysiert und sodann i.V. das Methanol entfernt. Phenole wurden der wässrigen Lösung mit 5 × 40 cm³ Aether entzogen, der gesamte Aetherextrakt mit 2 × 50 cm³ gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung säurefrei gewaschen und der Aether i.V. entfernt. Der Rückstand wurde mit Methanol aufgenommen und auf Whatman 3 M-Bogen (2 Tage mit 0,01 mole EDTA-Lösung, Wasser und Methanol vorgewaschen) mit Benzol-Eisessig-Wasser, 125:72:3, v/v)¹⁰ chromatographiert. Die Banden der Flavonole und Isoflavone wurden ausgeschnitten und bei Zimmertemperatur mit Methanol 48 Stunden unter Durchlauf eluiert. Die weitere Reinigung der Isoflavone erfolgte wie früher beschrieben.¹ Die Flavonole wurden jeweils noch einmal mit 30%-iger Essigsäure auf vorgewaschenem Whatman 3 M-Bogen gereinigt und nach Eluieren in Methanol photometrisch (Leitz-Unicam-Spektralphotometer SP 800 A) bestimmt. Kämpferol λ_{max} 363 nm (log ϵ 4,280), Quercetin λ_{max} 372 nm (log ϵ 4,340), Isorhamnetin λ_{max} 372 nm (log ϵ 4,338). Kämpferol und Quercetin wurden nach Trägerzusatz durch Kristallisation aus Aethanol-Wasser auf konst. spez. Aktivität gebracht. Isorhamnetin wurde nach weiterer papierchromatographischer Reinigung in Methanol-Lösung vermessen. Die Messung der Radioaktivität erfolgte wie früher angegeben.¹

Anerkennung—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für finanzielle Unterstützung.